

Udarbejdet af	Lars Erik Larsen
Øvrige deltagere	Yuan Liang
Kontaktperson i FVST	Joey Ellis-Iversen, Sten Mortensen

Dato for henvendelse	Dato for svarfrist	Dato for afsendelse	Versionsnummer
08-02-2024	24-02-2024	26.2.2024	1

Journalnummer/sagsnummer	FVST	KU	SSI
	2024-14-81-27808	061-0383/24-3680	24/00891

## Besvarelse vedr.

### ▸ Vurdering af test effektivitet af FASTest AIV Ag test til detektion af HPAI

#### Bestilling

▸ Vi ønsker en beskrivelse af sensitivitet og specificitet af en østrigsk kviktest for detektion af H1-15 på svaberprøver fra nyligt døde fugle. Der ønskes yderligere positive og negative prædiktive værdier for disse tests, når de bruges på kliniske mistanker. Siden september 2020 har ca. 46% af kliniske mistanker, early warnings og slagterimistanker vist sig at være positive for HPAI. Hvis I har kendskab til andre kviktest, der eventuelt er mere pålidelige, må dette gerne inkluderes også.

#### Svar

##### Materialer og metoder

Undersøgelse af udbuddet af kommercielt tilgængelig RAT kits er blevet gennemført ved søgninger på internettet (Google og ChatGPT) og PubMed. Der kan dermed være kits tilgængeligt, som ikke er blevet identificeret. Der er endvidere modtaget supplerende materiale fra MEGACOR Diagnostik hvor pr. mail.

##### Generelle aspekter af hurtig tests til påvisning af højpatogen aviær influenza virus

Der findes adskillige hurtigetests/kviktests til påvisning af højpatogen aviær influenzavirus (HPAIV). Disse tests er typisk baseret på forskellige teknologier såsom antigendetektion, nukleinsyreamplifikation (PCR) eller immunfluorescens (IFA). Kvaliteten af kviktests evalueres typisk ved at bestemme testens sensitivitet (evnen til korrekt at identificere positive tilfælde) og specificitet (evnen til korrekt at identificere negative tilfælde). Nogle af de mest almindelige typer af tests inkluderer:

1. Hurtig antigendetektionstest (RAT'er): Disse tests detekterer specifikke antigener, der er til stede på overfladen af virus. Disse testser relativt hurtige og nemme at bruge, men kan have lavere følsomheden (sensitivitet) sammenlignet med molekyllære tests. De er generelt specifikke, men vil give et positivt signal overfor alle influenza A virus, også ikke H5/H7 virus
2. Nukleinsyreamplifikationstest (NAAT'er): Disse tests påviser virusets genetiske materiale gennem teknikker som PCR. De er meget sensitive og specifikke, men kan kræve specialudstyr og uddannet personale. Anvendes af stort set alle nationale referencelaboratorier og anbefales generelt for påvisning af influenza A virus.
3. Immunfluorescensassays (IFA'er): Disse tests bruger antistoffer mærket med fluorescerende farvestoffer til at påvise virale antigener. De kan give hurtige resultater, men kan kræve specialudstyr.

I det resterende dokument fokuseres udelukkende på antigendetektionstest (RAT'er).

## Beskrivelse af test kits for HPAIV antigen påvisning

Følgende testkits specifikke for aviær influenza virus er blevet identificeret:

- FASTest® AIV Ag (MEGACOR Diagnostik)  
<https://www.megacor.at/veterinary/product.html>
- Avian Influenza H5 Antigen Test Kit, AIV H5 Ag Test (Ringbio)  
<https://www.ringbio.com/products/poultry/avian-influenza-h5-antigen-test-kit>
- FluDETECT® Avian (Zoetis Animal Health)  
<https://www.zoetis.com/products/diagnostics/referencelab/fludetect-avian>

### *FASTest® AIV Ag (MEGACOR Diagnostik)*

I henhold til oplysninger på producentens hjemmeside er FASTest® AIV Ag en hurtig immunokromatografisk test til kvalitativ påvisning af aviær influenzavirus type A-antigen (undertype H1-H15) i podningsprøver fra kloak, luftrør, nyrer eller afføring fra fugle. Testen kan aflæses efter 20 minutter. Sensitiviteten og specificiteten angives begge at være 100 %, men det er ikke beskrevet hvorledes disse er estimeret. Firmaet har pr. mail fremsendt sammenligning nogle data der sammenligner testen med hæmagglutinations (HA) titre, hvor kittet så ud til have en bedre følsomhed, men kvaliteten af data er svært at vurdere. Testen kan ikke skelne mellem subtyper og patotyper. Producenten oplyser at kittet er godkendt af Friedrich-Loeffler Institut (FLI) i Tyskland (certifikat medsendt) og anvendes af mange laboratorier, men af det fremsendte materiale er det ikke helt klart hvad tilladelsen omfatter.

### *Avian Influenza H5 Antigen Test Kit, AIV H5 Ag Test (Ringbio)*

I henhold til oplysninger på producentens hjemmeside er Ringbio influenzavirusantigen testkit et sandwich lateral flow immunoassay til påvisning af NP-proteinet af influenza A virus i prøver fra fugle. Testen kan ikke skelne mellem sub- og patotyper. Producenten angiver på deres hjemmeside at sensitiviteten og specificiteten af testen er hhv. 81,90 % og 95,38 %, med en total overensstemmelse på 91,65 % sammenlignet med en valideret RT-PCR test. Dette var baseret på test fra 450 prøver. Endvidere anfører producenten resultater af test af ca. 50 influenza A virus stammer med et kendt indhold af virus. Baseret på disse resultater vurderes det at testen kan detektere prøver med et virusindhold på  $1 \times 10^{3.5}$  TCID50.

### *FluDETECT® Avian (Zoetis Animal Health)*

I henhold til oplysninger på producentens hjemmeside er FluDETECT™ Avian en *in vitro*, hurtig immunokromatografisk test designet til påvisning af influenza type A-virus i luftrørs- og kloakprøver fra symptomatiske fugle eller flokke. Denne analyse detekterer alle 16 undertyper af influenza type A-virus, men testen kan ikke adskille mellem influenza virus sub- og patotyper. Producenten angiver ikke testens sensitivitet eller specificitet.

Ud over test kits valideret til påvisning af influenza A virus hos fjerkræ er der en lang række kits på markedet til påvisning af influenza A og B virus i mennesker, som formodentligt også kan påvise influenza A virus hos fjerkræ. Eksempler på disse som har opnået godkendelse til anvendelse til påvisning af influenzavirus hos mennesker i USA og/eller Europa er BinaxNOW Influenza A & B Card (Abbott), Sofia Influenza A+B FIA (Quidel) og BD Veritor System for Rapid Detection of Flu A+B (Becton Dickinson).

## Diskussion

Brug af kviktests til påvisning af HPAIV i prøver fra fjerkræ har flere fordele, men der er også en række potentielle faldgruber. Kviktests giver resultater inden for en kort tidsramme, typisk fra et par minutter

til mindre end en time og kan laves i besætningen. Dette giver mulighed for hurtig identifikation af inficerede fugle og muliggør hurtig implementering af kontrolforanstaltninger.

Generelt har molekylære tests som PCR en tendens til at være mere sensitive og specifikke sammenlignet med antigenbaserede tests. Sensitivitet og specificitet kan variere mellem forskellige kits, og det vil også afhænge af forskellige faktorer som mængde af virus, der udskilles og kvaliteten af den indsamlede prøve. Nogle hurtige tests detekterer kun visse stammer eller subtyper af aviær influenzavirus, og vil derfor potentielt have nedsat følsomhed overfor andre cirkulerende stammer, inklusive nye varianter. Denne begrænsning understreger vigtigheden af at bruge tests valideret på et stort og varieret udvalg af influenza A virus. Kviktest kan udvise krydsreaktivitet mod andre patogener, hvilket kan medføre falsk-positive resultater og dermed nedsat specificitet. Selvom kviktests er designet til at være nemme at bruge, er korrekt uddannelse af personalet også afgørende for at sikre nøjagtige og pålidelige tests. Utilstrækkelig træning kan resultere i fejl i prøveindsamling, prøvehåndtering, test udførelse og resultatfortolkning.

Et af de omtalte testkits (*FASTest® AIV Ag (MEGACOR Diagnostik)*) angives at have en sensitivitet og specificitet på 100 %, uden at der redegøres nærmere for hvorledes disse værdier er beregnet. Et andet test kit (*Avian Influenza H5 Antigen Test Kit, AIV H5 Ag Test (Ringbio)*) angiver en sensitivitet og specificitet på hhv. 81,90 % og 95,38 %, beregnet ud fra test af 450 prøver. Det er meget usandsynligt, at en laboratorieanalyse kan være 100 % følsom og 100 % specifik. Selv de akkrediterede PCR-test der anbefales af de internationale referencelaboratorier for påvisning af aviær influenza angiver >99 % for begge parametre, og disse er velvaliderede med dokumenteret anvendelighed ved brug af en lang række prøvetyper. Til sammenligning fandt et studie foretaget i Ægypten at to kviktests havde en sensitivitet på 75-77 % og en specificitet på omkring 90 % sammenlignet med PCR-test<sup>1</sup>.

WOAH<sup>2</sup> anbefaler at resultater fra kviktests kun bør tolkes på flokbasis og ikke som en individuel fugletest. WOA anbefaler endvidere udelukkende at anvende orofaryngeale eller luftrørsprøver fra klinisk påvirkede eller døde fugle, og advarer om at testene fungerer mindre godt på prøver fra vandfugle og vilde fugle sammenlignet med kyllinger. På grund af lav følsomhed bør antigenetektion hovedsageligt bruges til feltscreening af kliniske tilfælde med høj dødelighed og både negative og positive resultatet **skal** bekræftes ved indsendelse til et godkendt nationalt referencelaboratorium. Tilsvarende anbefalinger er i 2022 publiceret af det britiske Animal and Plant Health Agency (APHA)<sup>3</sup>

### Konklusion og perspektiver

På baggrund af de oplysninger, der er offentligt tilgængelige, har det ikke været muligt at validere de angivne værdier på sensitivitet og specificitet (og dermed de prædikative værdier) for *FASTest® AIV Ag* kittet, men det vurderes ikke at være sandsynligt at de begge er 100 % som angivet af producenten. En nyere publikation og data fra et andet kit, *Avian Influenza H5 Antigen Test Kit (Ringbio)*, angav noget lavere tal for begge estimater.

For at kunne foretage en bedre vurdering af udvalgte test kits skal der indsamles mere omfattende valideringsdata fra producenterne. Alternativt kan DK-VET foretage uafhængige valideringstests.

<sup>1</sup> Soliman M, Selim A, Coward VJ, Hassan MK, Aly MM, Banks J, et al. Evaluation of two commercial lateral flow devices (LFDs) used for flockside testing of H5N1 highly-pathogenic avian influenza infections in backyard gallinaceous poultry in Egypt. *JMolGenetMed*. 2010;4(1747-0862 (Electronic)):247–51.

<sup>2</sup> OIE Terrestrial Manual 2021; chapter 1.5.1. Antigen detection

<sup>3</sup> APHA Briefing Note 47/22: Use of Influenza Antigen Tests for Detecting Avian Influenza. Date issued: 29 November 2022

