



## Toelichting op vraag van Haga aan Jaap van Dissel

Naar aanleiding van de update van de webpagina 'Aanvullende informatie diagnostiek COVID-19 Bijlage bij de LCI-richtlijn COVID-19 | Versie 25 september 2020' (<https://lci.rivm.nl/covid-19/bijlage/aanvullend>) zijn een aantal vragen gesteld. Updates van deze bijlage naar de huidige stand van ontwikkelingen en inzichten vinden regelmatig plaats.

RIVM

A. van Leeuwenhoeklaan 9  
3721 MA Bilthoven  
Postbus 1  
3720 BA Bilthoven  
www.rivm.nl

T 030 274 91 11  
info@rivm.nl

### Vraag: waarom is de afkapwaarde voor de Ct-waarde bij de PCR aangepast? RIVM 15 oktober 2020

Deze vraag refereert naar de volgende zinsnede in het document:

RdRP-gen-PCR SARS-CoV-2 door diverse laboratoria specifiek en vergelijkbaar gevoelig als de E-gen-PCR gemaakt. De amplificatiecurve dient goed te worden beoordeeld bij de hogere Ct-waardes (zeker bij een Ct van >35). Is de curve afwijkend, onbetrouwbaar of moeilijk te interpreteren, dan is zeker bij een epidemiologisch onverwachte positieve uitslag confirmatie nodig. Afhankelijk van de lokale implementatie met dit gen kan dat met de RdRP-PCR of andere eigen PCR op het RNA, of door her-testen van hetzelfde monster door het eigen of samenwerkingslab, of door de patiënt opnieuw te bemonsteren.

Daar stond in de voorgaande versie van het document de Ct-waarde >30. De onderliggende vraag bij de vraag naar aanpassing van deze waarde suggereert dat het hier gaat om een afkapwaarde die onderscheid maakt tussen positief en negatief. Dat is niet zo. Het gaat hier om een waarschuingswaarde. Ct-waarden van COVID-19 patiënten kunnen typisch variëren van circa 15 tot 40, met de meerderheid tussen 20 en 35 (grenzen afhankelijk van gebruikte apparatuur en chemie voor de PCR-test). Tegen de limiet van detectie van de PCR-test die zich typisch tussen Ct 35 en 40 bevindt, moeten de amplificatiecurves extra goed bekeken worden of ze aan de S-curve eis voldoen. De tekst gaat over de Ct-waarde waarboven men extra alert moet zijn bij beoordelen van de amplificatiecurves. Het betreft een aanwijzing die kan helpen bij de beoordeling van de diagnostiek.

Sommige laboratoria gebruiken om te bepalen of de PCR-test positief of negatief is een Ct afkapwaarde of andere afkapwaarde voor methoden waarbij geen Ct-waarde wordt gegenereerd. Andere laboratoria gebruiken geen afkapwaarde, maar beoordelen amplificatiecurves van het genetisch materiaal van het virus of een combinatie van beiden gebruiken. De keuze voor methode van beoordelen van een PCR-test wordt per laboratorium onderbouwd in de eigen validatie en gebruikte testalgoritmen of vastgelegd in de 'Instructions for use' (IFU) van de gebruikte commerciële kit. Daarom verschillen de beoordelingsmethoden tussen laboratoria en gebruikte testen en kan er geen generiek specifieke richtlijn voor gegeven worden. Voor "laag-positieve" resultaten waarbij getwijfeld wordt aan de juistheid, meestal een amplificatie signaal in de buurt van de detectiegrens van de PCR-test, geldt dat elk laboratorium een eigen algoritme heeft hoe hiermee om te gaan. Dit staat ook in de IFU van commerciële testen. Het vervolg op zo'n signaal kan inhouden dat er een bevestigingstest gedaan wordt op hetzelfde materiaal of dat nieuw materiaal gevraagd wordt van enkele dagen later.

## Toelichting op wijzigingen

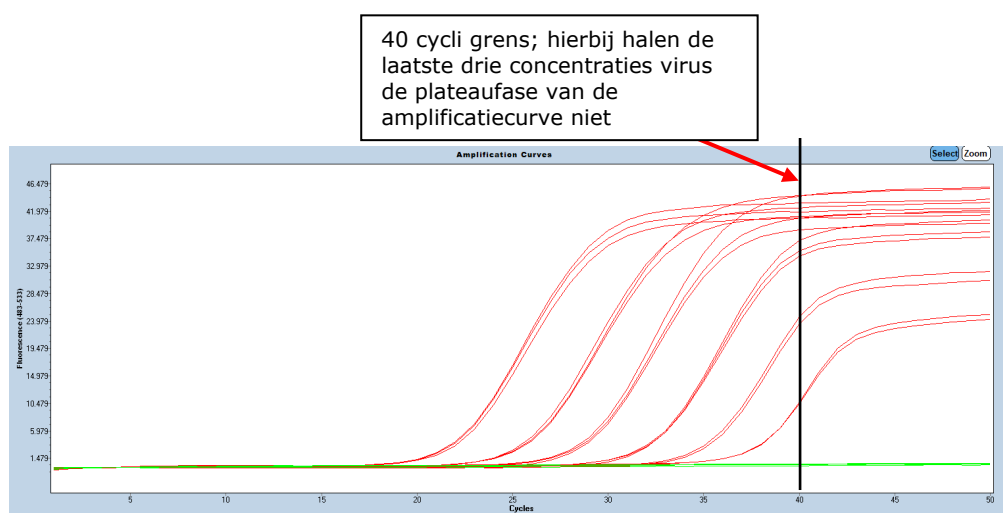
Het landschap van PCR testen voor SARS-CoV-2 heeft zich van het begin met twee in-house protocollen met één set primers en probes met twee target genen (E-gen en RdRP-gen) uitgebreid naar een scala aan protocollen gebaseerd op in-house ontwikkeling en in gebruik nemen van commerciële PCR testen en testen gebaseerd op andere amplificatietechnieken. Die hebben allemaal hun eigen optimale temperatuur waarbij de amplificatie plaatsvindt en eigen optimale aantal amplificatiecycli. Het optimum aantal cycli ligt voor het overgrote aantal testen tussen de 40 en 45 en is niet in de tijd verandert. De WHO COVID-19 referentielaboratoria ErasmusMC en RIVM gebruiken voor het originele protocol respectievelijk 45 en 50 cycli.

Het verschil in aantal cycli voor waarschuwings Ct-waarde van eerst 30 naar nu 35 in het document maakt niet dat er meer monsters positief worden of dat er meer foutief positieven bij zouden komen. Meer cycli draaien kan helpen om monsters die laat in het aantal cycli positief worden een nog duidelijkere S-vormige amplificatiecurve te geven. Maar daar gaat het niet om bij de wijziging van 30 naar 35 zoals hiervoor beschreven. Door kwaliteitscontrole weten we dat alle PCR testen en andere amplificatietesten die nu in Nederland gebruikt worden een vergelijkbare limiet van detectie hebben.

We moesten met eerst weinig positieven in het begin van de epidemie in Nederland nog ervaren hoe de ontwikkelde en uitgerolde PCR-test voor SARS-CoV-2 zich gedroegen en wat de dynamiek van de virale load tijdens het ziektebeloop van patiënten was. Daarom was in de voorgaande versie van het document in de concluderende paragraaf over de beoordeling van resultaten van de originele PCR-test aan de veilige kant geschreven om amplificatiecurves boven Ct 30 die er niet typisch uitzien (geen duidelijke S curve hebben die op exponentiële vermeerdering wijst) nader te bekijken en te confirmeren. Confirmeren kan dan met een andere test op hetzelfde monster als er een andere test beschikbaar is in het lab, of door de patiënt opnieuw enkele dagen later te laten bemonsteren. De verandering van Ct 30 naar Ct 35 als waarschuwingswaarde is ingegeven omdat gebleken is dat beneden Ct 35 de curves altijd wel typisch waren en dat er boven Ct 35 tegen de limiet van detectie van de PCR-test er pas niet typische curves konden ontstaan. Dit is eigenlijk niet anders dan bij PCR testen voor andere pathogenen. Maar nu door ervaring ook voor SARS-CoV-2 bevestigd.

Omdat veel labs niet meer de eerste uitgerolde PCR opzet gebruiken is die Ct 35 ook weer 'vloeibaar' geworden. Commerciële kits definiëren in hun IFU eigen Ct waarschuwingswaardes, als ze dat al doen. Elke implementatie zou volledig gekarakteriseerd moeten worden om een waarschuwingswaarde te definiëren. Met een algemene Ct 35 als waarschuwingswaarde om daarboven nauwkeuriger naar amplificatiesignalen te kijken zit je nog steeds aan een veilige kant.

Hoe zit het dan met de veelbesproken afkapwaarde voor positief of negatief? Die is er eigenlijk niet voor een goed ontwikkelde PCR-test. Minder dan 1 molecuul kan niet gedetecteerd worden en 1 molecuul in een PCR-test heeft na pakweg 35-36 amplificatiecycli voldoende kopieën gegenereerd om boven de fluorescentie achtergrond waarde uit te komen. Typisch voorbeeld van SARS-CoV-2 detectie met protocol wat gebruikt wordt op het RIVM hieronder. Dit is een efficiënt verlopende PCR reactie. Zoals te zien is verlengd meer dan 40 cycli draaien de laatste curve in de grafiek verder naar rechts waardoor de S-vorm zichtbaar wordt, maar de Ct waarde verschuift daardoor niet.



*Figuur. Amplificatiecurves van RdRP-gen van 10-voudige verdunningsreeks SARS-CoV-2 gesimuleerde klinische monsters in drievoud getest (rood) in de achtergrond van negatieve klinische monsters (groen). De laatste curves rechts zijn bij een concentratie virus op de detectiegrens van de PCR-test waarbij de PCR-test in 2 van de 3 herhalingen een amplificatiecurve geeft. Zou 40 cycli gedraaid zijn ipv 50 cycli dan zouden de laatste curves voordat ze de S-vorm krijgen afgekapt zijn. Dat geldt ook voor de 10-voudig en 100-voudig hogere concentraties daarvoor. 50 cycli draaien maakt het beoordelen van de curves een stuk gemakkelijker. Bij minder dan 40 cycli draaien zou er sensitiviteit verlies optreden.*

Voorbij de absolute limiet van detectie van 1 molecuul per PCR reactie komen er geen specifieke curves bij. Zou je meer dan 50 cycli draaien dan krijg je artefacten van primerdimeren en andere troep. Daarom wordt regulier bijna nooit meer dan 40-45 cycli gedraaid. Maar, zoals getoond voor het RIVM protocol levert 50 cycli draaien geen problemen op en het vergemakkelijkt het beoordelen van de amplificatiecurves.

Bijgevoegd de Standard Operating Procedure (SOP) en het validatierapport van de PCR-test die we bij het RIVM gebruiken. Deze, of de ErasmusMC variant van de originele PCR-test, wordt nog steeds door labs in Nederland gebruikt. Bijgevoegd ook de IFU van drie commerciële kits die door labs in Nederland worden gebruikt. In de Ridagene kit IFU staat een Ct waarde genoemd waarboven er extra naar curves

gekeken moet worden of herhaling aangevraagd om meer zekerheid te krijgen. In de Seegene kit IFU gaat het om welke targets positief zijn wanneer er extra aandacht aan de uitslag gegeven moet worden. Idem voor de PCR sneltest van Cepheid die veel gebruikt wordt in Nederland. Dit geeft ongeveer de variatie aan waarmee we nu in Nederland te maken hebben.

Een andere aanpassing in het document is de aandacht die gevraagd wordt voor het gebruik van testen met één of met meer dan één target gen. Het landschap aan op het moment van schrijven beschikbare testen is in de update weergegeven. In de voorgaande versie was dit vooral uitgebreid gericht op gebruik van de originele E-gen en RdRP-gen PCR-testen. In de huidige versie is de aandacht voor het originele protocol teruggebracht naar één alinea en meer aandacht gegeven aan de ontwikkelingen over de laatste maanden op het gebied van PCR testen. Waar eerst vanwege materiaal en reagentia tekorten van twee targets (E-gen en RdRP-gen) overgaan kon worden naar één target (E-gen) zijn door introductie van commerciële kits (zoals hiervoor genoemd en voorbeeld IFU bijgesloten) en betere beschikbaarheid van materialen en reagentia steeds meer tests met meerdere targets in gebruik genomen. Ook hierdoor zijn er niet meer of minder foutief positieve resultaten. Omdat verschillende targets niet 100% vergelijkbaar in sensitiviteit zijn kan het aantal zwak positieven toenemen, omdat bij zwak positieven niet altijd alle targets positief zijn. Dit is normaal en het gevolg van een statistisch proces om een lage concentratie virus in een monster rond de detectielimiet van de test op te kunnen pikken. Voor het beoordelen van niet alle targets positieve resultaten hebben laboratoria een algoritme of dit ligt vast in de IFU van de commerciële PCR-test kit (zie bijgevoegde voorbeelden).

Kortom, het aantal amplificatiecycli wat in PCR testen of andere amplificatietechnieken gebruikt wordt is optimaal voor een sensitieve test en het aantal amplificatiecycli is sinds de start van SARS-CoV-2 circulatie in Nederland niet verhoogd om meer monsters positief te vinden. Daarnaast is het gebruik van meer dan één target ingegeven om minder patiënten met een erg lage hoeveelheid virus te missen en het risico te spreiden dat ondanks zorgvuldige ontwikkeling van de testen door mutaties in het virus genoom een test op één deel van het virus genoom opeens minder gevoelig zou kunnen worden en er patiënten gemist zouden kunnen worden. Dit is tot nu toe niet opgetreden met de veel gebruikt E-gen PCR omdat die gebruik maakt van een zeer stabiel deel van het erfelijk materiaal van het virus.

### **Wanneer is de aanpassing gemaakt en waarom?**

De tekst op de website is 25 september 2020 aangepast. De aanpassing is gemaakt om de laatste stand van zaken in ontwikkelingen van PCR-testen, andere type testen en ontwikkelingen op diagnostiek gebied te communiceren. De aanpassing van de waarschuwings Ct-waarde is gemaakt omdat de opgedane ervaring leert dat onder Ct 35 er geen twijfelcurves zijn. De aanpassing aan aantal target genen in PCR-testen en andere typen testen is gemaakt om het veranderde landschap aan

beschikbare en gebruikte testen in Nederland te beschrijven.

### **Wie schrijft en beoordeelt aanpassingen en hoe wordt het gecommuniceerd?**

Een team van artsen-microbiologen, virologen, medisch moleculair biologen, artsen openbare gezondheidszorg, en epidemiologen van binnen en buiten het RIVM schrijven updates van het document. Communicatie hierover is gedaan via (Lab)Inf@ct: COVID-19 (nieuw coronavirusinfectie) (68), 29 september 2020. De vaststellingsprocedure via de subcommissie Diagnostiek LCI-richtlijnen in samenwerking met de Nederlandse Vereniging voor Medische Microbiologie loopt.

### **Eén target of meerdere targets en andere Ct waarde: wat is het effect op het aantal en percentage positieven?**

In het begin van de epidemie werd in Nederland getest op het E-gen en het RdRP-gen. Omdat het E-gen het gevoeligst was van deze twee is er vanwege schaarste en efficiënt gebruik van middelen en reagentia ervoor gekozen om het testen tot één gen, het E-gen, te beperken. Dit heeft geen invloed gehad op het aantal en het percentage positieven omdat de E-gen PCR-test de gevoeligste test was. De Ct waarde waarboven bij beoordeling extra aandacht gegeven moet worden heeft geen invloed op het aantal PCR positieven, niet absoluut en niet relatief. Onterecht wordt de suggestie gewekt dat de genoemde waarschuwingswaarde samenhangt met daaronder positief en daarboven negatief. Het gaat slechts om een waarde waarboven bij de beoordeling van de amplificatiecurves extra aandacht wordt gegeven. Het gebruik van één of meerdere target genen voor de PCR-test heeft zich vloeiend voltrokken en kan daarom een plotselinge stijging in het percentage positieven niet verklaren. Daarnaast geeft het kwaliteitsprogramma aan dat de gebruikte PCR-testen tussen laboratoria en in laboratoria een vergelijkbare gevoeligheid hebben. Zoals hierboven beschreven heeft het verhogen van de waarschuwing Ct waarde van 30 naar 35 geen invloed op het aantal positieven en fout-positieven en kan daarom een plotselinge stijging in het percentage positieven niet verklaren.

1) Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu, COVID-19 Richtlijn (<https://lci.rivm.nl/richtlijnen/covid-19>).

Bijlagen:

1. V040 Validatierapport Coronavirus 2019 n-CoV detectie PCR\_met\_ref
2. SOP deel 1\_M900 Het isoleren en zuiveren van nucleïnezuur uit klinische monsters mbv MagNA Pure 96 versie 7
3. SOP deel 2\_M012\_Lightcycler-qPCR\_versie\_9
4. SOP deel 3\_F927 coronavirus detectie PCR
5. EUA-Seegene-allplex2-ifu
6. pg6815\_ridagene\_sars-cov-2\_2020-07-27\_en\_final
7. Xpert Xpress SARS-CoV-2 Assay ENGLISH Package Insert 302-3750 Rev. C