

Verslag validatie TMA SARS-CoV2 op speeksel

5.1.2e 5.1.2e), 5.1.2e
5.1.2e, 5.1.2e.

Streeklaboratorium, GGD Amsterdam

December 2020 – januari 2021

Achtergrond

De wens bestaat om op het Streeklaboratorium (SLA) de TMA op SARS-CoV2 ook op speeksel uit te kunnen voeren, omdat momenteel regelmatig kinderen <12 jaar worden getest in het kader van bron- en contactonderzoek. Speeksel testen wordt niet als reguliere test aanbevolen vanwege wisselende resultaten in de literatuur, maar is wel landelijk geaccepteerd als test voor kinderen <6 jaar. Zie ook 5.1.5

Het is vanuit logistiek oogpunt wenselijk om parallel hieraan deze validatie ook bij InBiome en OLVG Lab BV uit te voeren, omdat de monsterstromen vanuit de Amsterdamse GGD Teststraten verdeeld worden onder diverse laboratoria (waaronder deze twee). Gezien de eerder genoemde wisselende resultaten is het uitvoeren van de validatie op meerdere platforms wenselijk: dit geeft een grotere kans dat minimaal een van de validaties aan de criteria voldoet.

Het RIVM heeft eerder dit jaar verschillende speeksel- afnamemethoden getest en een combinatie van een Oracol S10-sponsje op stok (Malmed UK) met een Zeesan-trechter met verzamelbuis voor de verwerking in het lab (Zeesan, Xiamen, China, custom order) als relatief goede en veilige manier van werken bevonden. (rapport *Brief summary of using oral fluid specimens for detection of SARS-CoV-2 infection in cases suspect for COVID-19*, Update 25 May 2020, 5.1.2e et al.) In dit project is op SARS-CoV2 getest met behulp van Roche COBAS4800 en Roche MagNApure extractie gevolgd door in-house E-gen en RdRP-gen rtPCR volgens Corman et al. op een LC480 II. Over de combinatie van dit speeksel-afnamesysteem en Panther TMA is geen literatuur bekend.

Doel

Valideren van speekseltest op Panther TMA en de door InBiome en OLVG gebruikte SARS-CoV2 TMA/PCR om deze in gebruik te kunnen nemen voor kinderen <6 jaar die in de GGD teststraten worden getest in het kader van bron- en contactonderzoek (BCO).

Nagaan of deze afnamemethode een (veel) prettiger en mogelijk ook gemakkelijker onderzoek voor deze kinderen oplevert.

Sensitiviteit en specificiteit: achtergrond

Speeksel heeft in de literatuur een sensitiviteit van $\geq 84\%$ ten opzichte van nasofarynx [bron: UpToDate, met 9 referenties; wisselende populaties en afnamemethodes]

RIVM, *Brief summary of using oral fluid specimens for detection of SARS-CoV-2 infection in cases suspect for COVID-19*: Speeksel lijkt hogere Ct waardes op te leveren dan nasofarynx of keel

- N=9 met negatieve PCR in nasofarynx/ keel > 100% negatief in speeksel

- N=15 volwassenen met positieve PCR in nasofarynx/keel: 14 zelfde uitslag in speeksel, wat hogere Ct waarden; 1 volwassene met lage load negatief in speeksel (namelijk maar 1 van neus of keel positief)
- N=21 kinderen met positieve PCR in nasofarynx/keel: totaal 62% (13/21) ook positief in speeksel, meeste met hogere Ct waarde dan nasofarynx en keel. Echter hieronder 6 met lage load (namelijk maar 1 van neus of keel positief), waarvan 5 negatief. Daarnaast nog 3 kinderen met Ct waarde 29 of hoger in nasofarynx en keel met negatieve speekseltest.

Tot slot de overweging, dat voor antigeentesten nu een sensitiviteit van $\geq 80\%$ wordt geaccepteerd. Voor kinderen tot 6 jaar lijkt de afweging tussen comfort bij het afnemen van de test in het kader van BCO en benodigde sensitiviteit ook een wat lagere sensitiviteit te rechtvaardigen en lijkt 80% ook redelijk.

Acceptatiecriteria

- Sensitiviteit ten opzichte van huidige TMA/ PCR SARS-CoV2 test: $\geq 80\%$
- Specificiteit ten opzichte van huidige TMA/ PCR SARS-CoV2 test: $\geq 98\%$
- Aandeel 'Invalid' testuitslagen: $< 2\%$

Opzet

1. Eerst trainen afnamemedewerkers d.m.v. een "oefenrondje": met bijv. water de swab en trechter uitproberen (n= 1 a 2 voor 5-10 medewerkers). Voor analisten op het lab ook een aantal voorbeelden om evt mee te oefenen.
2. In GGD teststraat (RAI of Zuid-Oost) dubbele afname (keel-neusswab in UTM plus speeksel met behulp van Oracol swab) bij volwassen testpersonen die zich voor het onderzoek aanmelden
 - Keel-neusswab voor reguliere SARS-CoV2 diagnostiek, uitslag naar CoronIT
 - Speeksel: zie afname protocol RIVM hieronder in **Bijlage 1**
3. TMA of PCR (of LAMP, afhankelijk van de operationaliteit daarvan ten tijde van deze validatie) op beide materialen op de volgens het betreffende laboratorium gebruikelijke wijze

Bij een geschat percentage positieve testen van 10% in januari leveren 200 dubbele afnames ongeveer 20 positieve en 180 negatieve TMA resultaten op. In bijlage 2 levert volgens een calculator 5.1.5 100 extra monsters geen grote winst qua confidence interval van de sensitiviteit. We kiezen daarom voor 200 dubbele afnames per laboratorium

Gezien de medisch ethische overwegingen kiezen we ervoor deze validatie uit te voeren in volwassen personen, maar de resultaten te extrapoleren naar kinderen

Uitvoering

Start 11-1 in teststraat Zuid-Oost. Gezien resultaten (zie verderop) besloten de validatie voortijdig te beëindigen na 5 dagen, en dus nooit toegekomen aan validatie voor InBiome.

Aandachtspunten:

- Hoewel het niet de intentie is om speekselproductie aan te wakkeren, is om de benodigde hoeveelheid speeksel überhaupt te verkrijgen ervoor gekozen om mensen posters met eten te laten zien. Zowel testafnemers als proefpersonen vonden dit prettiger werken.
- In de patiëntinformatie werd obv de informatie van RIVM/ LCI gesproken over 1 minuut durende speekselafname: hier vielen veel proefpersonen over, waarop er gecorrigeerde proefpersooninformatie is verstrekt.
- Ook is gekozen om mensen die het afgelopen half uur hun tanden hadden gepoetst of gerookt te excluderen, maar niet degenen die nog hadden gegeten of gedronken (zoals geadviseerd vanuit RIVM/ LCI). Dit met het oog op de situatie zoals die bij kinderen zou zijn.
- Bij het trainen van de testafnemers hebben zij de materialen eerst op zichzelf uitgeprobeerd, om er enige feeling mee te krijgen.
- Omdat de onprettige afname van de neusswab via adrenaline mogelijk leidt tot verminderde speekselproductie, werd éérs speeksel en daarna de reguliere swab afgenomen.
- De instructies voor de testafnemers zoals ze daadwerkelijk gebruikt zijn, zijn gewijzigd ten opzichte van de versie in het validatieplan (na zelf uitproberen door **5.1.2e** en **5.1.2e** wat andere inzichten ten opzichte van instructies door RIVM/ LCI)
 - o Trechter in rekje zetten werkt niet: je moet 'm in je handen houden want anders zie je niet wat je doet
 - o Standaard schoonmaken werkplek na speeksel afname
 - o Afname speeksel duurt niet één maar meerdere minuten
 - o Sponsje moet zichtbaar donkerder blauw worden: pas dan neemt het echt vocht op
 - o Niet alleen in de wang maar ook onder de tong houden
- Er werd door testafnemers gesuggereerd om mensen een slokje water te laten drinken: we hebben gekozen om dat niet te doen met het oog op verdunning van eventueel aanwezig virus RNA.

Resultaten

A) Teststraat

Onderstaande info is samengesteld op basis van 5 dagen communicatie met de afnemers en ^{5.1.2e} en op vrijdag is deze schriftelijke versie door ^{5.1.2e} met de aanwezige testers doorgenomen.

Tijd per afname:

- Speeksel afname kost minstens 5-10 minuten extra tijd. Ook uitleg geven, tussendoor een paar keer uitduwen in de trechter etc. kost tijd, naast het sabbelen zelf.
- Op maandag gestart met slechts 2 teststraten. Dinsdag waren 5 teststraten opengezet voor speekselafname, maar al snel ontstonden rijen voor de reguliere afnames, waarop het aantal straten weer is teruggeschroefd naar 2. Op woensdag waren 4 a 5 straten opengezet voor speekselvalidatie, maar gestopt in de "spits". Op donderdag en vrijdag zijn 3 straten gebruikt voor speekselvalidatie.
- Doel was ongeveer 100 dubbele afnames per dag, maar de praktijk betrof gemiddeld 18 inclusies per dag (range 11 – 25)

Succes afname:

- Bij ongeveer 1/3 van de proefpersonen lukte het niet om de 1mL te halen: zie ook onder "laboratorium". Aanvullend hadden maandag per abuis 2 personen in trechter gespuugd in plaats van afname met swab.
- Bij 7/90 (8%) proefpersonen lukte het helemaal niet om speeksel af te nemen.

Ervaringen betrokkenen:

- Proefpersonen worden snel ongeduldig en geïrriteerd, na ongeveer 5 minuten vinden ze het wel mooi geweest.
- Afnemers vinden de test onhandig (speeksel in buisjes krijgen is lastig, vaak alleen schuim) en te lang duren.
- Afnemers zien deze afnamemethode NIET als een goede oplossing voor kinderen want er is heel veel geduld nodig.

B) Laboratorium

Totaal aantal ontvangen keel/neusswabs (= aantal geïncludeerde personen): **90**

Totaal aantal ontvangen speekselmonsters: **83**

(alle lab gegevens zijn in de Excel bijlage te zien)

- Waarvan verdund met PBS ingezet wegens <500 uL speeksel: 27 (32%); Hiervan bevatten twee monsters vrijwel geen speeksel. Ook was er op maandag per abuis tweemaal door een testpersoon in het trechttertje gespuugd, toen speeksel verzamelen met de spons niet lukte.
- Waarvan 8x bij eerste poging resultaat "invalid RDFS": teveel luchtballen bovenop het sample. Vier hiervan op maandag, vier op dinsdag. In alle gevallen bij tweede poging negatieve uitslag waarbij de keel/neus swab ook negatief was

Vergelijking monsters waarvan zowel speeksel als neus/keel afgenomen:

	Neus/keel swab positief	Neus/keel swab negatief	Totaal
Speeksel positief	11	0	11
Speeksel negatief	1 *	71	72
Totaal	12	71	83

* Panther TMA resultaten: neus/keel 1152 RLU, speeksel 523 RLU

- Sensitiviteit speeksel t.o.v. neus/keeluitstrijk: 91.7% [95% CI 59.8 – 99.6 %]
- Specificiteit speeksel t.o.v. neus/keeluitstrijk: 100% [95% CI 93.6 – 100%]
- Aandeel "invalid" testuitslagen: 1.2%

Berekening confidence intervals: zie bijlage 3

RT-qPCR uitslagen van monsters die positief getest waren:

Aanvullend is van alle monsters die positief getest (n=12) waren zowel de swab als het speeksel middels RT-qPCR getest, om een vergelijking op basis van Ct waarden te kunnen maken. Van de 12 speekselmonsters waren er 7 verdund met PBS. De neus/keelmonsters hadden gemiddeld een Ct waarde van 20 [range 14-26] in de E-gen PCR en gemiddeld een Ct waarde van 16 [range 10-22] in de N-gen PCR.

- E-gen: alle speekselmonsters hadden een hogere Ct waarde dan de neus/keelmonsters: gemiddeld 10 Ct waarden verschil [range 3 – 23]
 - De 5 speekselmonsters die niet verdund waren met PBS: gemiddeld 10 Ct waarden verschil [range 6-17]
- N-gen: alle speekselmonsters hadden een hogere Ct waarde dan de neus/keelmonsters: gemiddeld 10 Ct waarden verschil [range 3 – 20]
 - Voor alleen de 5 speekselmonsters die niet verdund waren met PBS: gemiddeld 10 Ct waarden verschil [range 6-18]

Discussie/ Conclusies

De laboratoriumaspecten van de speekselafname voldoen aan de gestelde acceptatiecriteria. Ondanks de kleinere aantallen door het vroegtijdig staken van de validatie verschillen de confidence intervals voor de sensitiviteit en specificiteit nauwelijks van de vooraf ingeschatte getallen (ondergrens sensitiviteit CI 60% in huidige validatie versus geschatte 61% bij 200 monsters). De resultaten van de RT-qPCR laten echter wel degelijk een sterk verminderde sensitiviteit van speekselmonsters ten opzichte van neus/keelwabs zien, met gemiddeld 10 Ct waarden (is > factor 1000) verschil ten nadele van speeksel. Dit zou ten dele kunnen liggen aan het feit dat veel speeksel verdund moesten worden wegens te weinig materiaal, maar de monsters die *niet* verdund waren laten in deze validatie vergelijkbare resultaten zien. Onze validatieset bevat geen monsters met een lage virusload in de neus/keelwab (hoogst gemeten Ct waarde 26 in E-gen PCR), wat waarschijnlijk zou hebben geleid tot meer discrepante resultaten.

In de acceptatiecriteria hadden we geen specifieke punten voor de teststraat opgenomen, maar een werkbare afnamemethode is uiteraard een voorwaarde om deze in te kunnen voeren. Uit de resultaten onder "teststraat" blijkt duidelijk dat dit geen efficiënte methode is om routinematig afname materiaal voor SARS-CoV2 testen te verzamelen in de teststraat.

Te overwegen valt om speeksel toch in te zetten in bijzondere gevallen, maar dit vergt de nodige aandacht voor randzaken zoals GLIMS inrichting, training van testafnemers op diverse teststraten, beschikbaarheid van afnamesetjes, correcte aanmelding via CoronIT dus de vraag is of dit de moeite waard is.

Alternatief plan zou kunnen zijn om andere afnamemethoden te valideren om in te zetten in kinderen, zoals de "midturbinate" swab die minder diep de nasofarynx in gaat of "rondborstelen" over wangen en tandvlees met een reguliere swab.

Bijlage 1: Instructies afname speeksel validatiestudie

Teststraat GGD Amsterdam, januari- februari 2021

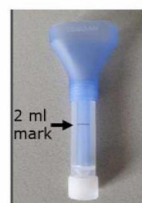
LET OP: volg NIET de instructies van de bijsluiter bij de materialen, maar deze

Afhankelijk van hoe de speekselafname verloopt: eerst het speeksel, dan pas de neusswab (vervelend gevoel > adrenaline > minder speeksel?)

1. Neem de trechter met buisje uit de verpakking

2. Haal het witte dopje van de onderkant en zet de trechter met buisje in een rekje.

3. Neem de spons uit de verpakking en steek tussen de wang en de tanden of onder de tong. Houd hem daar minstens een paar minuten met heen en weer bewegen. Het sponsje moet goed nat worden voordat het echt speeksel opneemt!! Je ziet dat het dan donkerder blauw wordt. Vraag de persoon eventueel om een beetje met de tong te wibelen of aan lekker eten te denken om meer speeksel te krijgen.



4. Pers het speeksel uit de spons in de trechter met een draaiende beweging: stevig tegen de wand duwen! Maar let op dat je niet knoeit



5. Herhaal eventueel tot ongeveer 2 mL (maatstreepje) speeksel is opgevangen. Minimum is 1 mL.

6. Gooi de spons weg als besmet afval.

7. Draai de trechter van de buis en gooi die weg als besmet afval.

8. Sluit de buis goed af met de witte dop

9. Plak de tweede sticker op het doorzichtige buisje, met de barcode in de lengte

10. Na deze handelingen het werkblad desinfecteren



Bijlage 2: effect groepsgrootte op confidence interval van sensitiviteit (volgens vassarstats.net)

Getallen bij aannames n=200, sensitiviteit is 85%, specificiteit 99%

Niet beveiligd | vassarstats.net/clin1.html

	Condition		Totals
	Absent	Present	
Test Positive	1	17	18
Test Negative	179	3	182
Totals	180	20	200

Calculate

Reset

	Estimated Value	95% Confidence Interval	
		Lower Limit	Upper Limit
Prevalence	0.1	0.063663	0.152297
Sensitivity	0.85	0.611375	0.960434
Specificity	0.994444	0.964713	0.99971
For any particular test result, the probability that it will be:			
Positive	0.09	0.055712	0.140688
Negative	0.91	0.859312	0.944288
For any particular positive test result, the probability that it is:			
True Positive (Positive Predictive Value)	0.944444	0.706251	0.997093
False Positive	0.055556	0.002907	0.293749
For any particular negative test result, the probability that it is:			
True Negative (Negative Predictive Value)	0.983516	0.948727	0.995733
False Negative	0.016484	0.004267	0.051273
Likelihood Ratios: [C] = conventional [W] = weighted by prevalence [definitions]			
Positive [C]	153	21.483345	1089.634784
Negative [C]	0.150838	0.053137	0.428177
Positive [W]	17	2.522327	114.57672
Negative [W]	0.01676	0.005455	0.05149
The entry 'NaN' in any of the above cells means that the calculation cannot be performed because the values entered include one or more instances of zero. Technical note on calculation of confidence intervals.			

Bij n=300 geen grote verbetering in confidence interval van sensitiviteit

⚠ Niet beveiligd | vassarstats.net/clin1.html

	Condition		Totals
	Absent	Present	
Test Positive	2	25	27
Test Negative	268	5	273
Totals	270	30	300

Calculate

Reset

	Estimated Value	95% Confidence Interval	
		Lower Limit	Upper Limit
Prevalence	0.1	0.069548	0.141055
Sensitivity	0.833333	0.64549	0.936964
Specificity	0.992593	0.970587	0.998716

For any particular test result, the probability that it will be:

Positive	0.09	0.061208	0.129683
Negative	0.91	0.870317	0.938792

For any particular positive test result, the probability that it is:

True Positive (Positive Predictive Value)	0.925926	0.74247	0.987065
False Positive	0.074074	0.012935	0.25753

For any particular negative test result, the probability that it is:

True Negative (Negative Predictive Value)	0.981685	0.955355	0.993238
False Negative	0.018315	0.006762	0.044645

Likelihood Ratios:

[C] = conventional

[W] = weighted by prevalence [definitions]

Positive [C]	112.5	28.020935	451.671225
Negative [C]	0.16791	0.075432	0.373768
Positive [W]	12.5	3.280133	47.635257
Negative [W]	0.018657	0.007827	0.044469

Bijlage 3: Confidence intervals resultaten validatie

t beveiligd | vassarstats.net

UpToDate EUCAST Swabid Hemat AMC AMC labgids K2 Kwadraet Protocolu

ite for Statistical Computation

	Condition		Totals
	Absent	Present	
Test Positive	0	11	11
Test Negative	71	1	72
Totals	71	12	83

	Estimated Value	95% Confidence Interval	
		Lower Limit	Upper Limit
Prevalence	0.144578	0.080143	0.242853
Sensitivity	0.916667	0.597539	0.995635
Specificity	1	0.936046	1
For any particular test result, the probability that it will be:			
Positive	0.13253	0.071187	0.228943
Negative	0.86747	0.771057	0.928813
For any particular positive test result, the probability that it is:			
True Positive (Positive Predictive Value)	1	0.678553	1
False Positive	0	0	0.321447
For any particular negative test result, the probability that it is:			
True Negative (Negative Predictive Value)	0.986111	0.914619	0.999275
False Negative	0.013889	0.000725	0.085381
likelihood Ratios:			
[C] = conventional [definitions]			
[W] = weighted by prevalence [definitions]			
Positive [C]	Infinity	NaN	Infinity
Negative [C]	0.083333	0.01276	0.544228
Positive [W]	Infinity	NaN	Infinity
Negative [W]	0.014085	0.002011	0.098668
The entry 'NaN' in any of the above cells means that the calculation cannot be performed because the values entered include one or more instances of zero. Technical note on calculation of confidence intervals.			