

Evaluatieverslag Corona SARS-2 PCR op Speeksel versus E-swab

GGD Streeklaboratorium Amsterdam

Naam: (10)(2e) (10)(2e)
 (10)(2e) (10)(2e) arts microbioloog
 (10)(2e) medisch moleculair microbioloog
 Datum: 6-5-2020

Vraagstelling:

Voltoet speeksel als afnamemateriaal even goed of beter dan de gebruikelijke E-swab?

Opzet en methoden

In dit onderzoek zijn 83 personen getest, waarvan naast een E-swab ook speeksel is afgenomen. Daarvoor hebben deelnemers die bij de Zorgstraat kwamen in een leeg potjes gespuugd (dit zijn potjes die normaliter voor urine verzameling worden gebruikt). Deelnemers werden vooral gevraagd aan mensen die klachten dachten te hebben.

De E-swabs werden allemaal met de MP24 (Roche) geïsoleerd vanwege de consistentie van het gebruik van een extractierobot. De speeksel monsters werden in opzet zowel met de MP24 als met isopropanol precipitatie geïsoleerd. Na de eerste 57 monsters is er afgesproken dat de MP24 niet meer gebruikt werd voor het isoleren van speeksel, omdat de MP24 niet in staat was om voldoende materiaal op te pipetteren door slijmerigheid van het speeksel. Daardoor ontstonden foutmeldingen door de MP24. Vaak zat er weinig speeksel in de potjes. Daarom is er per monster PBS toegevoegd tot een totaal van 1 ml vloeistof; er werden variabele hoeveelheden van 200 µl tot bijna 1 ml PBS toegevoegd aan het speeksel. De uitslagen van de E-swabs waren leidend voor de uitslag en deze zijn uitgegeven in GLIMS. Bij de interpretatie van de uitslagen werd een curve met een Ct waarde > 36 en < 40 als "dubieus" beschouwd. In dat geval werd de E-swab opnieuw gebruikt voor nucleïnezuur isolatie en werd er herest op zowel het E-gen als het N-gen.

Resultaten:

Er zijn 57 speeksel monsters geïsoleerd met de MP24, hiervan zijn 24 isolaties mislukt. Van de overige 33 speeksel monsters waren er 32 negatief en 1 dubieus. De MP24 resultaten waren niet te evalueren.

Er waren 7 monsters direct positief in de E-swab voor het E-gen en er waren er 5 waren dubieus (Tabel 1).

Tabel 1. Overzicht van de E-swabs die met de MP24 zijn geïsoleerd.

Eswab positief	Eswab negatief	Eswab dubieus
7	71	5

De dubieuze E-swabs zijn herhaald voor zowel het E-gen als het N-gen. Hiervan zijn 3 monsters negatief uitgegeven (herhaling voor beide targets negatief). Er is 1 monster dubieus uitgegeven (herhaling voor één target zwak-positief) en 1 monster is alsnog positief uitgegeven (herhaling voor beide targets positief).

Van de 8 positieve E-swab monsters zijn er 5 ook positief in speeksel. De overige 3 monsters zijn dubieus in speeksel (Tabel 2).

Tabel 2. Overzicht van de speeksel monsters die met isopropanol zijn geïsoleerd.

Speeksel positief	Speeksel negatief	Speeksel dubieus
5	69	9 waaronder 3 pos E-swab

De dubieuze speeksel monsters zijn niet herhaald voor het E-gen en/of N-gen. Wanneer deze monsters opnieuw zouden worden geïsoleerd, dan zou de uitslag alsnog positief kunnen worden.

In tabel 3 is een overzicht te zien van alle E-swab en speeksel monsters die met isopropanol precipitatie zijn geïsoleerd waar een Ct-waarde <40 werd gezien.

Dit betreft dus de 5 monsters die positief waren voor zowel de E-swab als voor speeksel en ook de 3 monsters die positief waren in E-swab maar dubieus in speeksel..

De Ct waarden in de E-swab zijn bijna altijd lager (4 tot 5 Ct) dan die in het speeksel monster, dus het speeksel monster heeft 'een lagere load'. Er is echter geen kwantitatieve PCR (met ijklijn) gebruikt maar alleen gekeken naar Ct waarden.

Er is 1 dubieus Eswab monster, waarvan het speeksel negatief is en er zijn 6 dubieus positieve speeksel monsters die negatief zijn voor de Eswab. Het zou kunnen zijn dat er dus 6 monsters gemist werden met de E-swab die wel een signaal gaven in het speeksel. Alle speeksel monsters zijn in 3 runs getest. In 2 van deze runs waren de controles in orde en was er geen sprake van mogelijke contaminatie. In de laatste run waren de negatieve controles (T10 buffer en NEC) ook negatief maar de IC was wel (fout) positief. In die laatste run zouden 3 dubieuze speeksel monsters ook het gevolg van contaminatie kunnen zijn.

Tabel 3. Overzicht van de Ct-waarden Eswab versus speeksel.

Monster	Ct-waarde Eswab MP24	Uitslag in Glims	Ct-waarde speeksel isopropanol	Ct-waarde speeksel MP24	Hoeveelheid PBS (µl) om aan te vullen tot 1 ml
(10)(1d)	21,56	pos	26,60	Iso mislukt	750
	38,94 (na hh negatief)	neg	-	-	600
	-	neg	-	41,32	550
	42,31 (na hh negatief)	neg	-	Iso mislukt	600
	38,88 (na hh positief)	pos	37,63 (dub)	Iso mislukt	900
	-		39,23 (dub)	Iso mislukt	750
	37,99 (na hh dubieus)	dub	-	-	800
	20,59	pos	32,75	Iso mislukt	300
	38,81 (na hh negatief)	neg	-	-	850
	20,12	pos	30,64	Iso mislukt	200
	-	neg	38,95 (dub)	Iso mislukt	800
	-	neg	38,71 (dub)	Iso mislukt	200
	24,40	pos	36,42 (dub)	Iso mislukt	250
	-	neg	38,10 (dub)	Geen iso	750
	-	neg	38,64 (dub)	Geen iso	900
	32,13	pos	29,04	Geen iso	500
	23,38	pos	27,29	Geen iso	700
	-	neg	38,36 (dub)	Geen iso	700
	22,09	pos	37,80 (dub)	Geen iso	750

Discussie.

De speeksel zijn verdund met PBS, omdat er anders niet genoeg materiaal was voor 2 isolaties (MP24 & isopropanol). Dit kan deels verklaren waarom de Ct-waarde in speeksel (veel) hoger zijn dan in de E-swab. Het verschil in Ct waarden bij de positieve monsters is echter zo groot dat ook andere verklaringen meegenomen moeten worden zoals minder SARS virus in speeksel, of problemen bij de extractie. De

isolatie met de MP24 is vaak mislukt, dit is duidelijk geen goede methode om speeksel te isoleren. De speeksel isoleren met isopropanol lukte technisch wel goed.

Versillen met de studie van Wyllie et al (2020):

Patients were asked to repeatedly spit into a sterile urine cup until roughly a third full of liquid (excluding bubbles), before securely closing it.

Wij hadden veel kleinere hoeveelheden speeksel dan 1/3 urine potje.

Total nucleic acid was extracted from 300 µl of viral transport media from the nasopharyngeal swab or 300 µl of whole saliva using the MagMAX Viral/Pathogen Nucleic Acid Isolation kit (ThermoFisher Scientific) following the manufacturer's protocol and eluted into 75 µl of elution buffer media from the nasopharyngeal swab or 300 µl of whole saliva using the MagMAX Viral/Pathogen Nucleic Acid Isolation kit (ThermoFisher Scientific) following the manufacturer's protocol and eluted into 75 µl of elution buffer. Het zou kunnen zijn dat deze extractiemethode effectiever is voor speeksel.

Conclusies:

1. Speeksel is op zich een bruikbaar afname materiaal voor de SARS-2-PCR
2. Op deze manier afgenomen en verwerkte speeksel zijn minder bruikbaar dan de E-swabs
3. Er is meer werk nodig op het laboratorium om speeksel te testen dan de E-swabs.