

## Rapport validatie mondspoeling

Studenten Hogeschool Utrecht:

5.1.2e

5.1.2e

UMC Utrecht:

5.1.2e

5.1.2e

5.1.2e

5.1.2e

5.1.2e

TNO:

5.1.2e

GGD regio Utrecht:

5.1.2e

5.1.2e

5.1.2e

5.1.2e

5.1.2e

5.1.2e

5.1.2e

5.1.2e

5.1.2e

5.1.2e

5.1.2e

5.1.2e

5.1.2e

5.1.2e

### Introductie

Er is een noodzaak voor het introduceren van nieuwe, niet-invasieve afname- en testmethoden voor het testen op SARS-CoV-2. Om de juiste inzet van deze nieuwe test- en afnamemethoden te kunnen bepalen, is het essentieel om de sensitiviteit en specificiteit van deze testen vast te stellen. Dit rapport beschrijft de resultaten van het validatie onderzoek naar de mondspoel/gorgelafname kit PhoenixDx (Procomcure, AU, via Pure Medical). Deze validatie is uitgevoerd binnen de innovatie teststraat, een initiatief van de afdeling Medische Microbiologie van het UMC Utrecht en de GGD Regio Utrecht, in samenwerking met TNO en Hogeschool Utrecht.

#### Onderzoeksvragen

Hoofdvraag:

Wat is de sensitiviteit en specificiteit van LAMP en PCR analyses bij afname door middel van mondspoeling of gorgelen ten opzichte van een keel/nasopharynxwat met PCR?

Deelvragen:

- Is er een verschil tussen de afnamemethodes (spoelen/gorgelen, begeleide afname/ zelfafname) in de virale load zoals bepaald met PCR?
- Wat is het effect van niet goed spoelen/ gorgelen?
- Hoe beoordelen mensen de zelfafname?
- Wat is het effect van het bewaren van monsters bij kamertemperatuur op het resultaat?

### Methode

#### Inclusie:

- Individuen vanaf de leeftijd van 16 jaar die in de periode 5-11 januari getest zijn op SARS-CoV-2 in de innovatieteststraat van het UMCU / GGDrU en toestemming gaven voor deelname
- Individuen vanaf de leeftijd van 12 jaar die in de periode van 8 februari tot 19 maart getest zijn op SARS-CoV-2 in innovatie teststraat Sporthal de Toekomst in Bunschoten, in het kader van de pilot grootschalig testen, en toestemming gaven voor deelname

#### Afname en testprocedure:

- Gelijktijdige afname van keel/nasopharynxwat en mondspoeling.
- De mondspoeling is op afwisselende dagen afgenomen door middel van 10 seconden krachtig spoelen, of 10 seconden gorgelen. In de gebruiksaanwijzing vanuit de fabrikant was optioneel om tweemaal te kuchen voor afname. Dit is in deze validatie niet toegepast vanuit oogpunt van infectiepreventie.
- Referentietest is PCR (Seegene, allplex, 3 targets) op keel/ nasopharynxwat

- Op basis van de resultaten van de referentietest werd een selectie van mondspoelingen getest middels PCR (Seegene, allplex) en LAMP:
  - Alle mondspoelingen van individuen die positief getest zijn in referentietest
  - Steekproef van individuen die negatief getest zijn in referentietest

#### Lage kwaliteit afname

Bij kinderen in de leeftijd van 6-12 jaar is geen validatiedata verzameld. Het mogelijke risico van afname bij kinderen zou kunnen zijn dat ze het water onvoldoende bewegen door de mond. Om het effect van een lage kwaliteit afname te beoordelen, is gedurende een afnameperiode van drie dagen deelnemers >12 jaar gevraagd het water 10 seconden zonder beweging in de mond te houden en niet te spoelen of te gorgelen. Deze samples werden alleen in een subanalyse meegenomen.

#### Zelfafname

Vanaf 8 maart hebben mensen de afname geheel zelfstandig gedaan. Na afname van de referentietest kregen deelnemers een mondspoelkit met gebruiksaanwijzing. In een daarvoor ingerichte ruimte op locatie konden deelnemers zelf de mondspoelkit afnemen, en na afloop een enquête invullen. De resultaten van deze enquête werden geanalyseerd. De afnameruimte werd door personeel van de teststraat na elke zelfafname gedesinfecteerd.

#### Bewaarcondities

Een selectie van 22 positieve samples is op dag van afname, circa een week en circa twee weken na afname getest middels PCR om het effect van bewaren bij kamertemperatuur op het resultaat te kunnen beoordelen.

## Resultaten

In totaal hebben ruim 3000 individuen deelgenomen aan de validatiestudie.

Voor de analyse van sensitiviteit en specificiteit zijn de mondspoelsamples van alle individuen met een positieve referentietest (n=254) en een steekproef van 522 individuen met een negatieve referentietest geïnccludeerd. Iets meer dan de helft van deze individuen had klachten of was in contact geweest met een positief getest individu (tabel 1).

<b>Tabel 1. Klachten en contacten</b>	<b>Totaal</b>
<b>n</b>	<b>776</b>
Klachten, n (%)	439 (56.6)
Aantal dagen klachten, mediaan (IQR)	3 (1-5)
<hr/>	
Type klachten, n (%)	
<i>Koorts</i>	39 (5.0)
<i>Koude rillingen</i>	26 (3.4)
<i>Benauwdheid</i>	35 (4.5)
<i>Algehele malaise</i>	36 (4.6)
<i>Verkouden</i>	219 (28.2)
<i>Hoesten</i>	124 (16.0)
<i>Loopneus</i>	108 (13.9)
<i>Keelpijn</i>	143 (18.4)
<i>Verminderde reuk/smaak</i>	28 (3.6)
<i>Hoofdpijn</i>	90 (11.6)
<hr/>	
Contact met bewezen positief individu, n (%)	359 (46.3)
Aantal dagen sinds contact, mediaan (IQR)	4 [0-5]

PCR resultaten

De PCR data van de mondspoeling zijn beschikbaar voor 775/776 samples (1 invalid).

		PCR keel/nasopharynxwat (referentietest)			
		Positief (Ct<32)	Positief (Ct 32–35)	Positief (Ct > 35)	Negatief
<b>PCR mondspoeling</b>	Positief (Ct<32)	146	9	4	0
	Positief (Ct≥32)	19	7	12	2
	Negatief	5	3	49	519

Sensitiviteit samples met Ct waarde < 32: 97.06% (95% CI: 93.3 – 99.0)

Sensitiviteit samples met Ct waarde <35: 95.77% (95% CI: 91.8 – 98.2)

Sensitiviteit overall: 77.56% (95% CI: 71.9 – 82.5)

Specificiteit: 99.62% (95% CI: 98.62 – 100)

LAMP resultaten

De LAMP data van de mondspoeling zijn beschikbaar voor 773/776 samples (3 invalid).

		PCR keel/nasopharynxwat (referentietest)			
		Positief (Ct<32)	Positief (Ct 32–35)	Positief (Ct > 35)	Negatief
<b>LAMP mondspoeling</b>	Positief	166	14	13	1
	Negatief	4	5	52	518

Sensitiviteit samples met Ct waarde < 32: 97.65% (95% CI: 94.1 – 99.4)

Sensitiviteit samples met Ct waarde <35: 95.24% (95% CI: 91.2 – 97.8)

Sensitiviteit overall: 75.98% (95% CI: 70.3 – 81.1)

Specificiteit: 99.81% (95% CI: 98.9 – 100)

Fase van de infectie

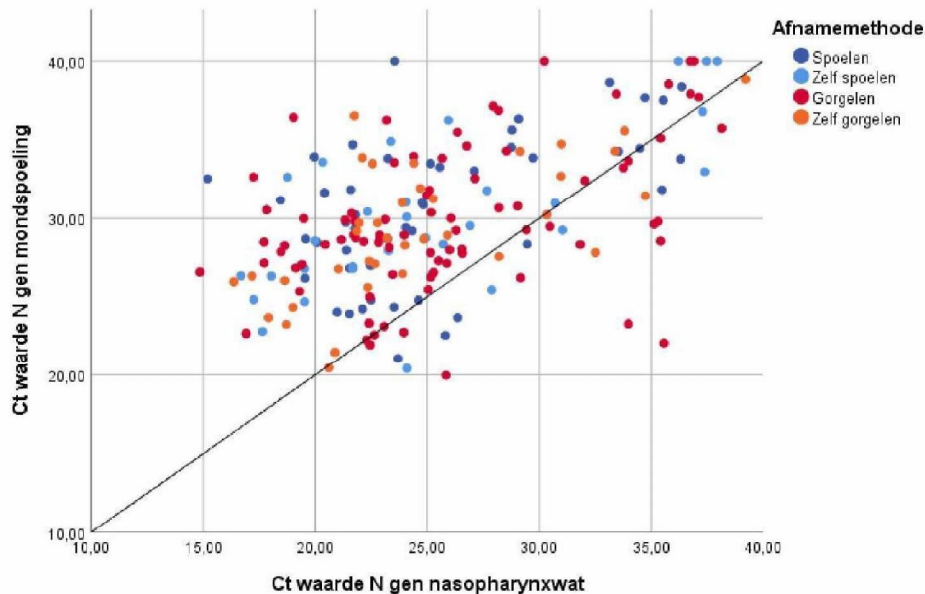
Individen met een positieve referentietest met een Ct waarde > 32 bleken bij afname via de mondspoeling niet altijd positief. Voor alle individuen met een Ct waarde > 32 in de referentietest (n=84) is bekeken in welke fase van de infectie zij zich bevinden.

- Vroege fase: een vervolgtest binnen 2 weken na deze afname heeft een significant hogere virale load (lagere Ct waarde)
- Late fase: een hertest binnen 3 dagen na deze afname is negatief, of er is een gedocumenteerde positieve test in de afgelopen 8 weken
- Niet te duiden: aan geen van bovenstaande criteria werd voldaan

Mondspoeling	Vroege fase	Late fase	Niet te duiden
PCR positief	6	11	15
PCR negatief	1	33	18
LAMP positief	6	5	13
LAMP negatief	1	39	20

Van de individuen die in de mondspoeling negatief waren met PCR/ LAMP bevond het merendeel zich in de late fase van de infectie. Alhoewel het aantal individuen met een bewezen vroege infectie laag is (n=7), werden 6/7 gedetecteerd met PCR en LAMP op de mondspoeling ondanks de lage virale load in de referentietest (PCR van de keel/nasopharynxwat).

#### Verskil in afnamemethode



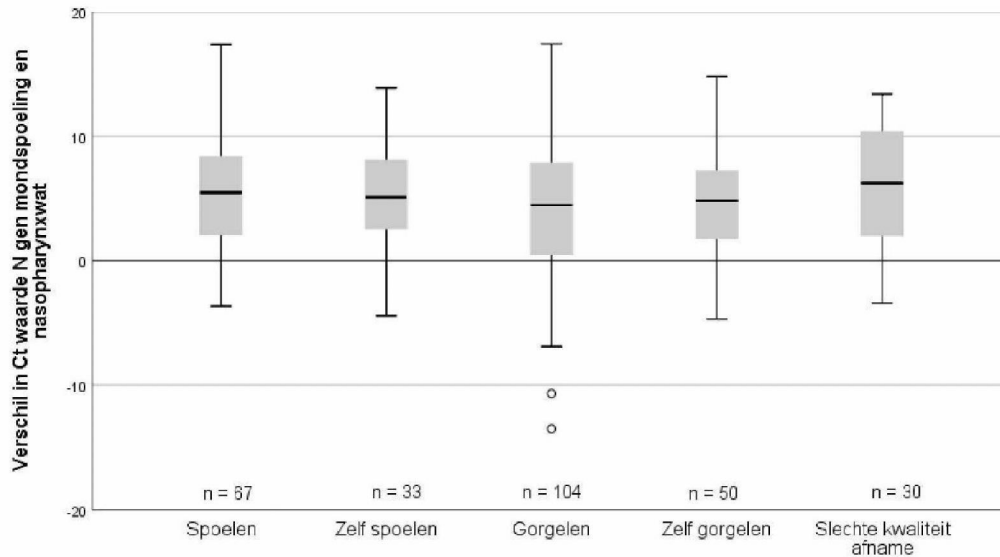
**Figuur 1. Ct waarden in keel/nasopharynxwat versus mondspoeling.**

Er is geen verschil aangetoond tussen de verschillende afnamemethoden (spoelen of gorgelen) en tussen begeleide afname of zelfafname (figuur 1 en 2). Vergeleken met de keel/nasopharynxwat liggen de Ct waarden voor alle mondspoel afnamemethoden over het algemeen hoger. Dit zou verklaard kunnen worden doordat er een ander compartiment bemonsterd wordt. Echter mogelijk speelt hier ook verdunning bij afname (2 ml water) en/of bij verwerking (1:1 verdunning mondspoeling in lysisbuffer) een rol.

#### *Lage kwaliteit afname*

Van 70 individuen die bij afname geïnstrueerd zijn niet te spoelen of gorgelen, om een afname van lage kwaliteit na te bootsen, is de mondspoeling getest met PCR en LAMP (= lage kwaliteit afname).

Hiervan waren 30/70 positief in de referentietest. Middels LAMP werden 23/30 positief getest in de mondspoeling. Middels PCR werden 25/30 positief getest in de mondspoeling. Het verschil in Ct waarde tussen PCR op mondspoeling en keel/nasopharynxwat is voor de diverse afnamemethoden (inclusief de lage kwaliteit afname; figuur 2) niet significant verschillend ( $p$  0.3).



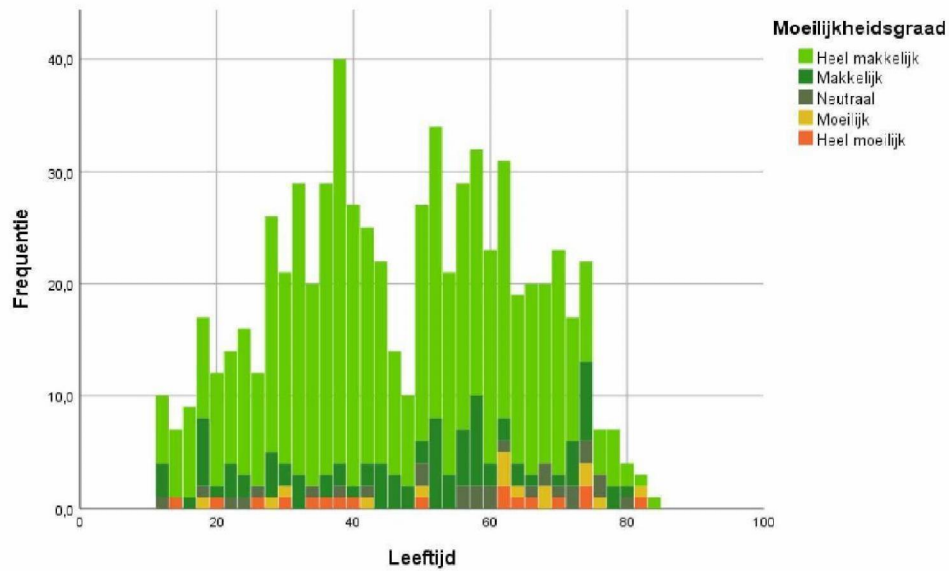
**Figuur 2. Verschil in Ct waarde tussen mondspoeling en keel/nasopharynxwat, weergegeven voor de verschillende afnamemethoden.**

Op basis van de afgenomen vragenlijst is gekeken naar de effecten van het eten (incl. kauwgom), drinken, roken, tanden poetsen of gebruik mondwater in het uur voorafgaand aan afname met de uitkomst van de mondspoeling. Er kon geen relatie hiervan worden aangetoond met het verschil in gevonden Ct waarden tussen keel/nasopharynxwat en mondspoeling.

#### Beoordeling zelfafname

714 individuen hebben deelgenomen aan de validatie van zelfafname van de mondspoelkit en na afloop een enquête ingevuld.

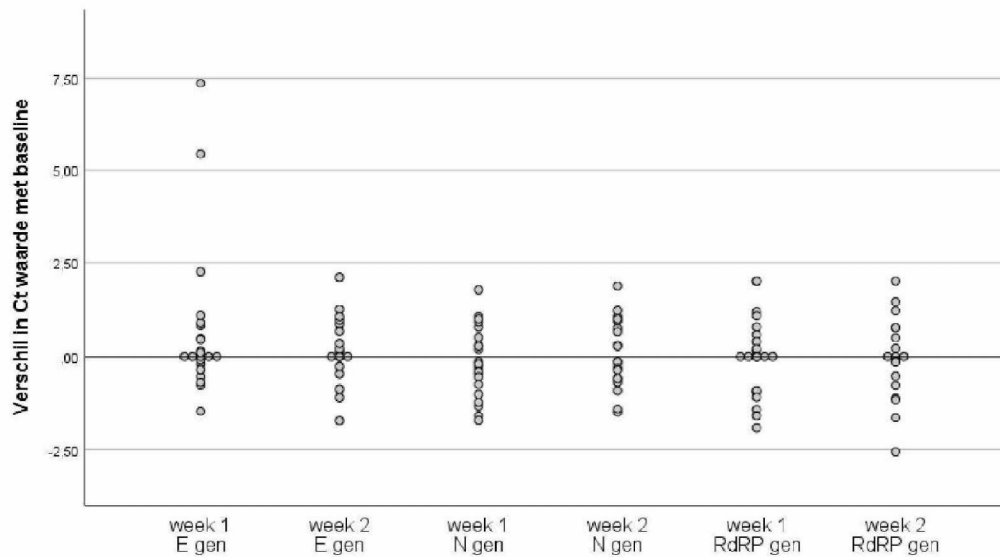
- Moeilijkheidsgraad: Over alle leeftijdsgroepen werd de test als (heel) makkelijk bevonden (figuur 3). Minder dan 5% van de deelnemers gaf aan de afname moeilijk te vinden. Hierbij was geen verschil tussen deelnemers die deze test voor het eerst deden, of deelnemers die de test al eerder in de teststraat hadden gedaan of gezien.
- 93.1% gaf aan zeker te weten de test goed te hebben afgenomen.
- 94.4% vond de gebruiksaanwijzing duidelijk.
- 94.8% gaf aan deze test thuis te gebruiken als dat zou kunnen. Dit betreft wel deelnemers die nu ook bereid zijn om naar de teststraat te komen.
- Belangrijkste suggesties ter verbetering:
  - o verschillende kleuren dopjes op de buis met water en de opvangbuis om deze beter te kunnen onderscheiden
  - o visueel stappenplan / instructiefilmpje
  - o plaatsen van de trechter op de opvangbuis gaat moeizaam



**Figuur 3. Moeilijkheidsgraad van de zelfafname van mondspoelkit per leeftijd.**

#### Bewaarcondities

Figuur 4 toont de variatie in Ct waarde bij testen na 1 en 2 weken bewaren bij kamertemperatuur, ten opzichte van het resultaat verkregen op dag van afname, voor de drie targets van de PCR. Er is geen significante verandering in Ct waarde aantoonbaar. Er zijn drie samples die van positief (met Ct waarden >38) naar negatief zijn gegaan; dit is echter te verwachten variatie bij hertesten van materiaal dat positief is rond de detectielimiet van de assay.



**Figuur 4. Verschil in Ct waarde met dag van afname**

## Conclusies

1. De mondspoelkit is zeer makkelijk in gebruik. Vanaf de leeftijd van 12 jaar goed zelf af te nemen. Op basis van gebruik van de mondspoelkit in deze pilot bij kinderen in leeftijd 6-12 jaar blijkt deze test bij deze leeftijdsgroep goed af te nemen met begeleiding. Een zeer hoog percentage van deelnemers geeft aan deze test thuis te zullen gebruiken als dit mogelijk zou zijn.
2. Zeer hoge sensitiviteit (PCR > 95%, LAMP >92%) bij individuen met hogere hoeveelheden viraal RNA (Ct waarde <35) in keel/nasopharynxwat.
3. Sensitiviteit daalt bij individuen met zeer lage hoeveelheden viraal RNA in keel/nasopharynxwat (Ct waarde >35). Daarbij dient te worden opgemerkt dat het grootste deel van deze gemiste infecties zich in de late fase van de infectie bevonden (gedefinieerd als een negatieve hertest binnen 3 dagen, of een eerder positieve test in de voorgaande 8 weken). In de huidige dataset werden 6/7 vroege infecties positief getest in mondspoeling met zowel LAMP als PCR.
4. Specificiteit vrijwel 100%.
5. De Ct waarden van PCR op mondspoeling liggen over het algemeen hoger dan de Ct waarden in keel/nasopharynxwat. Er is geen significant verschil tussen (zelf) spoelen en (zelf) gorgelen. Er is ook geen significant verschil met het niet goed spoelen of gorgelen; hiermee is een aparte validatie bij kinderen van 6-12 jaar niet noodzakelijk.

## Praktische overwegingen voor implementatie testmethode

1. Implementatie nieuwe afnamemethode in teststraat is voor bemonsteraars makkelijk; slechts korte scholing nodig.
2. Doorlooptijd van afname mondspoeling is naar verwachting niet langer dan bij afname keel/nasopharynxwat
3. Bij implementatie van zelfafname op locatie:
  - a. geen bemonsteraar nodig, echter wel personeel nodig ter assistentie en voor toezien op adequate desinfectie afnameloket
  - b. instructievideo of visuele afname instructie wenselijk
4. Bij verwerking in het laboratorium van mondspoeling nu extra stap nodig ten opzichte van verwerking nasopharynxwat, door het over te pipetteren naar buis met lysisbuffer. De noodzaak voor deze lysisbuffer wordt nog onderzocht door te evalueren in hoeverre de buffer in de opvangbuis het virus ook inactieveert (resultaten volgen). Indien deze stap voor virusinactivatie niet meer nodig zou zijn, zouden laboratoria het verwerkingsproces kunnen optimaliseren voor high through put.
5. Materiaal kan worden bewaard bij kamertemperatuur tot 2 weken na afname zonder effect op het PCR resultaat.