

To: [5.1.2e] [5.1.2e]@rivm.nl
Sent: Thur 10/15/2020 10:44:45 PM
Subject: RE: Doorst: PCR tekst in voortgangsbrief
Received: Thur 10/15/2020 10:44:45 PM

H

From: [5.1.2e] <[5.1.2e]@rivm.nl>
Sent: donderdag 15 oktober 2020 14:49
To: [5.1.2e] <[5.1.2e]@rivm.nl>; [5.1.2e] <[5.1.2e]@rivm.nl>
Subject: FW: Doorst: PCR tekst in voortgangsbrief

Dag [5.1.2e] en [5.1.2e]
 Volgens mij kunnen we het beste weer een documentje maken dat alle Kamervragen van van Haga en de vraag aan [5.1.2e] adresseert.
 Ik heb jouw twee stukken bij elkaar gezet [5.1.2e] In geel de stukjes die ik erbij heb verzonnen. Op de laatste pagina heb ik antwoorden van [5.1.2e] gecombineerd onder de gele titels.
 De paper waar naar verwezen wordt is het eurosurv stuk neem ik aan.
 Eens zo?
 Groet, [5.1.2e]

From: [5.1.2e] <[5.1.2e]@rivm.nl>
Sent: woensdag 14 oktober 2020 17:16
To: [5.1.2e] <[5.1.2e]@rivm.nl>; [5.1.2e] <[5.1.2e]@rivm.nl>; [5.1.2e] <[5.1.2e]@rivm.nl>
Subject: RE: Doorst: PCR tekst in voortgangsbrief

Dag [5.1.2e]

Is goed. Aanvullend definiëren commerciële kits gewoon hoe met de testuitslagen omgegaan moet worden. Algoritmes gebaseerd op Ct afkapwaarde voor positief, Ct waarde waarboven extra aandacht moet zijn voor beoordeling, aantal en welke targets positief. Lab kan dat volgen of niet. Dat moet dan vastliggen in SOP.

Vragen over Ct waarde 30 naar 35 zijn gesteld door journalisten en ben samen met [5.1.2e] en me [5.1.2e] in gesprek geweest met journalisten. Antwoord hieronder. Daar is weer door ene [5.1.2e] een afbraakemail over gestuurd. Ik kan dat ook nog doorsturen als je daar trek in hebt.

Hieronder extract van wat besproken is met [5.1.2e] en journalisten AD en Trouw.

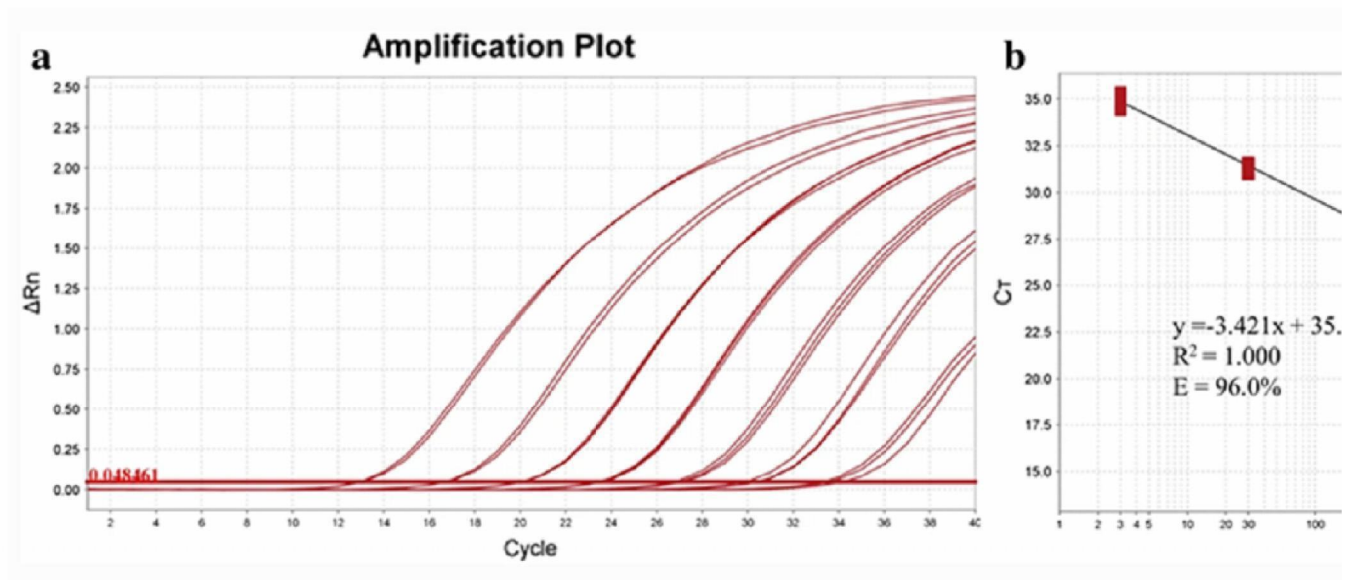
Het landschap van PCR testen voor SARS-CoV-2 heeft zich van het begin met twee in-house protocollen met één set primers en probes met twee target genen uitgebreid naar een scala aan protocollen gebaseerd op in-house ontwikkeling en in gebruik nemen van commerciële PCR testen en testen gebaseerd op andere amplificatietechnieken. Die hebben allemaal hun eigen temperatuur en aantal amplificatiecycli. Die ligt voor het overgrote aantal testen tussen de 40 en 45 en is niet in de tijd verandert. Het verschil in aantal cycli maakt niet dat meer monsters positief worden of er meer foutief positieven bij zouden komen. Het kan helpen om monsters die laat in het aantal cycli positief worden een nog duidelijkere amplificatiecurve te geven. Door kwaliteitscontrole weten we dat alle PCR testen en andere amplificatietesten die nu in Nederland gebruikt worden een vergelijkbare limiet van detectie hebben. Waar eerst vanwege materiaal en reagentia tekorten van twee targets overgaan is naar één target zijn door introductie van commerciële kits en betere beschikbaarheid van materialen en reagentia steeds meer tests met meerdere targets in gebruik genomen. 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 detectie limiet van de test op te kunnen pikken.

Kortom, het aantal amplificatiecycli wat in PCR testen of ander 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.

We moesten met eerst weinig positieven in begin epidemie in Nederland nog ervaren hoe de PCR testen voor SARS-CoV-2 zich gedroegen en wat de dynamiek van de virale load tijdens het ziektebeloop was. Daarom 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 te laten bemonsteren. Op zich is de verandering van Ct 30 naar Ct 35 geen gekke beweging 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.

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

Naar aanleiding van discussie met journalisten die 'experts' geraadpleegd hebben over Ct cutoff waarde en effect van wijziging van alert waarde van Ct 30 naar Ct 35. Eén van de 'experts' beweerde dat je met meer cycli de gevoeligheid van de PCR onbeperkt op kan schroeven. Dat is niet zo omdat minder dan 1 molecuul niet gedetecteerd kan worden en 1 molecuul in PCR na pakweg 35 cycli voldoende kopieën heeft gegenereerd om boven de fluorescentie achtergrond threshold uit te komen. Typisch voorbeeld hieronder voor circa 3 moleculen per reactie. Dit is bij een efficiënt verlopende PCR reactie. Meer cycli draaien zou alleen maar de laatste curve in de grafiek a. verder naar rechts verlengen en meer op de curve links daarvan laten lijken, maar de Ct waarde verschuift daardoor niet.



Voorbij de absolute limiet van detectie van 1 molecuul per reactie komen er geen specifieke curves bij. Zou je 50 cycli draaien dan krijg je artefacten van primerdimeren en andere troep. Daarom wordt regulier bijna nooit meer dan 40-45 cycli gedraaid.

Bijgevoegd ook nog de publicatie met de PCR die wij bij RIVM gebruiken en uitgerold is aan begin epidemie. Deze wordt nog steeds door labs in Nederland gebruikt. Bijgevoegd ook bijsluiters van drie commerciële kits die door labs in Nederland worden gebruikt. In Ridagene kit zie je een Ct waarde genoemd waarboven er extra naar curves gekeken moet worden of herhaling aangevraagd om meer zekerheid te krijgen. In Seegene kit gaat het om welke targets positief zijn wanneer er extra aandacht aan uitslag gegeven moet worden. Idem voor de moleculaire sneltest van Cepheid die veel gebruikt wordt in Nederland. Dit geeft ongeveer de variatie aan waarmee we nu in Nederland te maken hebben.

Mvg

5.1.2e

From: 5.1.2e <5.1.2e@rivm.nl>

Sent: woensdag 14 oktober 2020 16:20

To: 5.1.2e <5.1.2e@rivm.nl>; 5.1.2e <5.1.2e@rivm.nl>; 5.1.2e <5.1.2e@rivm.nl>

Subject: Doorst: PCR tekst in voortgangsbrief

Importance: High

Hoi 5.1.2e

Er zijn weer kamervragen en blijkbaar wil 5.1.2e iets voor het debat van nu.
Wat dacht je van deze reactie?

Klopt toch?

Dank je

Groet, 5.1.2e

5.1.2i Concept

Van: 5.1.2e <5.1.2e@minvws.nl>

Datum: 14 oktober 2020 om 15:53:22 CEST

Aan: 5.1.2e <5.1.2e@rivm.nl>, 5.1 5.1.2e <5.1.2e@minvws.nl>

CC: 5.1.2e <5.1.2e@minbzk.nl>, 5.1.2e <5.1.2e@rivm.nl>, 5.1.2e <5.1.2e@rivm.nl>, 5.1.2e <5.1.2e@rivm.nl>, 5.1.2e <5.1.2e@rivm.nl>

Onderwerp: RE: PCR tekst in voortgangsbrief

Beste 5.1.2e

Ik begrijp dat de discussie over de betrouwbaarheid van de PCR nog niet volledig beslecht is. Tijdens de Technische Briefing is 5.1.2e gevraagd waarom het aantal cycli in de PCR-test is teruggebracht van 30 naar 35. 5.1.2e heeft aangegeven dat hij dit moet navragen en dat hij hierover een mail zal sturen naar de leden.

Wij hebben inmiddels Kamervragen over dit onderwerp binnen:

<https://www.tweedekamer.nl/kamerstukken/kamervragen/detail?id=2020Z18662&did=2020D40352>

Kunnen jullie hier al een eerste licht op laten schijnen met oog op het debat van nu?

Groeten, 5.1.2e

Van: 5.1.2e <5.1.2e@rivm.nl>

Verzonden: maandag 12 oktober 2020 15:48

Aan: 5.1 5.1.2e <5.1.2e@minvws.nl>

CC: 5.1.2e <5.1.2e@minbzk.nl>; 5.1.2e <5.1.2e@minvws.nl>; 5.1.2e <5.1.2e@rivm.nl>; 5.1.2e <5.1.2e@rivm.nl>; 5.1.2e <5.1.2e@rivm.nl>

Onderwerp: RE: PCR tekst in voortgangsbrief

Dag 5.1.2e

Bijgaand ons stukje over de PCR.

Groet, 5.1.2e

Dit bericht kan informatie bevatten die niet voor u is bestemd. Indien u niet de geadresseerde bent of dit bericht abusievelijk aan u is verzonden, wordt u verzocht dat aan de afzender te melden en het bericht te verwijderen. Het RIVM aanvaardt geen aansprakelijkheid voor schade, van welke aard ook, die verband houdt met risico's verbonden aan het elektronisch verzenden van berichten.
www.rivm.nl *De zorg voor morgen begint vandaag*

This message may contain information that is not intended for you. If you are not the addressee or if this message was sent to you by mistake, you are requested to inform the sender and delete the message. RIVM accepts no liability for damage of any kind resulting from the risks inherent in the electronic transmission of messages.
www.rivm.nl/en *Committed to health and sustainability*