
Sneltesten voor vogelgriep in pluimvee – deel 2

F.J. van der Wal, S.B.E. Pritz-Verschuren, A. de Bruin, J.L. Gonzales, S.M. de Boer, N. Beerens N, E.A. Germeraad

Dit onderzoek is uitgevoerd door Wageningen Bioveterinary Research, in opdracht van en gefinancierd door het ministerie van Landbouw, Natuur en Voedselkwaliteit, in het kader van Beleidsondersteunend Onderzoek, thema 'Veilige en duurzame primaire productie' (BO-43-111-105; KD-2023-050).

Wageningen Bioveterinary Research
Lelystad, November 2023

Rapport 2334207

Dit rapport is te downloaden op <https://doi.org/10.18174/653287> of op www.wur.nl/bioveterinary-research (onder Wageningen Bioveterinary Research publicaties).

© 2023 Wageningen Bioveterinary Research

Postbus 65, 8200 AB Lelystad, T 0320 23 82 38, E info.bvr@wur.nl, www.wur.nl/bioveterinary-research.

© Dit rapport is uitgegeven onder een Creative Commons (CC) license: CC **BY-NC-ND** 4.0.

BY: het werk kan worden geredistribueerd (kopiëren, publiceren, communiceren etc.), bij gebruik van het werk moet er wel worden gerefereerd naar het originele werk.

NC: non-commercial use; ND: no derivative works.

Inhoudsopgave

Table of Contents

Inhoudsopgave	3
Samenvatting	4
Summary	5
Verklarende woordenlijst	6
1 Inleiding	7
2 Doel van de studie	9
3 Uitvoering	10
3.1 Sneltesten	10
3.2 Positieve monsters	10
3.3 Negatieve monsters	11
3.4 Inclusiviteit	11
3.5 Analyses	11
3.5.1 Diagnostische sensitiviteit en diagnostische specificiteit	11
3.5.2 Relatie diagnostische sensitiviteit en Ct-waarde	12
3.5.3 Extrapolatie naar veldmonsters	12
4 Resultaten	13
4.1 Diagnostische sensitiviteit	13
4.1.1 Diagnostische sensitiviteit	13
4.1.2 Relatie tussen diagnostische sensitiviteit van sneltesten en Ct-waarden	14
4.1.3 Extrapolatie naar PCR-positieve veldmonsters	15
4.2 Diagnostische specificiteit	16
4.3 Inclusiviteit	17
5 Discussie, conclusies, aanbevelingen	18
5.1 Discussie	18
5.2 Conclusies en aanbevelingen	19
6 Bronnen	20
7 Bijlagen	21

Samenvatting

In het afgelopen decennium zijn er in Nederland een groot aantal uitbraken geweest van vogelgriep (aviaire influenza, AI) op pluimveebedrijven. Bij een verdenking van vogelgriep in pluimvee worden monsters door de NVWA op locatie genomen en vervolgens door het nationaal referentielaboratorium in Lelystad getest met PCR. Als er veel gelijktijdige verdenkingen zijn, kan een eenvoudige sneltest op locatie helpen om prioriteiten te stellen en zo beschikbare middelen efficiënt in te zetten. Er zijn commerciële sneltesten verkrijgbaar voor de detectie van het influenzavirus in monsters afgenomen bij mensen en pluimvee. Een aantal van deze sneltesten is in de voorgaande studie 'Inventarisatie van sneltesten voor vogelgriep' onderzocht op gevoeligheid en gebruiksgemak. In de huidige studie zijn een aantal prestatiekenmerken van drie sneltesten (Clungene, Anigen en Biopanda) uitgebreider onderzocht.

De resultaten laten het volgende zien. Voor luchtpijp- en cloaca-monsters van kippen geïnfecteerd met AI (n=16) komt de Clungene sneltest voor 93% overeen met de PCR-resultaten. Voor met vogelgriep geïnfecteerde vleeseenden (n=8) is dat 100% voor luchtpijp-monsters, maar slechts 50% voor cloaca-monsters. Voor de sneltesten van Anigen en Biopanda, die beiden getest zijn met een kleiner aantal geïnfecteerde kippen (n=8) en vleeseenden (n=4), variëren de overeenkomsten met PCR van 71% tot 100% voor kippen, en resp. 100% en 0% voor luchtpijp- en cloaca-swabs van vleeseenden. Aanvullend is voor de Clungene sneltest berekend dat 90% van de PCR-positieve veldmonsters van de afgelopen twee jaar correct als positief zouden zijn geïdentificeerd. Voor keel- en cloaca-swabs van vogelgriep-negatief pluimvee (20 kippen en 20 vleeseenden) is de Clungene sneltest in 94% van de gevallen correct negatief. De Biopanda en Anigen sneltesten, beiden getest met 4 kippen en 4 vleeseenden, zijn correct negatief met 100% van de geteste monsters. Onder laboratoriumcondities tonen alle drie de sneltesten alle virussen aan uit een panel van 18 aviaire influenzavirussen met 16 verschillende H-subtypen, inclusief hoog- en laagpathogene influenzavirussen met subtype H5 of H7.

De resultaten laten zien dat sneltesten gebruikt kunnen worden voor het aantonen van het vogelgriepvirus in pluimvee. Op basis van de resultaten worden een aantal aanbevelingen gedaan voor het mogelijke gebruik van de Clungene sneltest bij de prioritering van de monsternamen op momenten van meerdere gelijktijdige verdenkingen van vogelgriep in pluimvee.

Summary

In the past decade there have been a large number of outbreaks of bird flu (avian influenza, AI) on poultry farms in the Netherlands. If an outbreak is suspected, samples are taken by the NVWA and tested by PCR at the national reference laboratory in Lelystad. In case of multiple simultaneous suspicions, a simple on-site rapid test can help to prioritize and efficiently deploy available resources. Commercial rapid tests for detection of influenza virus in samples from humans and poultry are available. A number of these were examined in the previous study 'Inventory of rapid tests for bird flu' for analytical sensitivity and ease of use. In the current study, a number of performance characteristics of three rapid tests (Clungene, Anigen and Biopanda) were examined in more detail.

The results show the following. For chickens infected with avian influenza (n=16), the Clungene rapid test matches the PCR results for 93% of the trachea and cloacal samples. For meat ducks infected with avian influenza (n=8), this is 100% for trachea samples but only 50% for cloacal samples. For the rapid tests from Anigen and Biopanda, each tested with samples from a smaller number of AI-infected chickens (n=8) and meat ducks (n=4), the tests agree with PCR results, ranging from 71% to 100% for chickens, and 100% and 0% respectively for trachea and cloaca swabs from meat ducks. For the Clungene rapid test it is estimated that this rapid test would correctly identify 90% of the PCR positive field samples from the past two years. For throat and cloacal swabs from AI-negative poultry (20 chickens and 20 meat ducks), the Clungene rapid test is correctly negative for 94% of the samples. The Biopanda and Anigen rapid tests, both tested with 4 chickens and 4 meat ducks, are correctly negative with 100% of the samples tested. Under laboratory conditions, all three rapid tests detect all viruses from a panel of 18 avian influenza viruses with 16 different H subtypes, including high and low pathogenic variants of H5 and H7 subtypes.

The results show that rapid tests can be used to detect avian influenza virus in poultry. Based on the results, a number of recommendations are made for the possible use of the Clungene rapid test in the prioritization of sampling at times when multiple simultaneous suspicions of bird flu in poultry occur.

Verklarende woordenlijst

Antigeen sneltest (zelf-test; *lateral flow immunoassay*): In dit type test wordt een monster op een test aangebracht en loopt de opgebrachte vloeistof met virusdeeltjes door het materiaal van de test (laterale flow). Na het opbrengen op de test worden antigenen op de virusdeeltjes herkend door antilichamen met daaraan een kleurstof. Nadat de virusdeeltjes door het materiaal van de test zijn getransporteerd, worden deze herkend door geïmmobiliseerde antilichamen; dit is de testlijn. Virusdeeltjes die antilichamen met kleurstof hebben gebonden en op de testlijn door antilichamen zijn ingevangen, vormen een (tweede) zichtbare testlijn (=positieve testuitslag).

Betrouwbaarheidsinterval (Confidence Interval, CI): Het waardenbereik waarbinnen de geschatte waarde naar verwachting een bepaald percentage van de keren zal liggen als een experiment of steekproef wordt herhaald. Vaak wordt het 95% betrouwbaarheidsinterval gebruikt, en een onder- en bovengrens gegeven.

Choana: Spleet in het gehemelte die de verbinding vormt tussen mondholte en neusholte. Bij het nemen van een choana-monster wordt een swab langs de choana gestreken.

Cloaca: De gezamenlijk opening voor producten afkomstig van spijsvertering (feces), urinewegen, en voorplantingsorganen. Bij het nemen van een cloaca-monster wordt een swab in de cloaca gestoken.

Ct-waarde: Dit staat voor het aantal cycli in een PCR-reactie dat voor een monster nodig is om een signaal te geven. Een 'cyclus' is een korte periode waarbinnen de reactietemperatuur op en neer gaat op zo'n manier dat elk stukje target DNA één keer gekopieerd wordt. Deze cyclus wordt telkens herhaald, en op een gegeven moment is er een signaal waarneembaar. Een monsters met een Ct-waarde van bijvoorbeeld 15 geeft al na 15 cycli een signaal en bevat dus een grote hoeveelheid virus. Voor de M-PCR zijn monsters met een Ct-waarde ≤ 36 positief voor AI virus, ≥ 45 is negatief, maar daartussen is de uitslag dubieus en wordt in het geval van veldmonsters een herhaling van de test aanbevolen.

Diagnostische sensitiviteit: Dit is het percentage correct positieve uitslagen van een test. De sensitiviteit van de sneltest kan worden vastgesteld met een set monsters die ook met een 'gouden standaard' methode zijn getest, in deze studie PCR. De sensitiviteit kan vervolgens worden gebruikt om in te schatten welk percentage (veld)monsters die positief zijn met de 'gouden standaard' methode, ook positief zouden zijn met de onderzochte test.

Diagnostische specificiteit: Dit is het percentage correct negatieve uitslagen van een test. Dit wordt bepaald zoals beschreven voor diagnostische sensitiviteit.

Gevoeligheid (analytische gevoeligheid, detectiegrens, aantoonbaarheidsgrens): Gevoeligheid betreft de laagste concentratie van een agens dat een test nog kan detecteren, in dit geval het aantal virusdeeltjes dat gedetecteerd kan worden in een test.

Inclusiviteit: het vermogen van een methode om meerdere varianten van een agens te detecteren, in dit geval het aantal H-subtypen van influenza A.

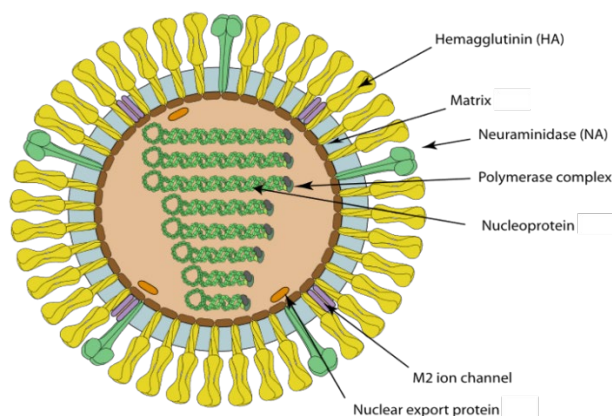
SPF: staat voor 'Specific Pathogen Free' en betreft proefdieren die gegarandeerd vrij zijn van bepaalde pathogenen. In deze studie zijn de kippen vrij van het influenzavirus.

Trachea: Verbinding tussen keel en longen (luchtpijp). Bij het nemen van een trachea-monster wordt een swab langs de trachea gestreken.

1 Inleiding

Aviaire influenza (AI), in de volksmond vogelgriep genoemd, is een infectieuze ziekte in vogels en wordt veroorzaakt door Influenzavirus type A. Er bestaat een milde en een ziekmakende vorm van vogelgriep. De meeste virussen zijn van de milde variant en worden Laag Pathogene Aviaire Influenza (LPAI) virussen genoemd. Kippen die besmet zijn met LPAI virussen hebben milde ziekteverschijnselen. LPAI-virussen van het subtype H5 of H7 kunnen muteren tot een zeer ziekmakende variant. Dit zijn de Hoog Pathogene Aviaire Influenza (HPAI) virussen. Bij kippen die besmet zijn met HPAI virussen wordt ernstige ziekte gezien, met tot 100% sterfte.

Influenzavirussen hebben twee eiwitten aan het oppervlak van het virus: haemagglutinine (HA) en neuraminidase (NA) (Fig. 1). Op basis van deze twee eiwitten worden influenza-virussen verdeeld in subtypen. Tot op heden zijn er 16 verschillende HA (H1–H16) en 9 NA-subtypen (N1–N9) gevonden in vogels. Influenzavirussen zijn aanwezig in wilde vogels en kunnen zich zo verspreiden, ook naar pluimvee. Uitbraken van vogelgriep bij pluimveebedrijven zijn afgelopen jaren in Nederland dan ook veelvuldig voorgekomen (1, 2). Een recent voorbeeld is dat in het begin van 2023 met name meeuwen besmet waren met HPAI H5N1 van het BB-genotype, met in juli 2023 een eerste uitbraak met deze virus-variant bij een pluimveebedrijf (3, 4).



Figuur 1. Schematische weergave van een virusdeeltje (influenzavirus, Orthomyxoviridae -ViralZone, SwissBioPics).

Bij verdenkingen van AI in pluimvee wordt diagnostiek uitgevoerd om te onderzoeken of virussen met het H5 of H7 subtype aanwezig zijn. Voor detectie van deze subtypen in keel- en cloaca-swabs vindt diagnostiek plaats met PCR-testen. Wanneer een HPAI virus wordt aangetoond, wordt het desbetreffende bedrijf geruimd om verspreiding van vogelgriep te voorkomen (5). In periodes met meerdere verdenkingen van HPAI in pluimvee is er in sommige gevallen behoefte aan een snelle voorscreening. Voor dit doel is er onderzoek gedaan naar het gebruik van sneltesten. De uitslag van een sneltest op locatie kan samen met de fysieke inspectie bijdragen aan het besluit om middelen efficiënt in te zetten. Er zijn sneltesten verkrijgbaar voor de detectie van influenza-virus in humane monsters, maar ook specifiek voor detectie in aviaire monsters. Al deze sneltesten werken volgens hetzelfde principe als de inmiddels bekende corona-sneltesten. Het zijn antigeen-testen (of: zelf-testen) die gebaseerd zijn op directe detectie van virusdeeltjes in een monster, met behulp van antilichamen volgens het principe van een *lateral flow immunoassay* (6). Sneltesten zijn echter wel minder gevoelig dan diagnostiek met PCR (7, 8), omdat voor een PCR (het genetisch) materiaal van het virus wordt vermenigvuldigd. Vermenigvuldigen van genetisch materiaal via PCR resulteert in een verhoogde gevoeligheid t.o.v. een sneltest, waarvoor het te detecteren materiaal niet wordt vermenigvuldigd. Echter, het gebruik van sneltesten tijdens de coronapandemie heeft laten zien dat ook testen met een suboptimale gevoeligheid bruikbaar kunnen zijn (9).

In de voorgaande studie 'Inventarisatie van sneltesten voor vogelgriep' zijn uit negen commercieel verkrijgbare influenza-sneltesten vijf testen gekozen waarvan onder laboratoriumcondities de gevoeligheid en het gebruiksgemak zijn onderzocht (10). In deze tweede studie zijn van drie veelbelovende sneltesten een aantal eigenschappen uitgebreider onderzocht. De focus van deze studie ligt op de meest gevoelige sneltest (Clungene), die verkocht wordt voor humaan gebruik. Dit is de test die tijdens de huidige uitbraak met het H5N1 influenza-virus werd gebruikt door Dierenambulance De Ronde Venen / Amstelland voor het aantonen van AI virus in wilde vogels (11, 12). Daarnaast zijn er in deze studie ook twee sneltesten (beperkt) onderzocht die verkocht worden voor het aantonen van AI

virus in vogels (Anigen, Biopanda) en in de voorgaande studie bijna net zo gevoelig waren als de sneltest van Clungene. Voor het onderzoek aan de drie sneltesten worden in deze studie swabs genomen van zowel SPF-kippen als vleeseenden die deelnemen aan een infectie-experiment met HPAI H5N1 virus. Met zowel positieve als negatieve monsters wordt onderzocht of de testen deze monsters correct identificeren als positief (diagnostische sensitiviteit) of negatief (diagnostische specificiteit). Vervolgens wordt geanalyseerd welk deel van de AI-positieve monsters uit de periode oktober 2021 - maart 2023 met de Clungene sneltest als positief zouden zijn aangemerkt. Als derde prestatiekenmerk wordt de inclusiviteit van de sneltesten onderzocht door onder laboratoriumomstandigheden te testen of de drie sneltesten virussen met verschillende H-subtypen kunnen aantonen. Ten slotte worden op basis van de resultaten aanbevelingen gedaan voor gebruik in het veld.

2 Doel van de studie

Deze studie heeft de volgende doelen:

1. Het bepalen van de diagnostische sensitiviteit en specificiteit van de Clungene sneltest voor H5N1 influenzavirus aan de hand van monsters genomen bij SPF-kippen en vleeseenden uit een infectie-experiment.
2. Het verkrijgen van een eerste indruk van de diagnostische sensitiviteit en specificiteit van de Biopanda en Anigen sneltesten door een klein aantal monsters uit hetzelfde infectie-experiment te onderzoeken.
3. Berekenen welk percentage AI-positieve veldmonsters met de sneltest van Clungene in theorie kan worden aangetoond.
4. Het bepalen van de inclusiviteit van de drie sneltesten met een panel van 18 aviaire influenzavirussen met 16 verschillende H-subtypen, inclusief LPAI en HPAI H5 en H7.
5. Het doen van aanbevelingen voor mogelijk gebruik in het veld.

3 Uitvoering

3.1 Sneltesten

Drie sneltesten worden onderzocht:

- Clungene: COVID-19/Influenza A+B antigeen-combosneltest (Praxisdienst, Duitsland);
- Biopanda: Avian Influenza Virus (AIV) Antigen Rapid Test RAPG-AIV-001 (Groot-Brittannië);
- Anigen (Bionote): Anigen Rapid AIV Ag Test Kit (Gentaur/Maxanim, België).

De sneltesten van Clungene en Biopanda tonen het zeer geconserveerde nucleoproteïne (NP) aan (pers. commun.). Voor de Anigen sneltest is daarover geen informatie beschikbaar gesteld, alleen dat het alle AIV typen kan aantonen. Door gebruik te maken van een geconserveerd eiwit als NP is de detectie onafhankelijk van het subtype.

De sneltest van Clungene wordt verkocht voor o.a. neusswabs afgenomen bij mensen. De test is door Dierenambulance De Ronde Venen / Amstelland gebruikt voor het nemen van keel-swabs bij wilde vogels (10, 11). Deze test heeft twee testvensters, waarvan de linker voor COVID is en de rechter voor influenza, met twee aparte testlijnen voor influenza A en B virussen. De sneltest van Clungene was in de voorgaande studie (10) onder laboratoriumcondities de meest gevoelige test. De gevoeligheid bij gebruik van choana-, trachea-, of cloaca-swabs is niet bekend.

De sneltest van Biopanda is bedoeld voor monsters van "birds, such as chickens and ducks". Voor bemonstering van de luchtwegen worden laryngotracheale swabs aanbevolen, i.e. aan de bovenkant van de trachea. Voor deze tests zijn zowel cloaca-swabs als mestmonsters geschikt.

De sneltest van Anigen is bedoeld voor "chicken or duck (excluding wild animal)". Voor bemonstering van de luchtwegen wordt het swabben van de oropharynx aanbevolen en is op een afbeelding te zien dat de swab langs de choana wordt gehaald (pers. commun.). Voor deze tests zijn zowel cloaca-swabs als mestmonsters geschikt.

3.2 Positieve monsters

In een lopend infectie-experiment (AVD40100202215972) werd de gelegenheid geboden om voor dit project monsters te nemen. In het infectie-experiment zijn SPF-kippen en vleeseenden op een leeftijd van zes weken geïnfecteerd met twee verschillende recente HPAI H5N1 virussen, geïsoleerd uit pluimvee in Nederland in de periode 2020-2021 en 2021-2022.

Voor het bepalen van de diagnostische sensitiviteit - het percentage correct positieve uitslagen - zijn er na infectie op verschillende tijdstippen (kip: 2 dagen post infectie (dpi); eend: 3 dpi) bij sectie trachea- en cloaca-swabs genomen en onderzocht met de sneltesten (Tabel 1). Vóór de sectie zijn swabs genomen van choana en cloaca voor PCR, tijdens de sectie zijn swabs genomen van trachea en cloaca voor de sneltesten. Dus, de choana is alleen bemonsterd voor PCR, de trachea alleen voor sneltesten, en de cloaca voor de sneltesten, en 2-8 uur daarvoor voor PCR.

Tabel 1. Trachea- en cloaca-swabs van AI-positieve kippen (n=16) en vleeseenden (n=8) voor het vaststellen van de diagnostische sensitiviteit van sneltesten.

Diersoort	Aantal	H5N1 uit periode	Sneltest op 1e (trachea) of 2e (cloaca) swab	Sneltest op 2e (trachea) of 3e (cloaca) swab
kip	4	2020-2021	Clungene	Biopanda
	4			Anigen
	4	2021-2022		Biopanda
	4			Anigen
eend	2	2020-2021		Biopanda
	2			Anigen
	2	2021-2022		Biopanda
	2			Anigen

In totaal zijn er van 16 geïnfecteerde kippen en 8 geïnfecteerde vleeseenden choana-, trachea-, en cloaca-swabs afgenomen voor onderzoek met:

- de M-PCR (i.h.k.v. het infectie-experiment: choana en cloaca van alle dieren);
- de snelstest van Clungene (deze studie: trachea en cloaca van alle dieren);
- de snelstest van Biopanda (deze studie: trachea en cloaca van de eerste helft van de dieren);
- de snelstest van Anigen (deze studie: trachea en cloaca van de tweede helft van de dieren).

De swabs werden na monsternamen in buisjes vervoerd naar het lab waar ze werden getest volgens de bijbehorende handleidingen, met de maximale hoeveelheid druppels zoals eerder beschreven (10). Testen die niet conform de handleiding zijn uitgevoerd, zijn afgekeurd.

3.3 Negatieve monsters

Voor het snelstestonderzoek zijn in hetzelfde infectie-experiment vóór infectie virus-negatieve choana- en cloaca-swabs genomen van 28 kippen en 28 vleeseenden (Tabel 2). Met behulp van deze negatieve swabs is de diagnostische specificiteit (het percentage correct negatieve uitslagen) bepaald. De afwezigheid van het virus in vleeseenden is bevestigd met PCR. Voor de kippen, die een Specific Pathogen Free (SPF) status hebben is dit niet nodig. Dus, voor kippen zijn de eerste choana- en cloaca-swabs gebruikt voor onderzoek met de sneltesten, voor vleeseenden is dat de tweede set swabs. De swabs werden na monsternamen in buisjes vervoerd naar het laboratorium, waar ze werden getest volgens de bijbehorende handleidingen, en met de maximale hoeveelheid druppels zoals eerder beschreven (10). Testen die niet conform de handleiding zijn uitgevoerd, zijn afgekeurd.

Tabel 2. Choana- en cloaca-swabs van AI-negatieve SPF-kippen (n=28) en vleeseenden (n=28) voor het vaststellen van de diagnostische specificiteit van de drie sneltesten.

Diersoort	Aantal	Sneltest
kip	20	Clungene
	4	Biopanda
	4	Anigen
eend	20	Clungene
	4	Biopanda
	4	Anigen

3.4 Inclusiviteit

Om te onderzoeken of een breed panel AI-virussen met de drie sneltesten kunnen worden aangetoond, is een panel van 18 virussen met 16 verschillende H-subtypen samengesteld (Tabel 3). De inclusiviteit is onderzocht met virusstocks in allantoïes vloeistof, 1:100 verdund in 2,95% tryptosefosfaatbuffer (TFB). Een vast volume van 20 µl van de virusverdundingen is toegevoegd aan de assaybuffer van de sneltest. Van deze verdunding is de maximaal toegestane hoeveelheid druppels op de sneltesten gedruppeld, zoals eerder beschreven (10). Alle 1:100 verdundingen zijn ook getest in de M-PCR, om een indicatie te krijgen over de hoeveelheid genetisch materiaal in de monsters. Als negatieve controle is TFB gebruikt, en 1:100 verdund negatieve allantoïes vloeistof in TFB. Alle virusverdundingen zijn in duplo getest.

3.5 Analyses

3.5.1 Diagnostische sensitiviteit en diagnostische specificiteit

Voor de sneltesten is de diagnostische sensitiviteit per categorie bepaald. Een categorie bestaat uit swabs genomen van één diersoort (kip of vleeseend) van één monstertype (choana/trachea, cloaca) en getest met één sneltest (Clungene, Biopanda, Anigen). Hierbij is geen onderscheid gemaakt tussen een

Tabel 3. De AI-virussen voor het vaststellen van de inclusiviteit van de drie sneltesten. Het panel bevat 18 virussen met 16 verschillende H-subtypen, inclusief HPAI en LPAI H5 en H7.

Virus	Naam
H1N5	A/turkey/Netherlands/07014290/2007
H2N7	A/chicken/Netherlands/14003005/2014
H3N8	A/mallard/Netherlands/11015220/2011
H4N6	A/mallard/Netherlands/09014545/2009
H5N1 HP	A/chicken/Netherlands/21038165-006010/2021
H5N2 LP	A/chicken/Netherlands/17014215-026030/2017
H6N8	A/duck/Netherlands/14016168/2014
H7N7 HP	A/chicken/Netherlands/1/2003
H7N9 LP	A/chicken/Netherlands/16007311-058062/2016
H8N4	A/chicken/Netherlands/11004004/2011
H9N2	A/chicken/Netherlands/10020245/2010
H10N3	A/mallard/Netherlands/22011112-006/2022
H11N6	A/duck/England/1/56
H12N5	A/mallard/Netherlands/15011910/2015
H13N3	A/black-headed gull/Netherlands/72/2008
H14N7	A/herring gull/Netherlands/08007097/2008
H15N9	A/shearwater/West Australia/2576/79
H16N3	A/black-headed gull/Netherlands/08016893/2008

infectie met een H5N1 virus uit 20-21 of 21-22. Alleen resultaten van PCR-positieve monsters zijn gebruikt. Testen die niet conform de handleiding zijn uitgevoerd, zijn afgekeurd; deze de resultaten zijn niet meegenomen in de analyse. De diagnostische sensitiviteit is berekend met gebruik van de Clopper-Pearson methode (13) (exact confidence intervals) waarbij gekozen is voor 95% betrouwbaarheidsintervallen vanwege het geringe aantal monsters (methode 1). Er is ter controle ook een tweede methode gebruikt, i.e. een logistiek regressiemodel (methode 2). De diagnostische specificiteit en 95% betrouwbaarheidsintervallen zijn ook per categorie bepaald, maar alleen met gebruik van de 'exact' methode (methode 1).

3.5.2 Relatie diagnostische sensitiviteit en Ct-waarde

De relatie tussen diagnostische sensitiviteit van de sneltesten en Ct-waarden verkregen met PCR is grafisch geëxploreerd door de verdeling van Ct-waarden binnen en tussen de verschillende categorieën te vergelijken. Daarna is de diagnostische sensitiviteit van de Clungene sneltest als functie van de Ct-waarden gemodelleerd met gebruik van een logistisch regressiemodel. Deze analyse is alleen voor de sneltest van Clungene uitgevoerd, i.e. de sneltest waarvoor de meeste gegevens beschikbaar zijn.

3.5.3 Extrapolatie naar veldmonsters

Het ontwikkelde model (zie 3.5.2) is gebruikt om voor de Clungene sneltest de *probability of detection* van PCR-positieve veldmonsters te voorspellen op basis van Ct-waarden. De methode is vergelijkbaar met een eerder beschreven statistische benadering (14). Voor de analyse zijn gegevens gebruikt van alle PCR-positieve monsters (767 pools) van de 92 AI-positieve bedrijven in Nederland uit de periode oktober 2021 - maart 2023. Deze dataset is ook gebruikt in de voorgaande studie (10) voor extrapolatie naar veldmonsters. De beschikbare gegevens bestaan uit Ct-waarden van de PCR, gegevens over diersoort (kippen, vleeseenden, kalkoenen), type swabs (trachea, cloaca) en de reden van inzending, waarbij het merendeel (717 pools) verdenkingen betreft.

4 Resultaten

4.1 Diagnostische sensitiviteit

4.1.1 Diagnostische sensitiviteit

De resultaten van de sneltesten en de Ct-waarden van de PCR staan per diersoort en type swab in Tabel 4. De diagnostische sensitiviteit en 95% betrouwbaarheidsintervallen (BI) staan in Tabel 5, waarbij de resultaten van methode 2 de resultaten van methode 1 bevestigen. De diagnostische sensitiviteit wordt hieronder beschreven aan de hand van de resultaten van methode 1.

Voor de Clungene sneltest is de diagnostische sensitiviteit 93% voor zowel trachea- als cloaca-swabs in kippen (BI resp. 70-99% en 69-99%). Bij vleeseenden is de diagnostische sensitiviteit 100% in trachea-swabs, maar voor cloaca-swabs van vleeseenden is de diagnostische sensitiviteit slechts 50% (BI 22-78%). Voor de Biopanda sneltest is de diagnostische sensitiviteit voor trachea en cloaca van kippen resp. 100% (BI 65-100%) en 71% (BI 36-92%). Voor Anigen is dit resp. 88% (BI 53-98%) en 88% (BI 53-98%). De diagnostische sensitiviteit is 0% (BI 0-49%) voor cloaca-swabs van vleeseenden voor de sneltesten van Biopanda en Anigen. Opvallend is dat de Ct-waarden van cloaca-swabs van vleeseenden veel hoger zijn dan de Ct-waarden die horen bij trachea-swabs.

Tabel 4. Resultaten van sneltesten met monsters van PCR-positieve kippen en vleeseenden.

Dier	Swab	Clungene		Biopanda		Anigen	
		Gemiddelde Ct (min - max)	Resultaten*	Gemiddelde Ct (min - max)	Resultaten*	Gemiddelde Ct (min - max)	Resultaten*
kip	trachea	23.9 (19.0-36.5)	14/15	24.6 (19.0-36.5)	7/7	23.3 (19.9-26.0)	7/8
	cloaca	24.5 (21.4-28.9)	13/14	24.8 (22.2-28.9)	5/7	24.3 (21.4-28.0)	7/8
eend	trachea	20.9 (19.3-24.8)	8/8	22.1 (19.8-24.8)	4/4	19.8 (19.3-20.7)	4/4
	cloaca	28.5 (26.6-29.8)	4/8	28.2 (26.6-29.3)	0/4	28.8 (27.8-29.8)	0/4

* De gegeven verhoudingen betreffen het aantal goedgekeurde monsters dat positief is in de sneltest, ten opzichte van het aantal PCR-positieve monsters.

Tabel 5. Diagnostische sensitiviteit van sneltesten met monsters van PCR-positieve kippen en vleeseenden.

Dier	Swab	Sneltest	Methode 1* #		Methode 2 #	
			Diagnostische sensitiviteit	Betrouwbaarheids-interval (95% BI)	Diagnostische sensitiviteit	Betrouwbaarheids-interval (95% BI)
kip	trachea	Clungene	0,93	0,70-0,99	0,94	0,72-0,99
		Biopanda	1,00	0,65-1,00	1,00	0,68-1,00
		Anigen	0,88	0,53-0,98	0,87	0,52-0,98
	cloaca	Clungene	0,93	0,69-0,99	0,93	0,74-1,00
		Biopanda	0,71	0,36-0,92	0,71	0,35-0,95
		Anigen	0,88	0,53-0,98	0,87	0,55-0,99
eend	trachea	Clungene	1,00	0,68-1,00	1,00	0,68-1,00
		Biopanda	1,00	0,51-1,00	1,00	0,49-1,00
		Anigen	1,00	0,51-1,00	1,00	0,49-1,00
	cloaca	Clungene	0,50	0,22-0,78	0,50	0,21-0,79
		Biopanda	0,00	0,00-0,49	0,10	0,00-0,51
		Anigen	0,00	0,00-0,49	0,10	0,00-0,51

* Diagnostische sensitiviteit en BI zijn uitgedrukt als fractie, in de tekst worden percentages gebruikt.

Zie 3.5.1.

Uit de analyse van de diagnostische sensitiviteit valt het volgende op:

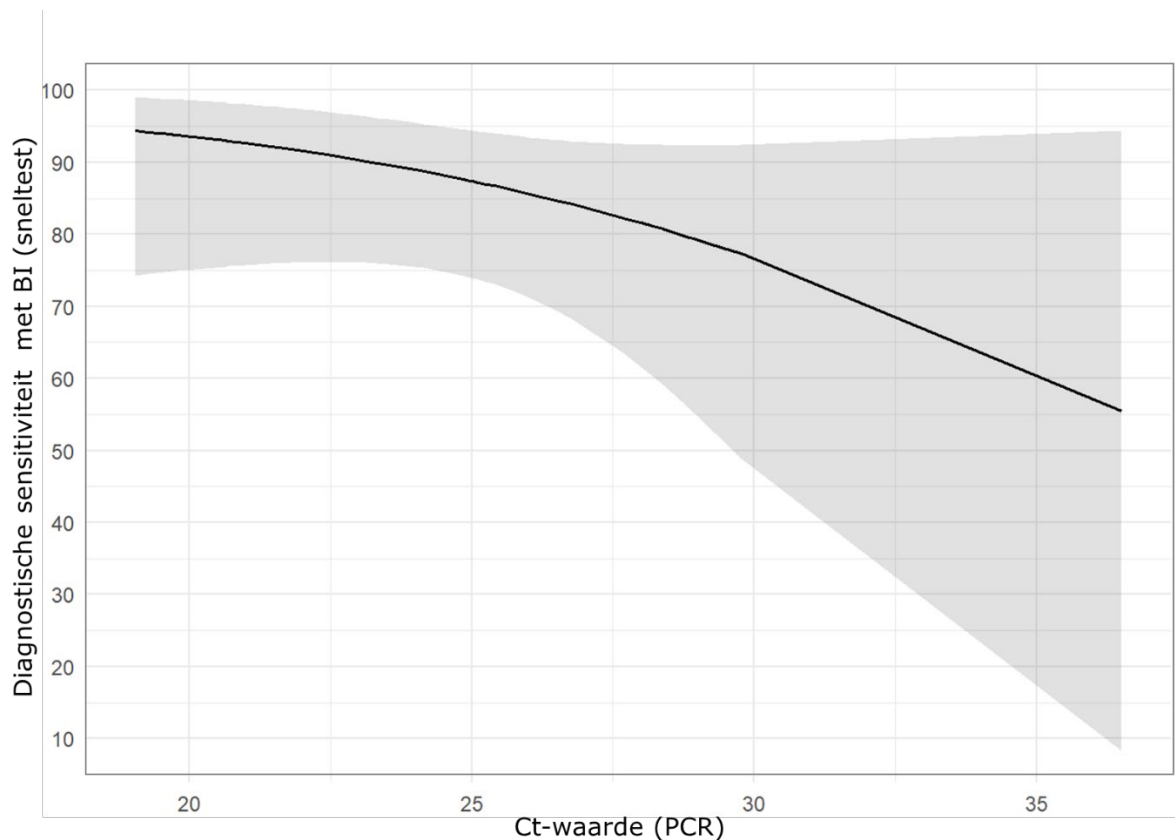
- i) De diagnostische sensitiviteit is voor de Clungene sneltest 93% voor zowel trachea- als cloaca-swabs van kippen;
- ii) De diagnostische sensitiviteit voor kippen is voor de Biopanda sneltest 100% voor trachea-swabs, maar slechts 71% voor cloaca swabs ondanks de vergelijkbare gemiddelde Ct-waarde. Een statistische onderbouwing van het verschil tussen het type monsters in deze test is echter niet mogelijk door het kleine aantal monsters;
- iii) De diagnostische sensitiviteit voor kippen is voor de Anigen sneltest 88% voor zowel trachea- als cloaca-swabs van kippen en lijkt daarmee minder gevoelig dan de Clungene sneltest – een statistische onderbouwing hiervan is niet mogelijk door het kleine aantal monsters;
- iv) Voor cloaca's van vleeseenden is de diagnostische sensitiviteit van alle drie testen laag in dit infectie-experiment, in overeenstemming met de waarneming dat de Ct-waarden voor deze categorie het hoogst zijn.

4.1.2 Relatie tussen diagnostische sensitiviteit van sneltesten en Ct-waarden

De resultaten zijn eerst 'grafisch geëxploreerd' om inzicht in de resultaten te krijgen (Bijlagen 1-3). Ct-waarden zijn weergegeven per diersoort en swabtype (Bijlage 1). Bij kippen zijn Ct-waarden rond de 24, waarbij de mediaan van de Ct in de cloaca monsters ca. 1 Ct hoger is. Bij vleeseenden is dat verschil ca. 8 Ct's wat betekent dat er bij vleeseenden meer dan 100x meer virus aanwezig is in de trachea dan in de cloaca. Hetzelfde is te zien in Bijlage 2, maar dan opgesplitst per sneltest. Hier is ook te zien dat de drie sneltesten per categorie getest zijn met (qua Ct-waarden) vergelijkbare sets monsters. De gegevens in Bijlage 1 en 2 suggereren dat in dit infectie-experiment de diagnostische sensitiviteit afhankelijk is van de Ct-waarden, niet van de diersoort of het swabtype. Daarom is er gekeken naar de verdeling van Ct-waarden voor alle sneltest-resultaten. Deze resultaten staan in Bijlage 3. Het blijkt dat voor alle sneltesten de meeste sneltest-negatieve monsters (>70%) Ct-waarden >25 hebben. Dit bevestigt dat het mogelijk is om de diagnostische sensitiviteit te beschouwen als een functie van de Ct-waarden, onafhankelijk van diersoort of swabtype. De diagnostische sensitiviteit is vervolgens op basis van resultaten met de Clungene sneltest beschreven met een logistisch regressiemodel (zie 3.5.2):

$$\text{Diagnostische sensitiviteit} = \frac{1}{1 + e^{-(5.661 - 0.149 * Ct)}}$$

Het model laat zien dat monsters met Ct ≤25 een geschatte diagnostische sensitiviteit hebben van 87,5% of hoger (Fig. 1). Bij Ct >25 daalt de geschatte diagnostische sensitiviteit tot bij Ct 30 de geschatte gemiddelde diagnostische sensitiviteit nog 75% is. De betrouwbaarheid van de diagnostische sensitiviteit is laag voor monsters met Ct ≥30, zoals te zien is aan de brede betrouwbaarheidsintervallen. Dit heeft te maken met het beperkt aantal PCR-positieve monsters met hogere Ct-waarden (zie ook Bijlage 1).

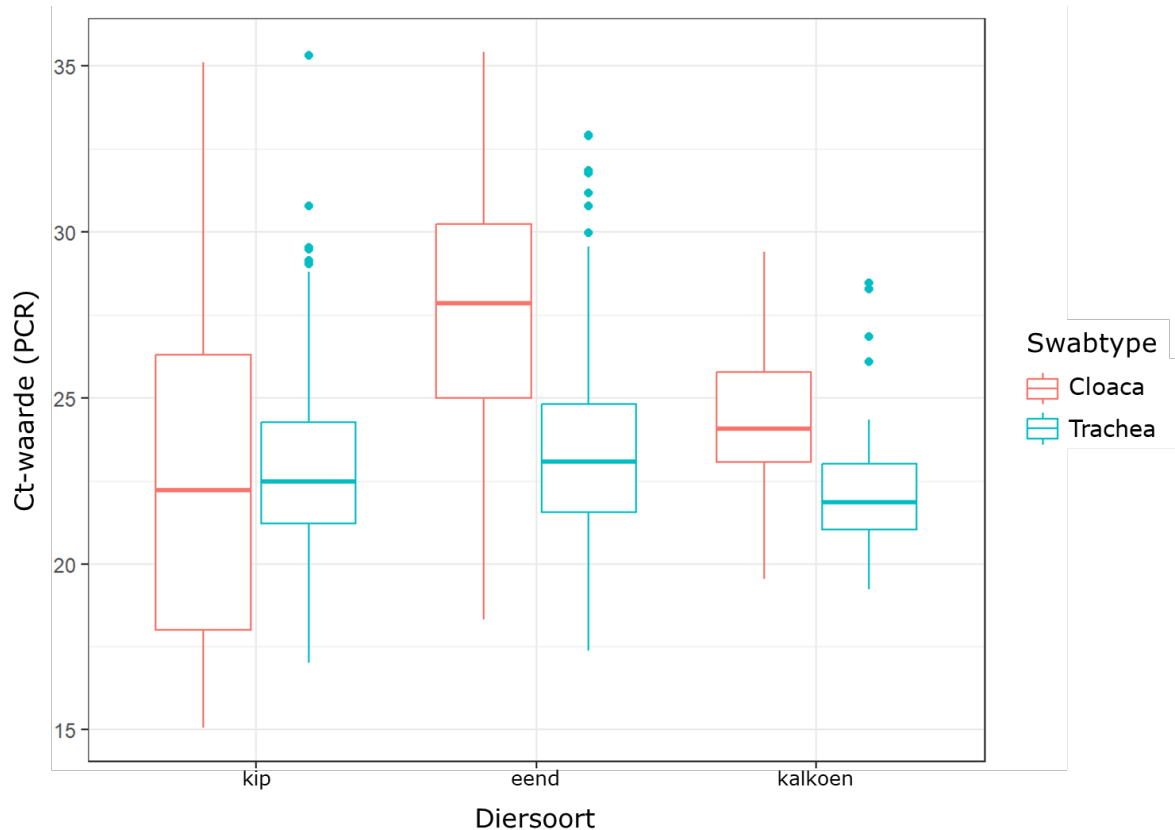


Figuur 1. Voor de Clungene sneltest is de voorspelde gemiddelde diagnostische sensitiviteit (zwarte lijn) en bijbehorend 95% betrouwbaarheidsinterval (BI) (grijs oppervlak) gegeven. Dit is gemodelleerd met Ct-waarden die horen bij de gebruikte trachea- en cloaca-swabs afkomstig uit het infectie-experiment van kippen en vleeseenden met H5N1 virus.

4.1.3 Extrapolatie naar PCR-positieve veldmonsters

De voorspelde diagnostische sensitiviteit als functie van Ct-waarden (Fig. 1) is gebruikt om uitspraken te doen over wat de uitslagen zouden zijn geweest als alle PCR-positieve pools (n=767) uit de periode oktober 2021 - maart 2023 zouden zijn onderzocht in de Clungene sneltest met trachea- en cloaca-swabs. Gegevens van de PCR-positieve pools staan in Figuur 2. Deze figuur geeft de verdeling weer van Ct-waarden van PCR-positieve pools voor de verschillende diersoorten en swabtypen. Bij veldmonsters van vleeseenden is, net zoals in het infectie-experiment, een groot verschil tussen monsters uit de luchtwegen en uit de cloaca. Dit is in mindere mate ook bij kalkoenen het geval. Het overgrote deel van de trachea-veldmonsters heeft een Ct-waarde <25. De gegevens uit Fig. 2 zijn in Bijlage 4 opgesplitst per type inzending.

De diagnostische sensitiviteit van de Clungene sneltest wordt voorspeld voor gepoolde veldmonsters die zijn ingezonden n.a.v. een verdenking van een AI-uitbraak. Per categorie is voor elke pool de *probability of detection* (sensitiviteit) voorspeld op basis van de bijbehorende Ct-waarde en is vervolgens de gemiddelde diagnostische sensitiviteit berekend. Tabel 6 geeft weer voor welk percentage van de PCR-positieve pools de Clungene sneltest verwacht wordt positief te zijn. Dit is >90% voor trachea swabs van alle diersoorten. Voor cloaca-swabs is dit een paar procent lager, met het grootste verschil (bijna 10%) bij vleeseenden.



Figuur 2. Ct-waarden van alle AI-positieve veldmonsters (767 pools) uit Nederland uit de periode oktober 2021 - maart 2023. De gegevens zijn opgesplitst per diersoort (kip, vleeseend, kalkoen) en swabtype (trachea, cloaca). Voor elke categorie geldt het volgende. De rechthoek geeft het bereik aan waarbinnen 50% van de gevonden waarden valt. De horizontale lijn daarbinnen is de mediaan van alle waarden. De verticale lijnen staan voor het waardenbereik van de laagste en hoogste 25%. Extreme waarden worden als aparte datapunten weergegeven.

Tabel 6. Voorspelde resultaten van de Clungene sneltest op AI-positieve veldmonsters (pools) uit oktober 2021 - maart 2023 die ingezonden zijn op basis van een verdenking (717 van de 767 pools), weergegeven per categorie (diersoort en swabtype). De gemiddelde Ct-waarden van iedere categorie zijn ook gegeven.

Diersoort	Swab	Diagnostische sensitiviteit	Gemiddelde Ct
kip	trachea	90,1	22,8
	cloaca	89,2	22,5
eend	trachea	90,8	22,3
	cloaca	81,4	27,2
kalkoen	trachea	90,5	22,5
	cloaca	87,9	24,3

4.2 Diagnostische specificiteit

De diagnostische specificiteit van de Clungene sneltest is in kippen 100% (BI 94-100%) voor de 20 choana-swabs en 94% (BI 74-99%) voor de 18 cloaca-swabs. Bij vleeseenden is dit 100% voor zowel de 19 choana-swabs (BI 83-100%) als de 20 cloaca-swabs (BI 84-100%). De lagere diagnostische specificiteit in cloaca's van kippen is vanwege één vals-positief monster in deze set swabs. De sneltesten van Anigen en Biopanda hebben een diagnostische specificiteit van 100%, met ruimere betrouwbaarheidsintervallen door gebruik van minder monsters. In totaal zijn drie sneltesten afgekeurd wegens afwijkingen in de uitvoering (zie de voetnoten bij Tabel 7).

Tabel 7. Diagnostische specificiteit van sneltesten op swabs van AI-negatieve kippen en vleeseenden.

Dier	AI-negatieve status	Swab	Sneltest	Resultaten sneltesten #						
				Aantal	Afgekeurd	Pos.	Neg.	Neg. / totaal	Diagnostische specificiteit	Betrouwbaarheids-interval (95% BI)
kip	SPF	choana	Clungene	20	0	0	20	20/20	1,00	0,84-1,00
			Biopanda	4	0	0	4	4/4	1,00	0,51-1,00
			Anigen	4	0	0	4	4/4	1,00	0,51-1,00
		cloaca	Clungene	20	2*	1***	17	17/18	0,94	0,74-0,99
			Biopanda	4	0	0	4	4/4	1,00	0,51-1,00
			Anigen	4	0	0	4	4/4	1,00	0,51-1,00
eend	negatief in PCR	choana	Clungene	20	1**	0	19	19/19	1,00	0,83-1,00
			Biopanda	4	0	0	4	4/4	1,00	0,51-1,00
			Anigen	4	0	0	4	4/4	1,00	0,51-1,00
		cloaca	Clungene	20	0	0	20	20/20	1,00	0,84-1,00
			Biopanda	4	0	0	4	4/4	1,00	0,51-1,00
			Anigen	4	0	0	4	4/4	1,00	0,51-1,00

* Afgekeurd: onbekende hoeveelheid druppels opgebracht doordat de mest in het monster aanvankelijk de opening van de druppelaar verstopte, wat oplost kan worden door harder in de druppelaar te knijpen, maar ten koste gaat van de controle over de uitstroomsnelheid en dus de hoeveelheid die de sneltest in gaat. Dit maakt dat deze testresultaten ongeldig zijn.

** Afgekeurd: swab is niet mee-geïncubeerd na het mengen. Dit maakt dat dit (negatieve) testresultaat ongeldig is.

*** Het positieve monster is in deze test positief voor zowel influenza A als B (en negatief voor COVID). Het sample is opnieuw getest met hetzelfde resultaat. De buis gebruikt voor transport van de swab werd getest met de reguliere AI-PCR; de uitslag daarvan is ook negatief (met de M-PCR kan influenza B niet worden aangetoond). Dit monster is dus vals-positief.

Diagnostische specificiteit en BI zijn uitgedrukt als fractie, in de tekst worden percentages gebruikt.

4.3 Inclusiviteit

De drie verschillende sneltesten tonen allemaal alle 18 geteste virussen aan, i.e. de H-subtypen H1-16 inclusief HP AI- en LP AI-varianten van H5 en H7 (Tabel 8). Controles op de virusverduningen met PCR zijn allemaal positief.

Tabel 8. De inclusiviteit van de drie sneltesten en van de PCR met 18 verschillende virussen.

subtype‡	Clungene		Biopanda		Anigen		M-PCR (Ct-waarde)	
	1e test	2e test	1e test	2e test	1e test	2e test	1e test	2e test
H1	+	+	+	+	+	+	19,29	19,42
H2	+	+	+	+	+	+	20,02	20,1
H3	+	+	+	+	+	+	20,74	20,93
H4	+	+	+	+	+	+	20,56	20,45
H5 HP	+	+	+	+	+	+	18,38	18,14
H5 LP	+	+	+	+	+	+	20,38	20,19
H6	+	+	+	+	+	+	21,62	21,66
H7 HP	+	+	+	+	+	+	21,19	21,1
H7 LP	+	+	+	+	+	+	19,96	19,97
H8	+	+	+	+	+	+	18,92	18,99
H9	+	+	+	+	+	+	23,42	23,5
H10	+	+	+	+	+	+	20,01	19,97
H11	+	+	+	+	+	+	19,17	19,19
H12	+	+	+	+	+	+	18,19	18,17
H13	+	+	+	+	+	+	19,93	19,96
H14	+	+	+	+	+	+	22,82	22,88
H15	+	+	+	+	+	+	18,45	18,38
H16	+	+	+	+	+	+	22,74	22,72
Negatief 1	-	-	-	-	-	-	-	-
Negatief 2	-	nb	-	nb	-	nb	nb	nb

Afkortingen: LP, laag pathogeen; HP, hoog pathogeen; nb, niet bepaald; Negatief 1, TFB; Negatief 2, negatieve allantoïsvloeistof 1:100 in TFB.

5 Discussie, conclusies, aanbevelingen

5.1 Discussie

Naar aanleiding van een eerdere studie (10) zijn drie influenza-sneltesten onderzocht met swabs van kippen en vleeseenden afkomstig uit een lopend infectie-experiment met HPAI H5N1 virus. Voor drie sneltesten is de diagnostische sensitiviteit en specificiteit bepaald. De resultaten voor de Clungene sneltest zijn ook gebruikt om te schatten welk gemiddeld percentage PCR-positieve veldmonsters van de afgelopen twee jaar positief zouden zijn geweest met deze sneltest. Tot slot, zijn alle drie sneltesten onderzocht op inclusiviteit van 18 verschillende AI virussen. De resultaten laten zien dat de sneltest van Clungene onder voorwaarden gebruikt kan worden voor het aantonen van het AI-virus in kippen en vleeseenden.

De sneltest van Clungene heeft voor zowel trachea- als cloaca-swabs van kippen een hoge diagnostische sensitiviteit (93%) en is daarom in het veld te gebruiken om monsterstromen van kippen te prioriteren. De andere twee sneltesten presteren ook goed, maar door het geringe aantal geteste monsters is het betrouwbaarheidsinterval daar groter. Bij vleeseenden zijn de drie sneltesten voor trachea-swabs betrouwbaar door de hoge diagnostische sensitiviteit en specificiteit. Echter, in cloaca-swabs is de diagnostische sensitiviteit 50% (Clungene) of lager (Biopanda, Anigen). De sneltesten kunnen dus minder goed virussen detecteren in cloaca swabs van vleeseenden. De lage diagnostische sensitiviteit in cloaca swabs van eenden zou veroorzaakt kunnen zijn doordat in dit experiment de hoeveelheid virus in cloaca-swabs van vleeseenden relatief laag is. Ook het sequentiële bemonsteren in het infectie-experiment voor de sneltesten kan invloed hebben op de diagnostische sensitiviteit; de cloaca-swabs van vleeseenden voor Biopanda/Anigen sneltesten zijn genomen ná swabs voor de Clungene sneltesten. Ondanks de lage diagnostische sensitiviteit in cloaca swabs van vleeseenden is het raadzaam om zowel trachea- als cloaca-swabs te testen. De hoeveelheid virus in de luchtwegen en de cloaca is afhankelijk van de fase van infectie en van de virusstam. Daardoor bestaat de mogelijkheid bestaat dat, als er aan bepaalde voorwaarden is voldaan, er juist meer virus in de cloaca aanwezig is dan in de luchtwegen.

De resultaten van de sneltesten laten zien dat de diagnostische sensitiviteit afhankelijk is van de Ct-waarden. Een analyse met resultaten van het infectie-experiment laat zien dat de Clungene sneltest monsters met lagere Ct-waarden (≤ 25) in 87,5% van de gevallen correct als positief identificeert. Omdat dergelijke lage Ct-waarden vaak worden aangetroffen bij AI-positieve veldmonsters, ingezonden bij verdenkingen, is met behulp van een model uitgerekend in hoeverre de Clungene sneltest positieve veldmonsters correct kan identificeren. Dat is gedaan door resultaten met monsters uit het infectie-experiment te extrapoleren naar de gegevens van veldmonsters van de afgelopen twee jaar. Voor trachea-swabs van alle geteste soorten pluimvee heeft de Clungene sneltest een voorspelde diagnostische sensitiviteit van >90%, voor cloaca-swabs is dat wat lager. De hoge diagnostische sensitiviteit is direct gerelateerd aan het feit dat AI-positieve monsters, die afkomstig zijn van inzendingen bij verdenkingen, veel virus bevatten. Deze extrapolatie laat zien dat gebruik door de NVWA van de Clungene sneltest op locatie bij acute verdenkingen een goede optie is om snel bruikbare informatie te verzamelen, die gebruikt kan worden om prioriteiten te stellen en zo beschikbare middelen efficiënt in te kunnen zetten.

Naast het vermogen om met hoge specificiteit positieve monsters te detecteren, is het belangrijk dat een test negatieve monsters kan onderscheiden. Met de monsters uit het infectie-experiment is de diagnostische specificiteit voor alle drie sneltesten hoog voor alle categorieën (diersoort en swabtype). De Clungene sneltest vindt in deze proefopzet één vals-positief cloaca-monster. De diagnostische specificiteit van de Clungene sneltest zou met resultaten van gebruik in het veld geëvalueerd moeten worden.

Niet alleen diagnostische sensitiviteit en specificiteit zijn belangrijk voor een sneltest, maar ook het kunnen aantonen van relevante varianten. De studie naar de inclusiviteit van de sneltesten laat zien dat

de Clungene sneltest alle geteste virussen kan aantonen, en in principe bruikbaar is voor toekomstige uitbraken van subtypen anders dan de huidige H5N1 virussen. Dit geldt ook voor de andere twee sneltesten - mits de diagnostische sensitiviteit en specificiteit voldoende zijn.

Er zijn een aantal praktische aspecten waar aandacht voor nodig is indien sneltesten op locatie gebruikt worden. Het eerste aspect is dat er bepaald moet worden hoeveel dieren er getest moeten worden. Een tweede praktische aspect betreft de swabs. De swabs die met de sneltesten worden meegeleverd zijn te groot voor de luchtwegen van kippen. Alhoewel de fabrikanten van de sneltesten geen garanties geven bij gebruik van andere swabs, en het toch in alle gevallen swabs van kunststof betreft, is de meest praktische benadering om voor sneltesten op locatie vast te houden aan de bestaande procedures en swabs. Dit kan geëvalueerd worden in een veldstudie. Een derde praktisch aspect is dat bij lage hoeveelheden virus de sneltesten moeilijk afleesbaar zijn (10), waardoor vage bandjes op de sneltest gemist kunnen worden. Conditie op locatie zouden zo moeten zijn dat de testen volgens protocol kunnen worden uitgevoerd, en dat er voldoende licht is om de testen af te lezen. Eventueel kan gedacht worden aan het gebruik van relatief goedkope wegwerp-readers.

5.2 Conclusies en aanbevelingen

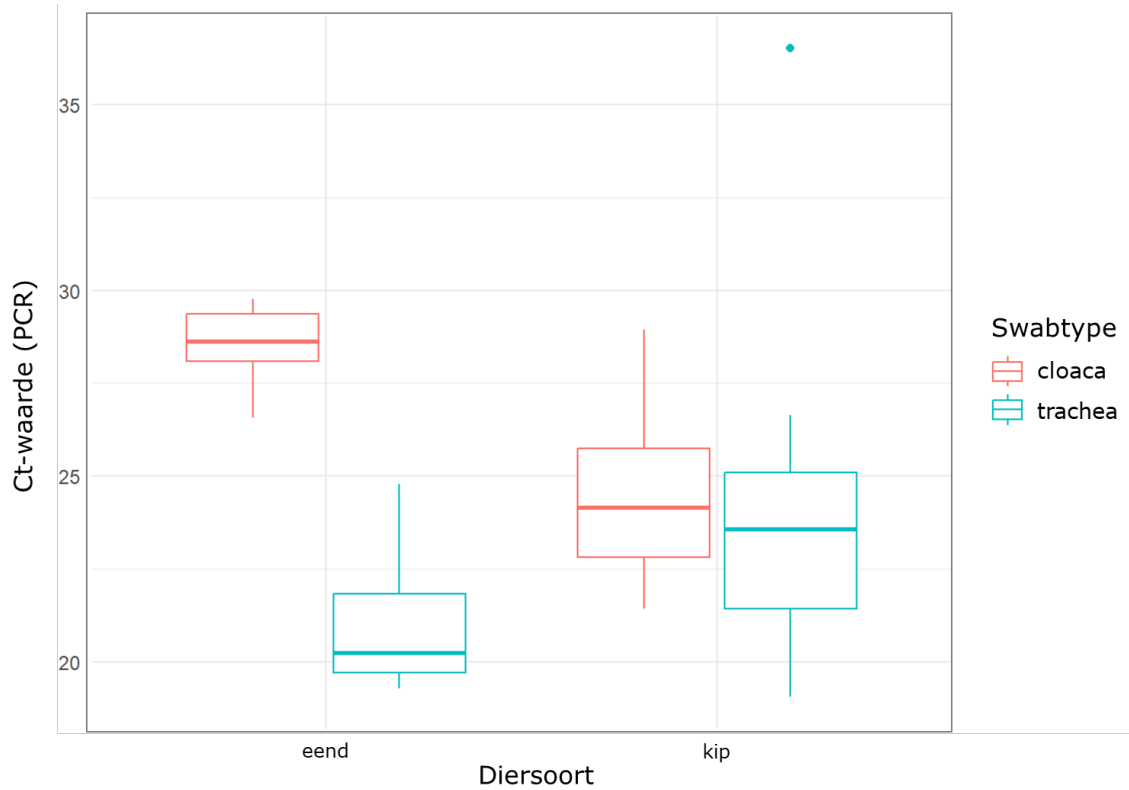
1. In deze studie heeft de sneltest van Clungene een hoge diagnostische sensitiviteit. De diagnostische sensitiviteit van de sneltesten van Biopanda en Anigen zijn vergelijkbaar, maar deze getallen zijn minder zeker, omdat er met deze sneltesten minder monsters zijn onderzocht.
2. De inclusiviteit van alle de drie sneltesten is goed: de sneltesten kunnen alle geteste subtypen van het virus aantonen.
3. De diagnostische sensitiviteit van de sneltesten is afhankelijk van de Ct-waarden van de monsters, en kan beschreven worden met een model. Bij een Ct-waarde ≤ 25 heeft de Clungene sneltest een diagnostische sensitiviteit $\geq 87,5\%$ voor monsters uit het infectie-experiment. Het model voorspelt een diagnostische sensitiviteit van $>90\%$ voor trachea swabs van verdenkingen.
4. De diagnostische specificiteit van de Clungene sneltest is hoog ($\geq 94\%$). De diagnostische specificiteit van de sneltesten van Biopanda en Anigen is ook hoog (100%), maar deze getallen zijn minder zeker omdat er minder monsters zijn onderzocht.
5. Er wordt geadviseerd om de Clungene sneltest - tevens de goedkoopste test - te gebruiken voor het prioriteren van de monsterstromen in het veld. Dit is een standaard sneltest die met minimale instructies op locatie kan worden uitgevoerd.
6. Er wordt geadviseerd om de diagnostische sensitiviteit en specificiteit van de Clungene sneltest na toepassing in het veld opnieuw te evalueren.
7. Het is noodzakelijk om meerdere sneltesten (voor swabs van verschillende dieren) uit te voeren per verdenking, om met voldoende zekerheid te kunnen bepalen of een bedrijf geïnfecteerd is. Het aantal sneltesten dat noodzakelijk is kan in een veldstudie bepaald worden.
8. Er wordt geadviseerd om zowel trachea- als cloaca-monsters te testen voor de detectie van AI in veldmonsters met sneltesten.
9. De swabs die met de sneltesten worden meegeleverd zijn te groot voor de luchtwegen van kippen. Een praktische benadering is om de swabtypen die nu gebruikt worden door de NVWA ook te gebruiken voor de sneltesten. Er wordt geadviseerd om deze aanpak na toepassing in het veld te evalueren.

6 Bronnen

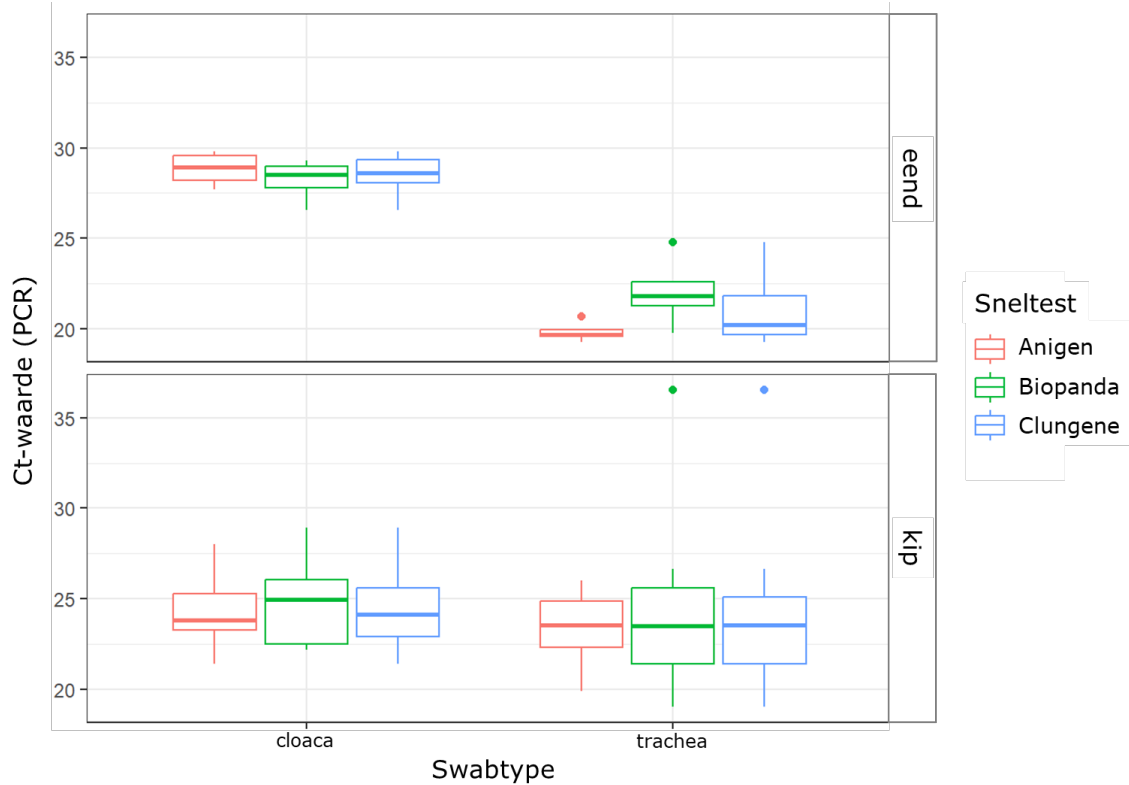
1. <https://www.wur.nl/nl/onderzoek-resultaten/onderzoeksinstituten/bioveterinary-research/show-bvr/vogelgriep-bij-pluimvee-in-20212022.htm>
2. <https://www.wur.nl/nl/onderzoek-resultaten/onderzoeksinstituten/bioveterinary-research/show-bvr/vogelgriep-bij-pluimvee-in-20222023.htm>
3. <https://www.wur.nl/nl/onderzoek-resultaten/onderzoeksinstituten/bioveterinary-research/show-bvr/vogelgriepvirus-aangetroffen-onder-verschillende-meeuwensoorten.htm>
4. <https://www.wur.nl/nl/onderzoek-resultaten/onderzoeksinstituten/bioveterinary-research/show-bvr/nieuwe-variant-vogelgriepvirus-treft-bedrijf-biddinghuizen.htm>
5. <https://www.nvwa.nl/onderwerpen/vogelgriep-preventie-en-bestrijding/maatregelen-nvwa-bij-vogelgriep>
6. https://en.wikipedia.org/wiki/Lateral_flow_test
7. <https://www.rivm.nl/coronavirus-covid-19/testen>
8. <https://www.cdc.gov/flu/professionals/diagnosis/overview-testing-methods.htm>
9. Larremore et al., 2021, Test sensitivity is secondary to frequency and turnaround time for COVID-19 screening. *Sci. Adv.* 7:eabd5393. DOI:10.1126/sciadv.abd5393
10. Inventarisatie van sneltesten voor vogelgriep, Van der Wal et al., WBVR Rapport 2314469
11. <https://open.overheid.nl/documenten/ronl-8d94b1037a7b2ca68976c9596fcbecef35ee9e2e/pdf>
12. https://5a15accc-3bd2-402b-ae8a-dfce0f2274e5.filesusr.com/ugd/21c655_1c317bfbfd864461094a69232223c9076.pdf
13. Clopper & Pearson, 1934, The Use of Confidence or Fiducial Limits Illustrated in the Case of the Binomial. *Biometrika* 26, 404–413. Doi: 10.2307/2331986
14. Yellowlees & Perry, 2015, Estimating vaccine efficacy using animal efficacy data. *European Journal of Pharmacology* 759: 63-68. Doi: 10.1016/j.ejphar.2015.03.034

7 Bijlagen

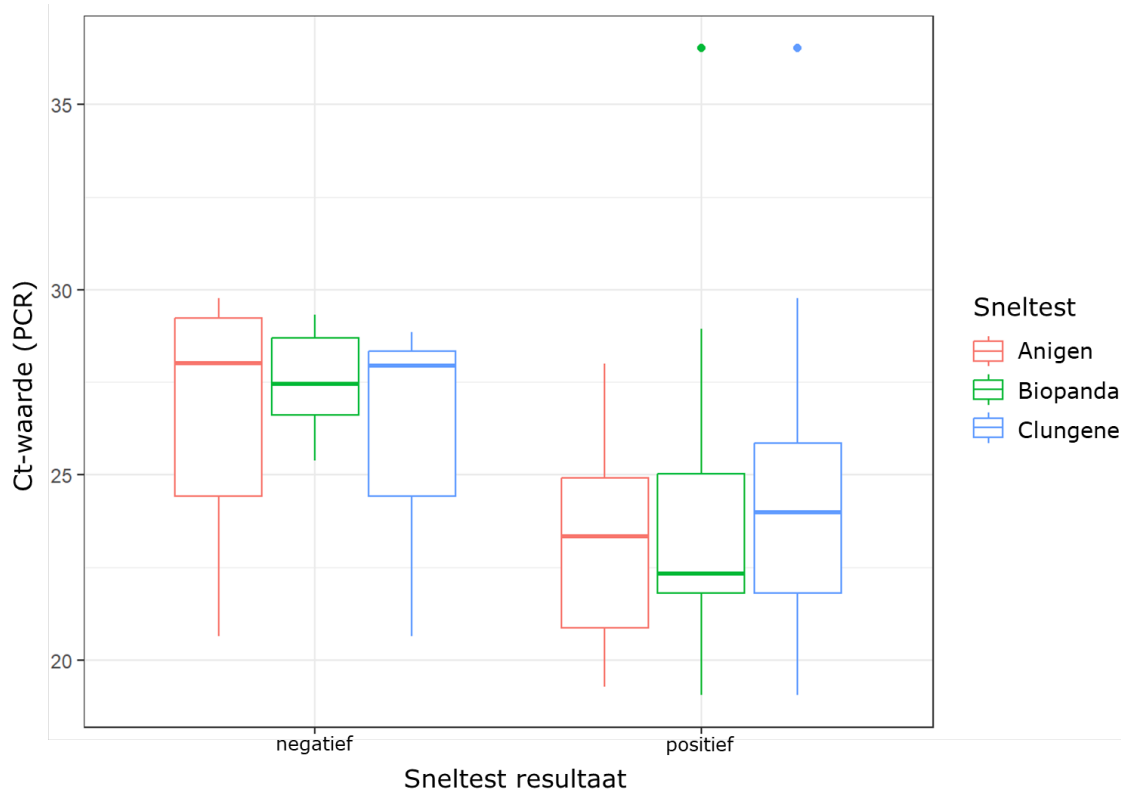
Bijlage 1. Ct-waarden van het infectie-experiment gegroepeerd per diersoort en swabtype.



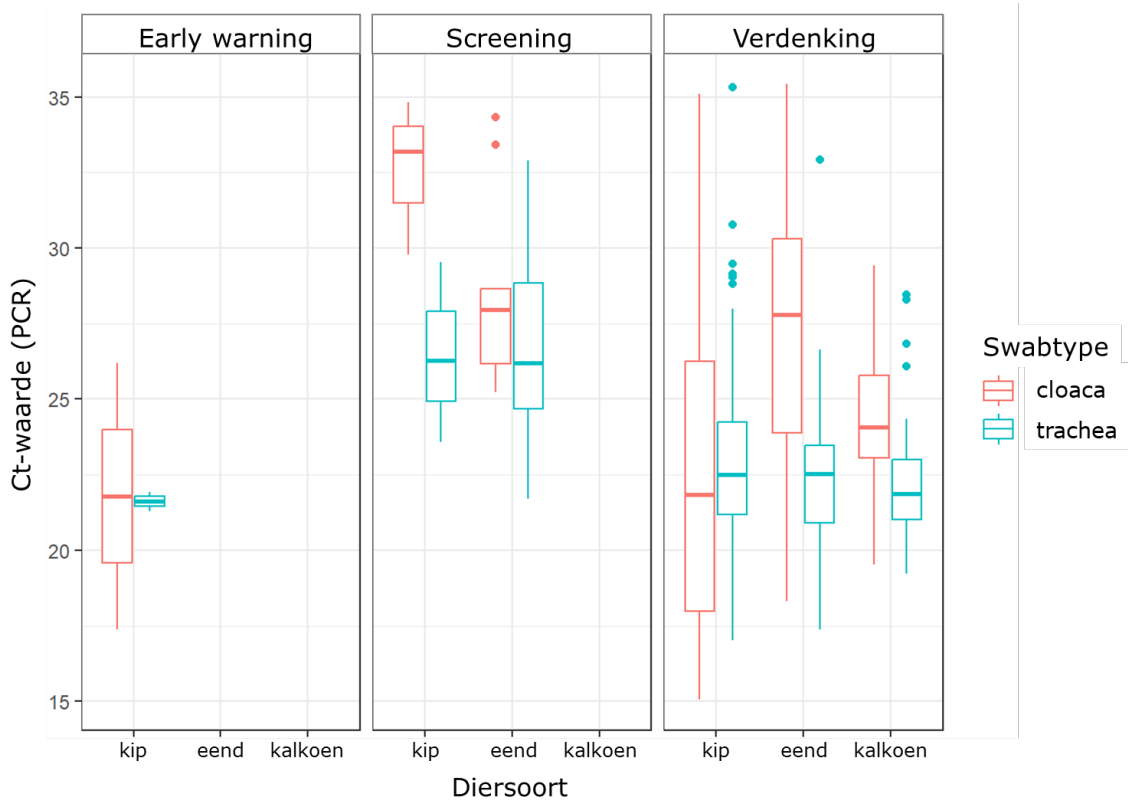
Bijlage 2. Ct-waarden van het infectie-experiment gegroepeerd per swabtype, diersoort, en sneltest.



Bijlage 3. Verdeling van Ct-waarden uit het infectie-experiment over de sneltestresultaten.



Bijlage 4. Ct-waarden van alle AI-positieve pools ($n=767$) in de periode van oktober 2021 - maart 2023 in Nederland. De gegevens zijn opgesplitst per diersoort, swabtype, en soort inzending (early warning ($n=6$), screening ($n=44$), verdenking ($n=717$)).



Wageningen Bioveterinary Research
P.O. Box 65
8200 AB Lelystad
The Netherlands
T +31 (0)320 23 82 38
info.bvr@wur.nl
www.wur.eu/bioveterinary-research

Wageningen Bioveterinary Research
Rapport 2334207

The mission of Wageningen University & Research is "To explore the potential of nature to improve the quality of life". Under the banner Wageningen University & Research, Wageningen University and the specialised research institutes of the Wageningen Research Foundation have joined forces in contributing to finding solutions to important questions in the domain of healthy food and living environment. With its roughly 30 branches, 5,000 employees and 12,000 students, Wageningen University & Research is one of the leading organisations in its domain. The unique Wageningen approach lies in its integrated approach to issues and the collaboration between different disciplines.