

Onderzoek naar de diagnostiek van covid-19 met behulp van PCR testen in het teststraattraject

Inhoudsopgave

1. Inleiding	4
2. Onderzoeken van de specificiteit van de primers	8
2.1 SARS-CoV-2 gealigned met SARS-CoV zmy 1	11
2.2 SARS-CoV-2 gealigned met SARS coronavirus Tor2	12
2.3 SARS-CoV-2 gealigned met HCoV OC43	12
2.4 SARS-CoV-2 gealigned met HCoV 229E	14
3. Onderzoeken van de eigenschappen van de primers	16
4. Algemene opmerkingen bij het PCR protocol	19
5. Sensitiviteit en specificiteit van PCR testen	21
5.1 Mogelijke testuitslagen	21
5.2 Testeigenschappen	22
5.3 Testeigenschappen bij bevolkingsonderzoek	24
5.4 De sensitiviteit van de COVID-19 PCR test	24
5.5 Eigen onderzoek naar de specificiteit van de COVID-19 PCR test	25
5.6 Conclusie	28
6. Opmerkingen over de interpretatie van de COVID-19 PCR test	29
7. Conclusie	33
8. Bronnen	34
Bijlagen	

1. Inleiding

Naarmate de coronacrisis vorderde verschenen er berichten op niet-mainstream kanalen dat de PCR test die werd gebruikt om covid-19 gevallen vast te stellen niet betrouwbaar was. [1][2][3][13] Er zouden zowel vals-positieve als vals-negatieve resultaten worden gemeten en de test zou een positief resultaat geven met andere virussen dan SARS-CoV-2.

Vanaf juli verschenen berichten in de reguliere media over een tweede golf, die hoofdzakelijk gebaseerd leken te zijn op aantallen positief geteste personen in plaats van ziektegevallen en aantallen ziekenhuisopnames. Daarbij moet worden opgemerkt dat de regering al langer speculeerde op een zgn. 'tweede golf' besmettingen nadat de uitbraak in juni goed onder controle leek te zijn. Tegelijk werd de mogelijkheid om getest te worden vanaf juni vergroot en werd de bevolking aangespoord hier ook gebruik van te maken. De verwachting van een tweede golf leek in augustus te worden bewaarheid door stijgende aantallen positief geteste personen terwijl er twijfels bestonden over de werkzaamheid en betrouwbaarheid van de PCR test.

Vanuit deze twijfel ontstond de wens om de al bekende gegevens over de PCR test te bundelen, te ordenen, te interpreteren en duidelijkheid te scheppen. Het vermoeden bestond dat op basis van een datagolf beperkende maatregelen zouden worden genomen die het welzijn van de bevolking zouden inperken, het economisch verkeer schaden en nodeloos angst op zouden roepen terwijl er in werkelijkheid niet zoveel aan de hand was. En dit moest snel gebeuren, aangezien de statistische tweede golf al bezig was een tweede golf aan maatregelen voort te brengen. Dit overigens in de afwezigheid van stijgende aantallen patiënten op de IC's, zelfs niet op de gewone afdelingen van ziekenhuizen.

Dit document is bedoeld als 'levend document', wat wil zeggen dat ons onderzoek naar de PCR test voor de diagnostiek van COVID-19 na publicatie van dit document doorloopt en dit document kan worden aangevuld met addendums. Dit document weerspiegelt de kennis die wij op moment van publicatie hebben en kan gewijzigd worden door voortschrijdend inzicht.

Over de PCR test

Op 23 januari 2020 werd een artikel van Corman et al. [4] uitgebracht. Hierin werd een methodiek beschreven om het SARS-CoV-2 virus aan te tonen in patiëntmateriaal. Het paper was gebaseerd op een methode om uit te sluiten dat sprake was van een ander virus dan SARS-CoV-2. Het viel meteen op dat in dit paper een aantal 'slordigheidsfouten' te vinden waren. Zo bevatten de opgegeven primersequenties dubbelzinnigheden en was de lijn in het gevolgde protocol onduidelijk. Er waren genoeg redenen om aan de soliditeit van dit artikel te twijfelen, vooral omdat het werd aangeprezen als opzet voor de diagnostiek van Covid-19.

Wat is PCR?

Voor de lezer die met dit onderwerp niet vertrouwd is, hier een korte inleiding over de PCR test. Het totale genoom is zo ontzettend groot dat je daar eigenlijk niets mee kunt. Je kunt het in de cel aanwezige DNA isoleren en dan spreek je van genomisch DNA. De onderzoeker is geïnteresseerd in een klein stukje van het DNA, vaak een gen of een stukje van een gen. Omdat te kunnen onderzoeken amplificeer (versterk) je dat ene stukje waarin je geïnteresseerd bent en dat is de PCR. PCR is een voorbereiding van het DNA om het geschikt te maken voor onderzoek. PCR is een afkorting van *polymerase chain reaction*. Polymerase, het enzym dat de cellen van alle organismen op Aarde gebruiken om het DNA in hun cellen te vermenigvuldigen om een celdeling te laten plaatsvinden. Je creëert een kettingreactie van polymerase dat steeds een stukje DNA vermenigvuldigt waarin je geïnteresseerd bent.

Je selecteert het stukje DNA waarin je geïnteresseerd bent door middel van een primer. Een primer is een stukje synthetisch DNA (het is door mensen gemaakt, komt niet vrij in de natuur voor) dat matcht met het stukje genomisch DNA wat je wilt onderzoeken. De basen van primer en genomisch DNA plakken als een soort magneetje aan elkaar. Die aan je DNA geplakte primer is het aanhechtpunt om de PCR te laten plaatsvinden. Je voegt allerlei reagentia toe aan je genomisch DNA met primer die het natuurlijke proces na-aapt waarmee het lichaam zelf het DNA kopieert om een nieuwe cel te kunnen vormen met behulp van polymerase. Je 'amplificeert', dus versterkt het stukje DNA van interesse. Je kaapt dus het mechanisme dat het lichaam ook gebruikt om het stukje DNA waarin je geïnteresseerd bent, te kopiëren. Dat gebeurt in cycli. In theorie kan in iedere cyclus het DNA verdubbeld worden. Dat betekent dat wanneer je PCRt de hoeveelheid van het stukje DNA dat je wilt onderzoeken, exponentieel toeneemt terwijl het genomische DNA hetzelfde blijft. Je krijgt dus een enorme hoeveelheid van het gePCRde stukje DNA, waar het genomisch DNA bij in het niet valt. Als je 30 cycli PCRt, krijg je dus 2 tot de macht 30 kopieën van het stukje DNA dat je wilt onderzoeken. Dat eindproduct is geen genomisch DNA meer, maar geamplificeerd DNA. Dat kun je wel verder onderzoeken.

Hoe kun je een virus diagnostiseren en wat zijn de beperkingen?

Het SARS-CoV-2 virus is een RNA virus. RNA is een soort kopie van DNA dat wordt gebruikt om het eiwit waar het DNA voor codeert, te maken. Alle organismen hebben DNA, waar RNA van wordt afgeschreven waarmee het eiwit wordt gemaakt. Alleen sommige virussen, waaronder SARS-CoV-2 hebben RNA, waarmee direct de eiwitten waar het virus uit bestaat, kunnen worden gemaakt. Om een virus aan te tonen moet het fysiek worden geïsoleerd, gezuiverd en gefotografeerd m.b.v. elektronenmicroscopie. Vervolgens moet de pathogeniteit van het virus worden aangetoond om zeker te weten dat de klinische verschijnselen worden veroorzaakt door het virus. Uit deze analyses volgen de eigenschappen van het virus, zoals eiwitstructuur en genomische sequentie. Is het virus eenmaal bewezen de oorzaak van de ziekte, dan kan men voor de diagnostiek volstaan met moleculaire technieken en serologische testen. Moleculaire diagnostiek heeft echter de beperking dat het geen onderscheid kan maken tussen actief, zich vermenigvuldigend virus, en resten van door het lichaam geïnactiveerd virus. De gouden standaard voor het diagnostiseren van een virusinfectie was vanoudsher een viruskweek. Dit is tijdrovend en heeft veiligheidsaspecten, maar geeft wel

zekerheid over de infectiestatus. In de praktijk gaat men meer en meer over op moleculaire technieken aangevuld met serologische diagnostiek. Daarbij moet worden opgemerkt dat er een gerichte verdenking op een besmetting met het virus bestaat en er dus een populatie wordt getest met een relatief hoge kans daadwerkelijk drager van het betreffende virus te zijn. Het RNA kan worden aangetoond met behulp van de PCR test en vervolgonderzoek op die PCR. Je toont het virus dus indirect aan: je toont de sporen van het virus aan en niet het virus zelf. Je zoekt naar een *smoking gun*. Het virus is hoofdzakelijk besmettelijk en potentieel gevaarlijk als het bezig is zich te vermenigvuldigen. Als dat zo is, is het virus in hoge concentratie aanwezig, is het het gemakkelijkst te detecteren en heb je de beste kans het virus daadwerkelijk aan te tonen op het moment dat het virulent is en heb je een bevestigd geval van covid-19 bij een patiënt die symptomatisch is. Wat ook kan gebeuren is dat iemand het virus bij zich draagt in lage hoeveelheden zonder ziek te zijn (een asymptomatische drager), of dat iemand nog resten van het virus in zich draagt na een eerder doorgemaakte infectie, al dan niet met symptomen. Ook hier kan de PCR test op reageren, want de PCR test reageert op het RNA van het virus en niet op het intacte virus. Omdat RNA vrij te krijgen, wordt het geïsoleerd uit het neusswabje. Het virus, voor zover het intact aanwezig was, gaat hierbij te gronde. De test kan dus geen onderscheid maken tussen actief virus en virusresten! Daarvoor is vervolgonderzoek nodig. De coronacrisis is voor zover wij weten ook de eerste keer in de geschiedenis van de geneeskunde dat op zo'n grote schaal mensen worden getest. Het spreekt voor zich dat dit uitdagingen met zich meebrengt.

Er wordt een sprong gemaakt van detectie van SARS-CoV-2 RNA naar 'de patiënt is ziek, besmettelijk en gevaarlijk voor de volksgezondheid'. En door diverse experts in binnen- en buitenland wordt aangegeven dat deze sprong op geen enkele manier op waarheid berust. [16] Om covid-19 te diagnostiseren wordt de PCR test gebruikt die stukjes van het genoom van het SARS-CoV-2 virus amplificeert. Wordt er een amplificatie verkregen, dan geldt dat als een positieve uitslag en dus als een 'geval' van covid-19. Zo worden de positieve testen door de regering en in de media ook behandeld: als een 'corona-zieke'.

Hoe wordt de PCR uitgevoerd op het virus?

Het monster wordt afgenomen door een neusswabje. Uit het swabje wordt het RNA, als het aanwezig is, vrijgemaakt door een soort schoonmaakstap die de eiwitmantel van het virus stukmaakt en alle eiwitten en troep die we voor de PCR niet nodig hebben, verwijdt. Je houdt dan het geïsoleerde RNA over. Een PCR kun je alleen uitvoeren op DNA. Je kunt van het RNA van het SARS-CoV-2 virus weer DNA maken door er het enzym reverse transcriptase aan toe te voegen. Dat enzym draait het proces om van DNA RNA te maken, ~~om~~ (reverse). Na deze reverse transcriptasestap hebben we dus virus DNA in plaats van het oorspronkelijke RNA en hierop wordt de PCR uitgevoerd. Daarna gaat het verder zoals onder het kopje *Wat is PCR?*. De corona PCR test wordt uitgevoerd als een zgn real-time PCR (rt-PCR). Dat is een PCR waarbij tijdens de PCR reactie wordt gekeken of er amplicon (het vermenigvuldigde stukje DNA) ontstaat. Bij een gewone PCR doe je dat achteraf. Je ziet dus dat er amplicon is, niet van welke aard het is en of het ook daadwerkelijk het amplicon is dat je wilde krijgen. Je neemt altijd controles mee: negatief (een monster waarvan bekend is dat het geen

SARS-CoV-2 bevat) en positief (een monster waarvan bekend is dat het SARS-CoV-2 bevat). Is de negatieve controle niet negatief en/of de positieve controle niet positief, dan is duidelijk dat er iets is misgegaan, moet de test worden afgekeurd en opnieuw gestart. Wanneer een monster een positieve uitslag geeft, wordt dit monster opnieuw getest. Bij twee positieve uitslagen wordt een positieve uitslag afgegeven.

Opmerking

We hebben geprobeerd dit lastige onderwerp zo toegankelijk mogelijk te maken voor leken. Daarom staat hier en daar cursief een kopje '*Achtergrond*' met een korte uitleg over de materie. Wie er al mee vertrouwd is, kan dit overslaan. Voor lezers die er niet mee vertrouwd zijn, biedt het een korte introductie. We geloven namelijk in vrije toegang tot informatie voor iedereen en dat iedereen de mogelijkheid en het recht heeft zichzelf te informeren en op basis van die informatie te handelen.

2. Onderzoeken van de specificiteit van de primers

Achtergrond

Om er zeker van te zijn dat je daadwerkelijk het stukje DNA van interesse amplificeert, moet een primer specifiek zijn, dat wil zeggen: de DNA sequentie die voor de primer wordt gebruikt moet maar één keer voorkomen in het genoom dat je wilt onderzoeken. Is dat niet zo, dan is de primer aspecifiek en zal het geamplificeerde RNA meerdere bronnen hebben. Je meetresultaat is dan niet zuiver. DNA is opgebouwd uit de nucleotiden A, T, C en G. Je ziet dat in de primersequenties andere letters voorkomen: internationale codes voor ambiguïties, oftewel er kunnen op die positie verschillende basen aanwezig zijn als er variatie in het gebruikte genoom (genomen) zit. Deze variantie is overigens natuurlijk. Alignen is een techniek om een sequentie van bijvoorbeeld een primer terug te vinden in een referentiesequentie. Deze referentiesequenties zijn vrij beschikbaar op internet. BLASTen is een techniek om een stukje DNA sequentie te matchen met een organisme. Het overeenkomen van sequentie tussen te vergelijken genomen heet homologie. De match is 100% wanneer het stukje volledig overeenkomt. Wanneer dat niet het geval is, is de homologie bijvoorbeeld 98% (de homologie tussen mens in chimpansee is bijv. 98%), of 80%, of heel laag, 25% bijvoorbeeld.`

Om de specificiteit van de primers na te trekken, zijn deze gealigneerd tegen verschillende referentiesequenties en geBLAST. Hiervoor is de BLAST tool te vinden op <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/> gebruikt. In het paper staan in tabel 1 de gebruikte primersets genoemd.

Primer	Sequentie
RdRp_SARSr-F	GTGARATGGTCATGTGTGGCGG
RdRp_SARSr-P2	CAGGTGGAACCTCATCAGGAGATGC
RdRp_SARSr-P1	CCAGGTGGWACRTCATCMGGTGATGC
RdRp_SARSr-R	CARATGTTAAASACACTATTAGCATA
E_Sarbeco_F	ACAGGTACGTTAATAGTTAATAGCGT
E_Sarbeco_P1	ACACTAGCCATCCTTACTGCGCTTCG
E_Sarbeco_R	ATATTGCAGCAGTACGCACACA
N_Sarbeco_F	CACATTGGCACCCGCAATC
N_Sarbeco_P	ACTTCCTCAAGGAACAACATTGCCA
N_Sarbeco_R	GAGGAACGAGAAGAGGCTTG

Tabel 1: de primers zoals genoemd in Corman et al.

R=G of A,

W = A of T

R = G of A

M = A of C

S = G of C

Bij BLASTEN van de primers werd direct een probleem duidelijk, nl. dat de primers ambiguïteits bevatten. Dubbelzinnigheden die het lastig maken om vast te stellen, welke sequentie de juiste is.

Primer	Sequentie	homoloog volgens BLAST
RdRp_SARSr-F	GTGARATGGTCATGTGTGGCGG	<i>primersequentie</i>
	GTGAAATGGTCATGTGTGGCGG	SARS-CoV-2
	GTGAGATGGTCATGTGTGGCGG	SARS-CoV zmy 1/SARS Tor1
RdRp_SARSr-P1	CCAGGTGGWACRTCATCMGGTGATGC	<i>primersequentie</i>
	CCAGGTGGAACRTCATCAGGTGATGC	<i>Vleermuiscoronavirus 100%</i>
	CCAGGTGGTACRTCATCCGGTGATGC	<i>Vleermuiscoronavirus 100%</i>
	CCAGGTGGAACRTCATCCGGTGATGC	<i>Vleermuiscoronavirus 100%</i>
	CCAGGTGGTACRTCATCAGGTGATGC	<i>Vleermuiscoronavirus 100%</i>
RdRp_SARSr-P2	CAGGTGGAACCTCATCAGGAGATGC	SARS-CoV-2
RdRp_SARSr-R	CARATGTTAAASACACTATTAGCATA	<i>primersequentie</i>
	CAGATGTTAAAGACACTATTAGCATA	88% homoloog met div. coronavirussen
	CAAATGTTAAAGACACTATTAGCATA	100% homoloog met div. coronavirussen
	CAGATGTTAAAGACACTATTAGCATA	100% homoloog met div. coronavirussen,
	CAAATGTTAAAGACACTATTAGCATA	88-100% homoloog met div. coronavirussen
E_Sarbeco_F	ACAGGTACGTTAATAGTTAATAGCGT	100% homoloog met SARS-CoV-2
E_Sarbeco_P1	ACACTAGCCATCCTTACTGCGCTTCG	100% homoloog met SARS-CoV-2
E_Sarbeco_F	ATATTGCAGCAGTACGCACACA	100% homoloog met SARS-CoV-2
N_Sarbeco_F	CACATTGGCACCCGCAATC	100% homoloog met SARS-CoV-2
N_Sarbeco_P	ACACTAGCCATCCTTACTGCGCTTCG	100% homoloog met SARS-CoV-2
N_Sarbeco_R	GAGGAACGAGAAGAGGCTTG	100% homoloog met SARS-CoV-2

Tabel 2: BLAST resultaten van de primers

De referentiesequentie die voor SARS-CoV-2 is gebruikt, is MN908947.3. Deze wordt ook gebruikt in het artikel van Corman et al. [4] Het genoom van het SARS-CoV-2 virus is gealigned tegen verschillende coronavirus-genomen om de verwantschap inzichtelijk te maken (zie bijlagen I, II, III en IV).

2.1 SARS-CoV-2 gealignd met SARS-CoV zmy 1

[illegible]

Afb. 1: SARS-CoV-2 gealigned tegen SARS-CoV zmy 1 met primers voor RdRP-gen

De RdRp_SARSr-R primer is merkwaardig omdat de sequentie van het SARS-CoV-2 virus op deze positie niet overeenkomt met de primer, en de unieke primers die kunnen worden gevormd met alle mogelijke combinaties van ambigue nucleotiden allen homoloog zijn met vleermuis-coronavirus, en niet met SARS-CoV-2. De juiste sequentie zou zijn: TATGCTAATAGTGTTTTAAACATTTG. Deze sequentie is niet terug te vinden in het artikel.

		E_Sarbeco_F	
Query	26219	AAGCACAAGCTGATGAGTACGAACCTTATGTACTCATTCGTTTCGGAAGAGACAGGTACGT	26278
Sbjct	26113	AAGCACAAGAAAGTGAGTACGAACCTTATGTACTCATTCGTTTCGGAAGAACAGGTACGT	26172
Query	26279	TAATAGTTAATAGCGTACTTCTTTTTCTTGCTTCGTGGTATTCTTGCTAGTTACACTAG	26338
Sbjct	26173	TAAATAGTTAATAGCGTACTTCTTTTTCTTGCTTCGTGGTATTCTTGCTAGTCACACTAG	26232
		E_Sarbeco_P1 E_Sarbeco_R	
Query	26339	CCATCCTTACTGCGCTTCGATTGTGTGCGTACTGCTGCAATATTGTTAACGTGAGTCTTG	26398
Sbjct	26233	CCATCCTTACTGCGCTTCGATTGTGTGCGTACTGCTGCAATATTGTTAACGTGAGTTTAG	26292

Afb. 2: SARS-CoV-2 gealigned tegen SARS-CoV zmy 1 met primers voor het gen voor het E eiwit

		N_Sarbeco_F	
Query	28684	AGCCTTGAATACACCAAAAGATCACATTGGCACCCGCAATCTGCTAACAATGCTGCAAT	28743
<u>Sbjct</u>	28555	AGCCTTGAATACACCCAAAGACCACATTGGCACCCGCAATCCTAATAACAATGCTGCCAC	28614
		N_Sarbeco_P	
Query	28744	CGTGCTACAACCTTCTCAAGGAACAACATTGCCAAAGGCTTCTACGCAGAAGGGAGCAG	28803
<u>Sbjct</u>	28615	CGTGCTACAACCTTCTCAAGGAACAACATTGCCAAAGGCTTCTACGCAGAGGGAAGCAG	28674
		n_Sarbeco_R	
Query	28804	AGGCGGCAGTCAAGCCTCTTCTCGTTCTCTATCACGTAGTCGCAACAGTTCAAGAAATTC	28863
<u>Sbjct</u>	28675	AGGCGGCAGTCAAGCCTCTTCTCGCTCTCTATCACGTAGTCGCGGTAATTCAAGAA-TTC	28733

Afb. 3: SARS-CoV-2 gealigned tegen SARS-CoV zmy 1 met primers voor het gen voor het N eiwit

Conclusie

De RdRp primerset is specifiek voor SARS-CoV-2. Er is een geringe homologie met SARS-CoV-MSY 1, waardoor aspecifieke binding en amplificatie een theoretische mogelijkheid is. De RdRp_SARSr-P1 probe wordt toegepast in de diagnostiek, terwijl deze homoloog is voor een coronavirus dat vleermuizen infecteert. De RdRp_SARSr-P2 probe is identiek met de sequentie van SARS-CoV-2 en kan worden gebruikt als verificatie dat het inderdaad om SARS-CoV-2 gaat. De primerset voor het gen voor het E eiwit is specifiek voor zowel SARS-CoV-2 als SARS CoV MSY 1. De primerset voor het N eiwit is specifiek voor SARS CoV 2. Echter de fw primer is specifiek voor SARS CoV MSY 1, de rev primer heeft een mismatch. Aangezien die aan het begin van de primer zit ver van de plek waar de amplificatie begint,, bestaat er een kans dat die toch een PCR product geeft met SARS-CoV MSY 1.

2.2 SARS-CoV-2 gealigned met SARS coronavirus Tor2

			RdRp_SARSr-F		RdRp_SARSr_P2	
Query	15418	GCTCAAGTATTGAGTGAAATGGTCATGTGTGGCGTTCACTATATGTAAAC	CAGGTGGA	15477		
Sbjct	15348	GCGCAAGTATTAAAGTGAGATGGTCATGTGTGGCGGCTCACTATATGTAAAC	CAGGTGGA	15407		
			RdRp-SARSr_R			
Query	15478	ACCTCATCAGGAGATGCCCCAACTGCTTATGCTAATAGTGTTTTTAACATTG	TCAAGCT	15537		
Sbjct	15408	ACATCATCCGGTGATGCTACAACTGCTTATGCTAATAGTGCTTTTAACATTG	TCAAGCT	15467		
Query	15538	GTCACGGCCAATGTTAATGCACTTTTATCTACTGATGGTAACAAAATGCCC	GATAAGTAT	15597		
Sbjct	15468	GTTACAGCCAATGTAAATGCACTTCTTCAACTGATGGTAATAAGATAGCT	GACAAGTAT	15527		
Query	15598	GTCGCAATTTACAACACAGACTTTATGAGTGTCTCTATAGAAATAGAGAT	GTTGACACA	15657		
Sbjct	15528	GTCGCAATCTACAACACAGGCTCTATGAGTGTCTCTATAGAAATAGGGAT	GTTGATCAT	15587		

Afb. 4: SARS-CoV-2 gealigned tegen SARS-CoV Tor2 met primers voor het RdRp-gen

			E_Sarbeco_F			
Query	26240	AACTTATGTAAGTATTCGTTTCGGAAGAGACAGGTACGTTAATAGTTAATAGCG	TAAGTAT	26299		
Sbjct	26112	AACTTATGTAAGTATTCGTTTCGGAAGAAACAGGTACGTTAATAGTTAATAGCG	TAAGTAT	26171		
			E_sarbeco_P			
Query	26300	TTTTTCTTGCTTTCGTGGTATTCTTGCTAGTTACACTAGCCATCCTTACTGCGCT	TCGAT	26359		
Sbjct	26172	TTTTTCTTGCTTTCGTGGTATTCTTGCTAGTACACTAGCCATCCTTACTGCGCT	TCGAT	26231		
			E_Sarbeco_R			
Query	26360	GTGTGCGTACTGCTGCAATATTGTTAACGTGAGTCTTGTAACCTTCTTTTACGTT	T	26419		
Sbjct	26232	TGTGTGCGTACTGCTGCAATATTGTTAACGTGAGTTTAGTAAACCAACGGTTTACG	TCT	26291		

Afb. 5: SARS-CoV-2 gealigned tegen SARS-CoV Tor2 met primers voor het gen voor het E eiwit

			N_Sarbeco_F		N-Sarbeco_P	
Query	28705	T	CACATTGGCACCCGCAAT	CTGCTAACAAATGCTGCAATCGTGCTACA	ACTTCCTCAAGG	28764
Sbict	28554	CCACATTGGCACCCGCAATCCTAATAACAATGCTGCCACCGTGCTACA	ACTTCCTCAAGG			28613
					N_Sarbeco_R	
Query	28765	AACAACATTGCCA	AAAGGCTTCTACGCAGAAGGGAGCAGAGGCGGCAGT	CAAGCCTCTTC		28824
Sbict	28614	AACAACATTGCCAAAAGGCTTCTACGCAGAGGGAAGCAGAGGCGGCAGTCAAGCCTCTTC				28673
Query	28825	TCGTTCTC	ATCACGTAGTCGCAACAGTTCAAGAAATTCAACTCCAGGCAGCAGTAGGGG			28884
Sbict	28674	TCGCTCTCATCACGTAGTCGCGGTAATTCAAGAAATTCAACTCCTGGCAGCAGTAGGGG				28733

Afb. 6: SARS-CoV-2 gealigned tegen SARS-CoV Tor2 met primers voor het gen voor het N eiwit

Conclusie:

Er is een mate van homologie van de De RdRp primerset met SARS-CoV-Tor2, waardoor aspecifieke binding en amplificatie een mogelijkheid is. Dit kan echter weer uitgesloten worden met de probe. De primers voor het E eiwit zijn specifiek voor zowel SARS-CoV-2 en SARS CoV Tor2. De forward primer voor het N eiwit is specifiek voor zowel SARS-CoV-2 en SARS CoV Tor2, de reverse primer heeft een mismatch. Aangezien die aan het begin van de primer zit ver van de annealingsite, bestaat er een kans dat die toch een PCR product geeft met SARS-CoV-2

2.3 SARS-CoV-2 gealigned met HCoV OC43

			RdRp_SARSr-F		RdRp_SARSr_P2	
Query	15422	AAGTATTGA	GTGAAATGGTCATGTGTGGCG	TTCACTATATGTTAAA	CCAGGTGGAACCT	15481
Sbict	15287	AAGTTTIGAGTGAAATTGT	ATGTGTGGTGGCTGTTATTATGTTAAGCCTGGTGCACTA			15346
					RdRp_SARSr_R	
Query	15482	CATCAGGAGATGC	CACAACTGCT	ATGCTAATAGTGT	TTTAAACATTGT	15541
Sbict	15347	GTAGTGGTGATGCAACTACTGCTTTTGCTAATTCAGTCTTTAACATA	TGTCAAGCTGTTT			15406

Afb. 7: SARS-CoV-2 gealigned tegen HCoV OC43 met primers voor het RdRp-gen

Query	26237	ACGAA-----CTTATGTA	CTCATT---CGTTTCGG-	<u>AAGAGACA-GGTACGTTA</u>	26280
Sbict	26771	GCAAATGCTGAAGCTCTTAATAACTTATTGCAACA	CTCTCTAATAGATTGGTGCTATA		26830
Query	26281	<u>ATAGTTAATAGC</u> -----G	TACTTCTTTT---CTTGCTT-TCGTG----	GTATTC	26326
Sbict	26831	A--GTTCTTCTCTACAAGAAATCTATCTAGACTT	GATGCTCTTGAAGCGGAAGCTCAGA		26888
Query	26327	TAGTT <u>ACACT-AGCCATC</u> -----CTTACTGCGCTTC	--GATT	<u>GTGT</u> -----GCGTA	26369
Sbict	26889	TAGATAGACTTATTAATGGTCGCTTACC	GCTCTTAATGCTTATGTTTCTCAACAGCTTA		26948
Query	26370	<u>CTGCTGCAATAT</u> TGTTAACGTG-AGTCTTGTA	AAACCTTCTTTTACGTTTACTCTCGTG		26428
Sbict	26949	GTGATTCTACACTGGTAAAATTAGTGCAGCACA	AGCTATGGAGAAGGTTAATGAATGTG		27008

Afb. 8: SARS-CoV-2 gealigned tegen HCoV OC43 met primers voor het gen voor het E eiwit

Query	28673	GC----AACTGAGGGAGCCTTGAATACACCAA	AAGAT	<u>CACATTGGCACC</u>	CGCAAT	CTGC	28728
Sbict	29539	GCTAGCAACC-AGGCTGATGTCAATACCCCG---	GCTGACATTGTCGATCGGGACCCAAG				29594
Query	28729	TAACAATGCTGCAATCGTGCTACA	AC--TTCCTCAAGGAACAACATTGCCA	AAAGGCTTC			28786
Sbict	29595	TAGCGATGAGGCTAT--TCCGACTAGGTTTCCG	CCTGGTACGGTACTCCCTCAGGGTTAC				29652
Query	28787	TACGCAGAAGGGAGCAGAGGCGGCAGT	<u>GAAGCCTCTTCTCGTTCTC</u>	ATC-ACGTAGTCG			28845
Sbict	29653	TATATTGAAGG---CTCAGGAAG--GTCT-GC-TC--	CTAATTCAGATCTACTTCG-CG				29702

Afb. 9: SARS-CoV-2 gealigned tegen HCoV OC43 met primers voor het gen voor het N eiwit

Conclusie: De RdRp primers hebben meerdere mismatches met HCoV OC43, het is niet waarschijnlijk dat deze een PCR product zullen geven met DNA van dit virus. De primerset voor het gen voor E eiwit heeft zo weinig homologie met DNA van het HCoV OC43 virus dat het niet waarschijnlijk is dat ze een PCR product zullen geven met dit virus. De primerset voor het gen voor N eiwit heeft zo weinig homologie met DNA van het HCoV OC43 virus dat het niet waarschijnlijk is dat ze een PCR product zullen geven met dit virus.

2.4 SARS-CoV-2 gealigned met HCoV 229E

						RdRp_SARSr-F	
Query	15395	TCTATAGA-TTAGCTAATGAGTGTGCTCAAGTATTGA	GTGAAATGGTCATGTG	---	TGGC	15450	
Sbjct	14296	T--ATAGACTTAG-TAATGAGCTTGCTCAAGTTTTGACCGAGGTTGTTTATTCAAATGGT				14352	
						RdRpSARSr P2	
Query	15451	GGTTCACATATATGTTAAAC	CAGGTGGAACCTCATCAGGAGATGC	CACAACTGCT	TATGCT	15510	
Sbjct	14353	GGGT---TTTATTTTAAACCTGGTGGTACAACCTCTGGTGATGCAACTACAGCCTACGCC				14409	
						RdRp_SARSr-R	
Query	15511	AATAGTGTTTTTAACATTGT	CAAGCTGTCACGGCCAATGTTAAT-GCACTTTTATCTAC			15569	
Sbjct	14410	AATCTGTCTTTAATATATTTCAAGCTGTAAGTTCTAACATTAATTGCATTTTGAGC---				14466	

Afb.10: SARS-CoV-2 gealigned tegen HCoV 229E met primers voor het RdRp-gen

						E_Sarbeco_F	
Query	26264	AAGAGACAGGTACGTTAATAGTTAATAGCG	ACTTCTTTTCTTGCTTTCGTGGTATTCT			26323	
Sbjct	24188	ATGTGCCA-----	TTGCTGTATTGGTCT---			24210	
						E_Sarbeco P1	
Query	26324	TGCTAGTTACACTAGCCATCCTTACTG	CGCTTCGATGTGTGCGTACTGCTGCAATATT			26382	
Sbjct	24211	--CAAG--CA-TA-----TATTGACGCAACG-TTG-----ATTGCTGTAATTTT				24248	

Afb.11: SARS-CoV-2 gealigned tegen HCoV 229E met primers voor het gen voor het E eiwit

						N_Sarbeco_F	
Query	28660	CATCATATGGGTGCAACTGAGGGAGCCTTGAATACACCAAAAGAT	CACATTGGCACCCG			28719	
Sbjct	26003	TCTCAGA---GTCGCAGTCGTGG-----TGAAT---CCAAA---TCTCAAT---CTCG				26043	
						N_Sarbeco P	
Query	28720	CAATGCTGCTAACAATGCTGCAATCGTGCTACAACTTCTCAAGGA	---ACAACATTGCCA			28777	
Sbjct	26044	GAATCCTTCAAGTGA--CAGAAACCATA--ACAG-----TCA-GGATGACATCAT-----				26088	
						N_Sarbeco R	
Query	28778	AAAGGCTTCTACGCAGAAGGGAGCAGAGGCGGCAGT	CAAGCCTCTTCTCGTTCTCTCATCA			28837	
Sbjct	26089	-----GAAGGCAGTCGCTGCGGCTCTTAAA--TCTTTAGGTTT-TGA-CA				26129	

Afb.12: SARS-CoV-2 gealigned tegen HCoV 229E met primers voor het gen voor het N eiwit

Conclusie: De RdRp primers hebben meerdere mismatches met HCoV 229E, het is niet waarschijnlijk dat deze een PCR product zullen geven met DNA van dit virus. De primerset voor het gen voor E eiwit heeft zo weinig homologie met DNA van het HCoV 229E virus dat het niet waarschijnlijk is dat ze een PCR product zullen geven met dit virus. De primerset voor het gen voor N eiwit heeft zo weinig homologie met DNA van het HCoV 229E virus dat het niet waarschijnlijk is dat ze een PCR product zullen geven met dit virus.

In het artikel van Corman et al. [4] wordt gezegd: "Following the rationale that SARS-CoV RNA can be used as a positive control for the entire laboratory procedure, thus obviating the need to handle 2019-nCoV RNA, we formulated the RdRp assay so that it contains two probes: a broad-range probe reacting with SARS CoV and 2019-nCoV." Men tracht onderscheid te maken tussen SARS-CoV-1 en SARS CoV-2 terwijl uit de alignment en de BLAST resultaten blijkt dat dit lastig, zo niet onmogelijk is met de gebruikte primersets. Verder blijkt de RdRp-SARSr-P1 probe daar helemaal niet geschikt voor te zijn aangezien deze specifiek is voor vleermuis coronavirussen. Dat is een vreemde gang van zaken voor een discriminerende test. Waarom die vleermuis er in een klinische, humane setting steeds bij wordt gehaald is niet te begrijpen. Covid-19 wordt verondersteld een zoonose te zijn van vleermuis op mens. Het lijkt logisch dat op wetenschappelijke basis te willen bevestigen, maar de relatie hiermee in een Europese setting, ver weg van de plaats van de zoonose kan zijn ontstaan, is raadselachtig. Bovendien geven de fabrikanten van kits die op de markt zijn om COVID-19 te diagnostiseren, ook aan dat het onderscheid tussen SARS-CoV-2 en SARS-Cov niet gemaakt kan worden. [14]. De RdRp-SARSr-P2 probe is echter wel specifiek voor het SARS-CoV-2 gen en heeft mismatches met de sequentie van andere humane coronavirussen.

Verder wordt kruisreactiviteit met andere humane coronavirussen in een gecontroleerde setting uitgesloten, gebruikmakend van supernatant van virusculturen. Het is aannemelijk dat de test in een gecontroleerde setting met goed uitgangsmateriaal zijn werk wel doet, wat de ringstudies ook laten zien wanneer er relatief hoge concentraties SARS-CoV-2 virus worden gebruikt, maar er moet rekening gehouden worden met het feit dat in de praktijk de omstandigheden minder rooskleurig zijn. Uit de ringstudie [7] blijkt heel duidelijk dat het HCoV 229 E virus in ca. 8% van de geteste monsters een fout-positieve uitslag geeft, al blijkt dit te herleiden tot bepaalde kits. Dat ligt buitengewoon ver af van de gewenste specificiteit van 98-99 en zelfs van 99,9% die door een RIVM medewerker wordt gesuggereerd, af. Sterker, uit de BLAST leek het op grond van de homologie niet heel waarschijnlijk dat de SARS-CoV-2 primers zouden annealen op RNA van het HCoV 229E virus. De PCR test blijkt in de praktijk dus rommelig te functioneren. Er zijn geen ringstudies bekend over de performance van de assay met andere virussen waaronder die, die zijn gebruikt voor de primer BLAST, maar er is geen reden om aan te nemen dat als dat met HCoV 229 E kan gebeuren, het niet met HCoV OC43 of een ander SARS- of coronavirus zou kunnen gebeuren.

Conclusie:

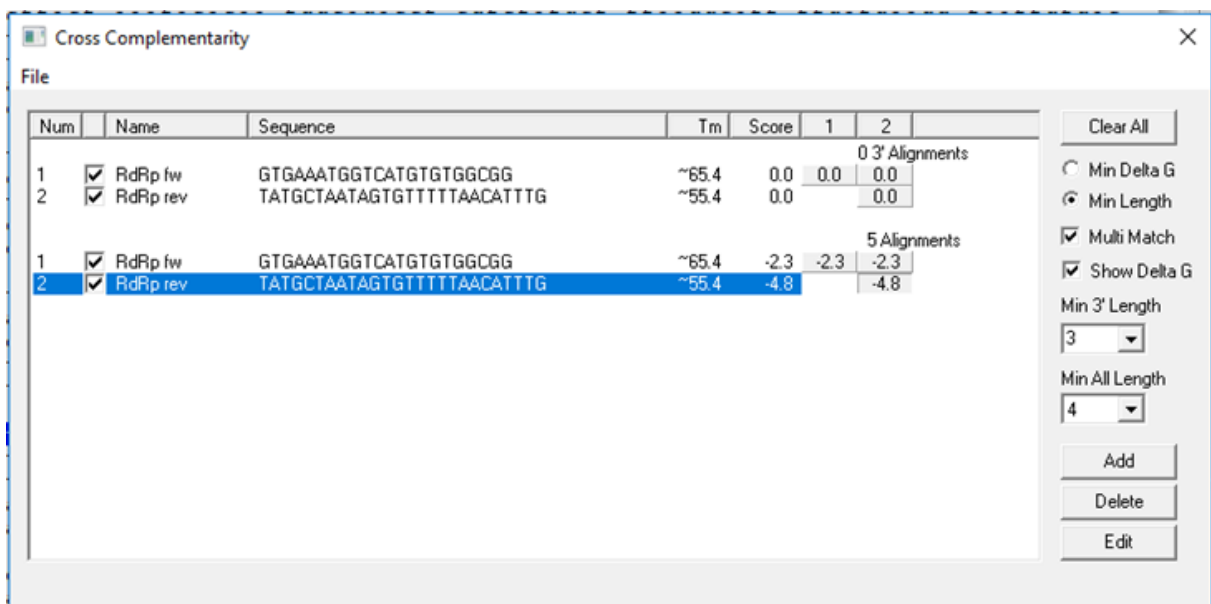
De PCR test van het E-gen kan in de praktijk het onderscheid tussen de verschillende SARS virussen niet maken. De RdRp-test kan inderdaad worden gebruikt om het SARS-CoV-2 virus te onderscheiden van andere humane coronavirussen.

3. Onderzoeken van de eigenschappen van de primers

Achtergrond

Niet alleen de specificiteit van de primers bepaalt de eigenschappen. Tijdens een PCR wordt cyclisch op verschillende temperaturen het DNA geamplificeerd. Een belangrijke stap in dit proces is de annealing: de primer klikt als een magneetje aan het genomisch DNA, waarna de amplificatie kan plaatsvinden. De temperatuur waarbij de primer annealt, is uniek voor iedere primer en wordt bepaald door de chemische en fysische eigenschappen van de primer: uit welke basen deze is opgebouwd en de lengte. Verder kunnen primers met zichzelf en elkaar een homologie hebben waardoor gedeelten van de primers aan elkaar plakken, wat het plakken aan het genomisch DNA ~~wordt~~ bemoeilijkt. Een primer gedraagt zich specifiek en betrouwbaarder in de PCR wanneer deze weinig intern aan elkaar plakt en de tijdens de PCR reactie gebruikte temperatuur voor het annealen zo dicht mogelijk bij de 'natuurlijke' annealingtemperatuur van de primer ligt. Een op zichzelf specifieke primer kan zich 'aspecifieker' gaan gedragen wanneer de omstandigheden tijdens de PCR test niet optimaal zijn.

De eigenschappen van de primers zijn onderzocht m.b.v. primer ontwerpsoftware (lightscanner primer design)



The screenshot shows a software window titled 'Cross Complementarity'. It contains a table with columns: Num, Name, Sequence, Tm, Score, 1, and 2. The table lists two primers: RdRp fw and RdRp rev. The RdRp fw primer has a Tm of ~65.4 and a Score of 0.0. The RdRp rev primer has a Tm of ~55.4 and a Score of 0.0. The table also shows 0 3' Alignments and 5 Alignments. The RdRp fw primer is highlighted in blue. The RdRp rev primer is highlighted in blue. The table also shows 0 3' Alignments and 5 Alignments. The RdRp fw primer is highlighted in blue. The RdRp rev primer is highlighted in blue.

Num	Name	Sequence	Tm	Score	1	2
1	☒ RdRp fw	GTGAAATGGTCATGTGTGGCGG	~65.4	0.0	0.0	0.0
2	☒ RdRp rev	TATGCTAATAGTGTTTTAACATTG	~55.4	0.0	0.0	0.0
1	☒ RdRp fw	GTGAAATGGTCATGTGTGGCGG	~65.4	-2.3	-2.3	-2.3
2	☒ RdRp rev	TATGCTAATAGTGTTTTAACATTG	~55.4	-4.8	-4.8	-4.8

On the right side of the window, there are several settings: 'Clear All', 'Min Delta G' (radio button), 'Min Length' (radio button), 'Multi Match' (checked), 'Show Delta G' (checked), 'Min 3' Length' (3), 'Min All Length' (4), 'Add', 'Delete', and 'Edit' buttons.

Afb 13: eigenschappen van de RdRp forward en reverse primerset

Cross Complementarity							
File							
Num	Name	Sequence	Tm	Score	1	2	
1	☒ E eiwit fw	ACAGGTACGTTAATAGTTAATAGCGT	~61.5	-5.0	-5.0	-4.1	2 3' Alignments
2	☒ E eiwit R	ATATTGCAGCAGTACGCACACA	~63.7	-4.1		0.0	
1	☒ E eiwit fw	ACAGGTACGTTAATAGTTAATAGCGT	~61.5	-4.1	-3.4	-4.1	12 Alignments
2	☒ E eiwit R	ATATTGCAGCAGTACGCACACA	~63.7	-4.1		-3.5	

☐ Min Delta G
 ☒ Min Length
 ☒ Multi Match
 ☒ Show Delta G
 Min 3' Length:
 Min All Length:

Afb 14: eigenschappen van de primerset voor het E eiwit

Cross Complementarity							
File							
Num	Name	Sequence	Tm	Score	1	2	
1	☒ N eiwit F	CACATTGGCACCCGCAATC	~63.7	-1.4	0.0	-1.4	1 3' Alignment
2	☒ N eiwit R	GAGGAACGAGAAGAGGCTTG	~61.4	-1.4		0.0	
1	☒ N eiwit F	CACATTGGCACCCGCAATC	~63.7	-3.7	-3.7	0.0	1 Alignment
2	☒ N eiwit R	GAGGAACGAGAAGAGGCTTG	~61.4	0.0		0.0	

☐ Min Delta G
 ☒ Min Length
 ☒ Multi Match
 ☒ Show Delta G
 Min 3' Length:
 Min All Length:

Afb 15: eigenschappen van de primerset voor het N eiwit

Conclusie

De berekende Tm voor de RdRp forward primer is 65°C, de Tm van de RdRp reverse primer is 55°C. Een verschil van 10°C is in de praktijk groot. Afhankelijk van de gekozen annealingtemperatuur in de PCR zal de ene of de andere primer benadeeld worden in de PCR reactie. Dit kan specifieke binding en artefacten in de hand werken. De berekende Tm voor de forward primer is 61,5°C, de Tm van de reverse primers is 63,7°C. Dit is werkbaar. De berekende Tm voor de forward primer is 63,7°C, de Tm van de reverse primers is 61,4°C. Dit is werkbaar.

De gebruikte annealingtemperatuur in het artikel is 58°C. In de praktijk wordt de kans op aspecifieke binding van een primer groter naarmate de gebruikte annealingtemperatuur verder van de T_m af komt te liggen. Er is een temperatuurbereik waarbinnen een primer specifiek is en waarbuiten deze minder specifiek is. Dit bereik moet empirisch worden vastgesteld. Wij hebben dit niet kunnen doen, maar kunnen op basis van de opgegeven primers en PCR condities wel aangeven dat dit de specificiteit in ieder geval geen goed doet. Bij de genoemde annealingtemperatuur van 58°C wordt de specificiteit van de RdRp forward (die specifiek is voor SARS-CoV-2virus) afgeremd, terwijl de specificiteit van de RdRp primer, die in potentie aan andere SARS virussen kan binden, ~~wordt~~ wordt vergroot. Bij deze testopzet wordt in theorie de kans op aspecifeke binding en dus amplificatie van artefacten of andere coronavirussen dan SARS-CoV-2 vergroot.

4. Algemene opmerkingen bij het PCR protocol

In het artikel van Corman et al. [4] wordt een virusisolaat gebruikt als uitgangsmateriaal. Dit zal een relatief hoge concentratie van intact, goede kwaliteit RNA bevatten van een bekende virusstam. Het is goed mogelijk om hiermee goede resultaten te behalen. Dergelijk materiaal zal worden gebruikt in ringstudies [7], waaruit duidelijk blijkt dat een hoge score kan worden behaald in specificiteit en sensitiviteit. In de praktijk is het uitgangsmateriaal anders: er worden veelal neusswabjes gebruikt, een procedure die vrij weinig materiaal oplevert en die lastig te standaardiseren is. Er zal minder RNA en bovendien wisselende kwaliteit RNA in aanwezig zijn. Het kan gefragmenteerd zijn waardoor de primers minder efficiënt kunnen annealen, er kunnen mogelijk meerdere virussen tegelijk aanwezig zijn in het neusslijmvlies van de patiënt. De hoge, betrouwbare scores die tijdens de ringstudies worden gehaald, zullen in het werkveld bij lange na niet gehaald worden door de aard van het uitgangsmateriaal en de heterogene situatie.

In het protocol uit het artikel van Corman et al. [4] wordt het volgende PCR programma gebruikt:

- 10 minuten incubatie op 55°C (reverse transcriptase stap om het virale RNA om te zetten in DNA dat gePCRd kan worden)
- 3 minuten op 95°C om het reverse transcriptase te inactiveren
- 15 sec op 95°C (de DNA strengen gaan door deze hoge temperatuur los van elkaar waarna de PCR reactie kan plaatsvinden)
- 30 seconden op 58°C
- Deze laatste twee stappen worden 45 cycli herhaald

45 cycli is buitengewoon hoog. In de praktijk wordt gebruik gemaakt van 30-40 cycli in een routine PCR, soms 25 voor een PCR die zeer goede resultaten geeft, maar boven de 40 cycli leert de ervaring dat er artefacten ontstaan. Het heeft geen enkele meerwaarde in de zin van hogere opbrengst aan amplicon, omdat tegelijk de zuiverheid van het amplicon achteruitgaat. Dit is een merkwaardige procedure voor een test die is bedoeld om betrouwbaar SARS-Cov-2 aan te tonen aangezien de kans op artefacten fors wordt verhoogd. Een PCR die na 35, 40 cycli nog geen betrouwbaar amplicon heeft gegeven, zelfs niet bij weinig of slecht uitgangsmateriaal, gaat dat na 45 cycli ook niet doen.

In het protocol wordt een T_m gebruikt van 58 graden, dit is laag t.o.v. de berekende T_m van de primers. Dit kan specifieke binding van de primers en daarmee vals-positieve uitslagen in de hand werken. Het protocol lijkt te zijn opgezet om maximaal amplicon te produceren, maar de specificiteit kan erbij inschieten. Aangezien de primers SARS CoV2 en SARS CoV1 niet kunnen onderscheiden, is het zeer denkbaar dat met dit protocol meerdere SARS-stammen geamplificeerd kunnen worden. Gezien de matige opzet van de PCR is het zelfs niet ondenkbaar dat andere virussen die enige homologie vertonen, in zeldzame gevallen amplificatie kunnen geven. Uit het Duitse ringonderzoek [7] blijkt dat in 8% van de onderzochte monsters HCoV 229 E een positieve reactie geeft in de door het betreffende lab gebruikte assay. (n.b. laboratoria hebben een vrije keuze in het bepalen welke test zij uitvoeren zolang zij maar voldoen aan de eisen van het kwaliteitssysteem. Dat betekent dat in een ringonderzoek verschillende labs verschillende testen zullen gebruiken die echter wel hetzelfde

resultaat dienen te geven). Het is onduidelijk hoe groot de kans op aspecifieke amplificatie van andere virussen is, maar uit de praktijk blijkt dat het mogelijk is. Over andere coronavirussen zijn geen gegevens beschikbaar, maar op basis van deze informatie is het niet ondenkbaar dat met de COVID-19 assay ook andere virussen in de praktijk een positief testresultaat kunnen geven. Dit blijft echter een speculatie.

Verder staat in het artikel een merkwaardige zin:

“The intended cross-reactivity of all assays with viral RNA of SARS-CoV allows us to use the assays without having to rely on external sources of specific 2019-nCoV RNA”

Voor een diagnostische test is ‘bedoelde kruisreactiviteit’ merkwaardig aangezien een laboratoriumtest een ondubbelzinnig resultaat wordt geacht te geven. Als assay wordt aanbevolen als eerste stap het E eiwit-gen te amplificeren, gevolgd door een bevestiging met primers voor het RdRp-gen. Dit is een merkwaardige gang van zaken, aangezien de primers voor het E eiwit specifiek zijn voor SARS-CoV-2, SARS-CoV MSY 1 en SARS CoV Tor2, en voor de RdRp test geen voor SARS CoV-2 passende reverse primer wordt genoemd in het artikel. Verder biedt de RdRp probe de mogelijkheid om vleermuiscoronavirus uit te sluiten. Vanuit een klinische situatie is dit hoogst merkwaardig, aangezien een vleermuiscoronavirus niet heel snel in de bevolking zal opduiken. Om het nog merkwaardiger te maken wordt even later gesuggereerd dat labs ook alleen het RdRp gen kunnen amplificeren. De test voor het detecteren van het N eiwit wordt later niet meer genoemd, kennelijk omdat deze niet zulke goede of betrouwbare resultaten gaf. Er wordt opgemerkt dat de test is uitgevoerd op bekende virusstammen die geen polymorfismen bevatten. In de praktijk moet rekening gehouden worden met de hoge mutatiesnelheid van het virus. De kans bestaat dat een mutatie ontstaat op de plek waar een primer annealt, waardoor deze minder efficiënt amplificeert of zelfs geheel uitvalt. Hierdoor zouden covid-19 gevallen kunnen worden gemist doordat een vals-negatieve uitslag wordt gegenereerd.

Conclusie

Het PCR programma werkt aspecificiteit in de hand door een hoger aantal cycli te gebruiken dan in de praktijk wordt aangehouden en een vrij lage annealingtemperatuur voor de gebruikte primers toe te passen. Dit werkt artefacten in de hand. Uit ringstudies blijkt dat deze inderdaad kunnen voorkomen.

5. Sensitiviteit en specificiteit van PCR testen

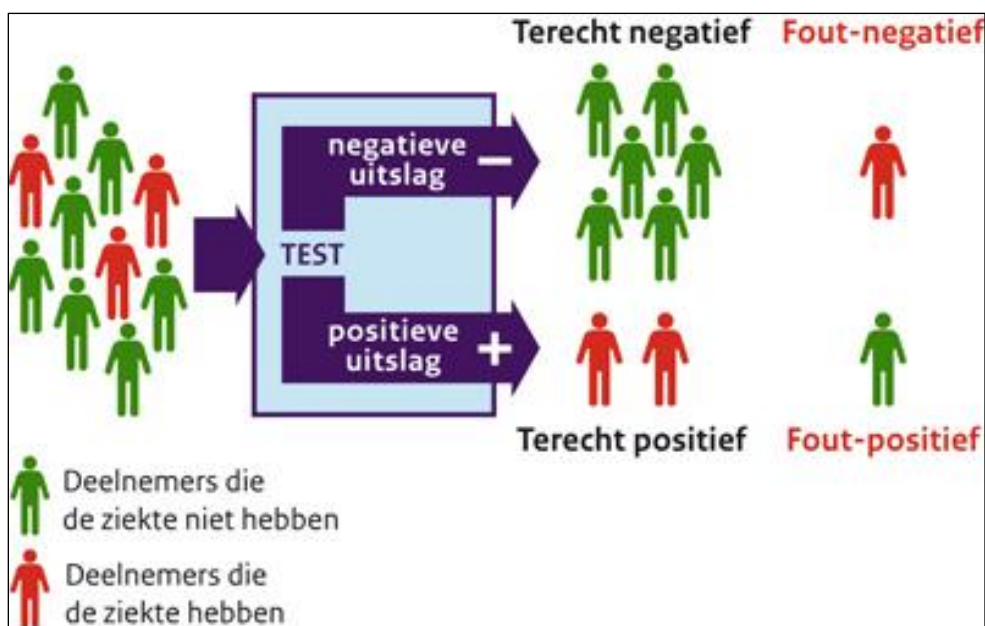
Een laboratoriumtest moet het onderscheid kunnen maken tussen twee groepen: ziek en niet ziek, en dat met een zo laag mogelijke foutmarge. Hoe goed een test het onderscheid kan maken tussen twee groepen, hangt nauw samen met de testeigenschappen: specificiteit en sensitiviteit. In het onderstaande bespreken we eerst de uitslagen die een test kan geven en gaan we vervolgens in op de testeigenschappen. Onderstaande tekst en afbeeldingen zijn overgenomen van de website van het RIVM. [5]

5.1 Mogelijke testuitslagen

Een test levert in het ideale geval twee mogelijke uitslagen op:

- De uitslag is “niet-afwijkend” of “negatief”: de test geeft aan dat de deelnemer de ziekte niet heeft.
- De uitslag is “afwijkend” of “positief”: de test geeft aan dat de deelnemer de ziekte of toestand wel heeft. Vervolgonderzoek kan nodig zijn om dat te bevestigen.

Maar de uitslag kan verschillen van de werkelijkheid.



Afb. 16: een laboratoriumtest met fout-positieve en fout-negatieve uitslagen

Er zijn de volgende mogelijkheden:

- Uitslag is terecht negatief: ('u bent niet ziek') als de deelnemer de ziekte ook echt niet heeft. Deze mensen zijn terecht opgelucht.
- Uitslag is terecht positief: ('u bent ziek') als de deelnemer de ziekte ook echt heeft. Dit zijn de mensen die de screening wil opsporen.
- Uitslag is fout-positief: ('u bent ziek'), als bij vervolgonderzoek blijkt dat iemand de ziekte niet heeft. In het figuur is dit het groene poppetje rechtsonder in de figuur. Deze mensen zijn

onterecht ongerust gemaakt. De meeste mensen zijn opgelucht als verder onderzoek geen afwijkingen vindt. Een klein deel van de mensen blijft toch ongerust.

- Fout-negatief: ('u bent niet ziek') als de deelnemer de ziekte wel heeft. In het figuur is dit het rode poppetje rechtsboven in het figuur. Deze mensen worden onterecht gerustgesteld. Het gevolg kan zijn dat deze mensen bij klachten te laat naar de huisarts gaan of doorgaan met ongezond gedrag (bijvoorbeeld roken). Na een periode van opluchting volgt de teleurstelling als de ziekte alsnog gediagnosticeerd wordt.

5.2 Testeigenschappen

De testeigenschappen zijn van grote invloed op het succes van screenings en bevolkingsonderzoeken.

Sensitiviteit

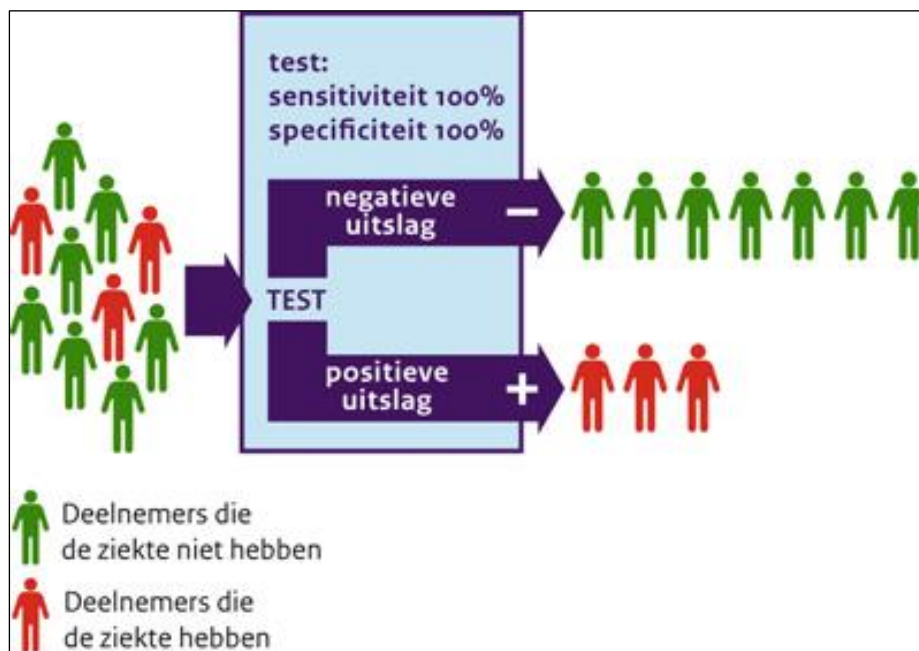
De sensitiviteit van een test is de kans dat de test een uitslag "positief" of "afwijkend" geeft bij mensen die de ziekte hebben. Of anders gezegd: de sensitiviteit van een test is het percentage terecht positieve uitslagen onder de zieke personen. Hoe hoger de sensitiviteit is, hoe beter de test zieke mensen opspoot. In de praktijk is een sensitiviteit van ca. 98-99% voor een laboratoriumtest het hoogste haalbare.

Een test met een lage sensitiviteit mist veel deelnemers die de ziekte wel hebben. Zij krijgen onterecht een fout-negatieve uitslag.

Specificiteit

De specificiteit van een test is de kans dat de test een uitslag "negatief" of "niet-afwijkend" geeft bij mensen die de ziekte niet hebben. Of anders gezegd: de specificiteit van een test is het percentage terecht negatieve testuitslagen onder de niet-zieke personen. Hoe hoger de specificiteit is, hoe beter de test gezonde mensen als gezond aanwijst.

Een test met een lage specificiteit geeft ook aan veel gezonde deelnemers de uitslag dat ze ziek zijn. Zij krijgen onterecht een fout-positieve uitslag. Evenals de sensitiviteit bedraagt de specificiteit nooit 100%.

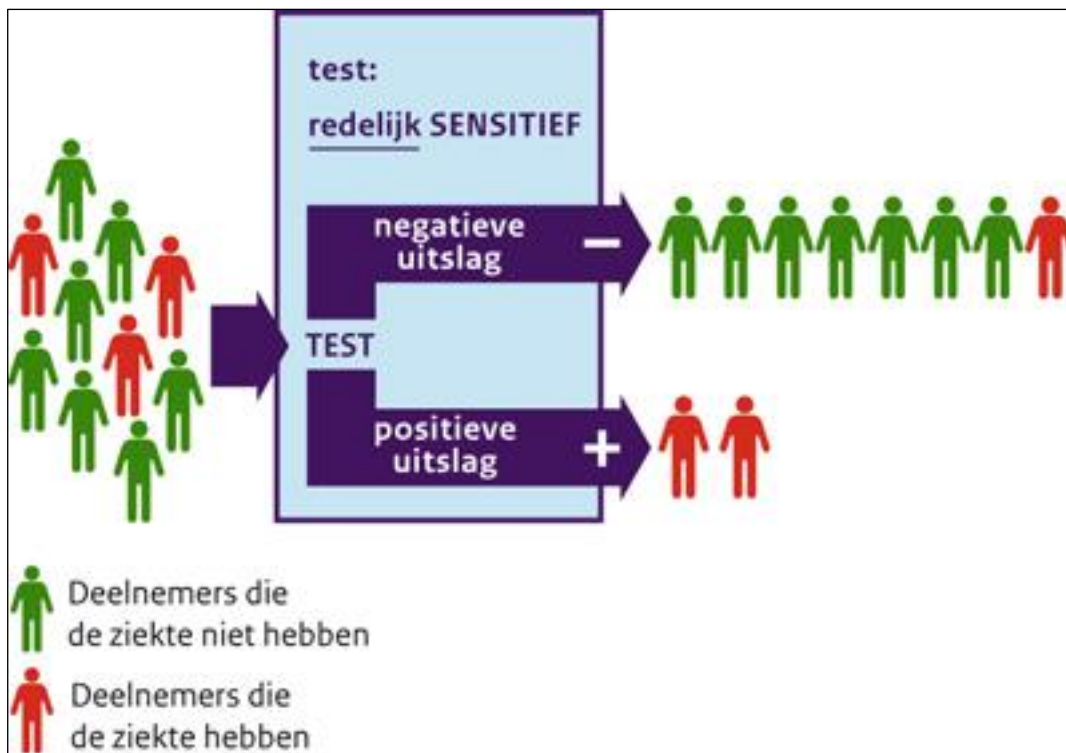


Afb. 17: een laboratoriumtest met een sensitiviteit en specificiteit van 100% (Puur theoretisch)

Keuze test: afwegen tussen sensitiviteit en specificiteit

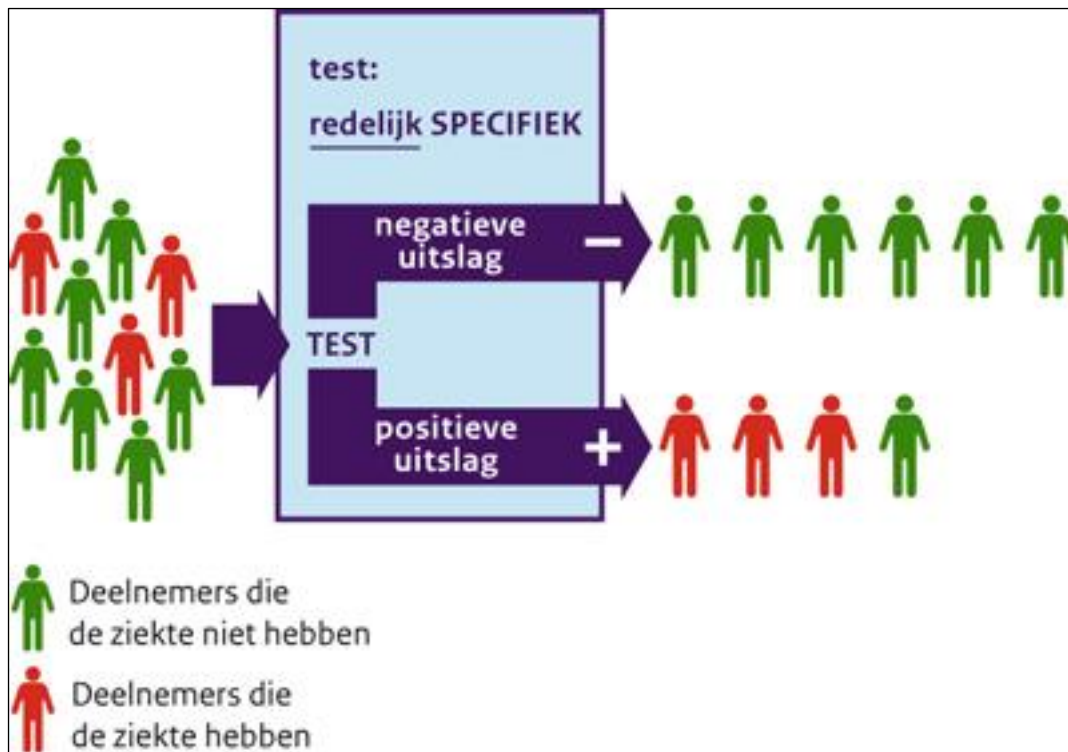
Bij de keuze van een test moeten sensitiviteit en specificiteit tegen elkaar worden afgewogen. Beslissingen hebben gevolgen voor het aantal fout-positieve en fout-negatieve uitslagen.

- Test is erg sensitief: Hoe gevoeliger (sensitiever) de test hoe beter de zieke deelnemers (de rode poppetjes rechtsonder in de figuur) worden gevonden: zij krijgen terecht een afwijkende of positieve uitslag ('u bent ziek').
- Test is redelijk sensitief: Een minder sensitieve test mist zieke deelnemers: zij krijgen een fout-negatieve uitslag ('u bent niet ziek'), terwijl ze de ziekte wel hebben. Dit is het rode poppetje rechtsboven in het figuur.
De uitslag 'positief' klopt wel: de deelnemers hebben inderdaad de ziekte (de rode poppetjes rechtsonder in de figuur).



Afb. 18: een laboratoriumtest met een redelijke sensitiviteit

- Test is erg specifiek: Hoe specifiekere de test, hoe beter de test gezonde mensen als gezond aanwijst: de groene poppetjes rechtsboven in de figuur. Zij krijgen terecht een uitslag "niet-afwijkend" of "negatief".
- Test is redelijk specifiek: Bij een minder specifieke test krijgen ook gezonde deelnemers een afwijkende of positieve uitslag ('u bent ziek'). Zij krijgen dus een fout-positieve uitslag. Deze mensen maken zich onnodig ongerust en ondergaan onnodig vervolgonderzoek. Dit is het groene poppetje rechtsonder in het figuur. De uitslag 'negatief' klopt wel: de deelnemers hebben de ziekte inderdaad niet (de groene poppetjes rechtsboven in de figuur).



Afb. 19: een laboratoriumtest met een redelijke specificiteit

5.3 Testeigenschappen bij bevolkingsonderzoek

Voor alle screenings geldt dat bij de keuze van de test de gewenste sensitiviteit en specificiteit moeten worden overwogen. Specificiteit verwijst naar de mensen die niet ziek zijn. Dit zijn er bij een bevolkingsonderzoek altijd relatief veel. Kleine variaties van de specificiteit hebben dan gevolgen voor veel mensen. Aan het bevolkingsonderzoek naar baarmoederhalskanker bijvoorbeeld nemen ieder jaar ongeveer 500.000 vrouwen deel. Een test met een specificiteit van 98% betekent dat ieder jaar 10.000 gezonde vrouwen onterecht een verwijzing krijgen voor verder onderzoek. Zij zijn onterecht een tijdje ongerust. Een aantal van hen blijft onterecht ongerust. Variaties in sensitiviteit hebben gevolgen voor minder mensen. Sensitiviteit verwijst naar de mensen die ziek zijn. Dit zijn er bij een bevolkingsonderzoek meestal relatief weinig. Zelfs grote variaties van de sensitiviteit hebben dus slechts gevolgen voor een beperkt aantal mensen. De gevolgen zijn voor hen wel groot: ze krijgen onterecht de boodschap dat ze de aandoening niet hebben. In het kader van de grootschaligheid van PCR testen speelt ook de betrouwbaarheid een grote rol, zeker als het gaat om personen met milde klachten. Een foutmarge van 2% levert op 500.000 testen ~~geeft~~ immers een kans op 10.000 foute testuitslagen.

5.4 De sensitiviteit van de COVID-19 PCR test

Het RIVM is bekend met het effect van een lage foutmarge bij grote aantallen uitgevoerde testen. Zij schrijft daar over op haar website [6] het volgende:

“Grootschalig testen van asymptomatische personen met behulp van RT-PCR kan helpen om mensen zonder klachten op te sporen, maar ook aanleiding geven tot relatief veel fout-positieve testuitslagen.

In het algemeen geldt dat, ook bij testen met een zeer hoge specificiteit zoals de SARS-CoV-2 PCR, een positief testresultaat in een populatie met een lage incidentie niet altijd wijst op een SARS-CoV-2-infectie, zeker als zwak positieve uitslagen worden verkregen. Met andere woorden, er is een lage positief voorspellende waarde.”

Samenvattend komt het RIVM tot de volgende bezwaren voor het uitvoeren van PCR testen op grote schaal:

“Hieronder staan de bezwaren van grootschalig aselect testen van asymptomatische personen in de algemene populatie kort samengevat:

- *Negatieve testen kunnen aanleiding geven tot een gevoel van schijnveiligheid*
- *Van het aantal positieve testen kunnen er relatief veel fout-positief zijn.*
- *Het aantonen van een lage virusload kan leiden tot verwarring over de te nemen acties, bijvoorbeeld wel of niet in quarantaine. Lage virus loads duiden zeer waarschijnlijk op een fase zonder besmettelijkheid.*
- *Standaard screenen van asymptomatische personen zal een zeer lage opbrengst hebben en daarmee leiden tot inefficiënt gebruik van testcapaciteit.*
- *De detectie kan het gevolg zijn van restmateriaal van het virus van een besmetting in het verleden en heeft dus geen relevantie in het heden”*

Het RIVM geeft dus zelf toe dat de PCR test voor de diagnostiek van COVID-19 bezwaren kent. Door de hoge aantallen geteste personen sinds de uitgebreide testcapaciteit vanaf juni en lage prevalentie van COVID-19 komt het aantal positief geteste personen in veel gevallen niet boven de foutmarge van 1 à 2% uit die voor de meeste laboratoriumonderzoeken geldt. Dit is merkwaardig, aangezien de PCR test op dit moment als gouden standaard wordt beschouwd met de motivatie ‘dat dit het beste is wat we hebben’.

5.5 Eigen onderzoek naar de specificiteit van de COVID-19 PCR test

Het Zwitsers instituut Finddx geeft ons een goede indicatie hoe (on)betrouwbaar de testuitslagen van de PCR test kunnen zijn bij bevolkingsonderzoeken (zie afb. 20). [8],[9]. Bij een prevalentie (= de mate waarin een infectie voorkomt in een populatie) van 2% is zelfs in het “high performance” scenario de PPV, de positief voorspellende waarde, maar 49,2% (zie voorlaatste kolom van de tabel). Dat betekent dat maar 1 van de 2 personen die een positieve uitslag krijgt ook daadwerkelijk besmet is. In het “low performance scenario is die PPV 9,3%, dus maar 1 van de 11 personen die een positieve testuitslag krijgt is dan daadwerkelijk besmet; 10 personen krijgen derhalve een fout-positieve uitslag. De prevalentie in Nederland ligt evenwel veel lager dan 2% (ergens in de orde van grootte van 0,01% – 0,2%) en de PPV daalt zoals de tabel laat zien naarmate de prevalentie daalt.

“Naast sensitiviteit is specificiteit erg belangrijk. Deze parameter geeft een indicatie voor het deel te verwachten fout-positieve uitslagen; de test zegt positief maar het blijft onzeker of het virus ook echt aanwezig is omdat bijvoorbeeld een herhaling of een bevestiging negatief is. Ook deze parameter is niet 100% maar zit er wel heel dicht bij. Ondanks dat zullen er bij een specificiteit van 99.9% (wat heel hoog is) als er 10.000 testen worden uitgevoerd ~~worden~~ zijn er ongeveer 10 ~~zijn~~ die niet bevestigd kunnen worden met een andere test of die na herhaling negatief zijn. Dergelijke testresultaten

worden uiteindelijk als negatief beschouwd. Fout-positieve uitslagen worden er dus inderdaad uitgehaald. Mocht de patiënt klachten houden of worden deze erger dan kan er van dezelfde patiënt een nieuw monster getest worden. “

De hier genoemde schatting is buitengewoon optimistisch, in aanmerking genomen dat de sensitiviteit en specificiteit aanzienlijk dalen bij grootschalig testen bij lage prevalentie. Bovendien wordt op de website van het RIVM wel verwezen naar een validatierapport voor de serologische test [15], maar is een validatierapport van de PCR test niet te vinden. Daardoor is de claim dat de specificiteit van de PCR test 99,9% is, niet te controleren.

Het reproductiegetal R wordt sinds 11 juni gekoppeld aan het aantal positief geteste personen in plaats van ziekenhuisopnames. Op de vraag *Kan op basis van de PCR test bepaald worden of mensen daadwerkelijk besmettelijk zijn? Welk percentage van de positief geteste personen is daadwerkelijk besmettelijk? Als niet besmettelijke personen ook meegerekend worden in de bepaling van R, Is dit dan nog een goede maatstaf om de noodmaatregelen te versoepelen of te verstrengen? Zo ja, waarom?* kregen wij het volgende antwoord:

De PCR test zal ook personen als positief oormerken die mogelijk niet besmettelijk zijn. De test voor besmettelijkheid is zeer bewerkelijk, langdurig en daarbij erg ongevoelig. Dat betekent dat als we deze test zouden gebruiken voor COVID diagnostiek we minder mensen kunnen testen, dat mensen langer op de uitslag moeten wachten en dat we vanwege de geringe sensitiviteit veel meer fout-negatieve uitslagen zouden krijgen. Voorlopig zullen we het met de PCR test moeten doen die over het algemeen goede prestaties levert. Als we meer kennis over deze infectie vergaren, kunnen we in de toekomst hopelijk een afkapwaarde voor de PCR definiëren die correleert met de besmettelijkheid van de geteste persoon.

Het is opmerkelijk dat snel testen te prefereren lijkt boven grondig testen en dat men vals-positieven gemakkelijker voor lief neemt dan vals-negatieven, temeer daar het aantal positief geteste personen de basis is om het beleid vorm te geven. Dit betekent dat men een groot aandeel vals-positieve uitslagen dus kennelijk voor lief neemt in de rapportage naar de regering, ook als dit betekent dat er beleid bepaald kan worden over een aantal besmettingsgevallen dat in werkelijkheid lager ligt. Kennelijk geeft men er ook de voorkeur aan mensen snel een uitslag te geven dan werkelijk uit te sluiten dat iemand drager is van het SARS-CoV-2 virus. Deze handelwijze lijkt op het eerste gezicht misschien een geste naar de bevolking toe, maar kan ons op de lange termijn duur komen te staan omdat nodeloos restrictief beleid wordt geïmplementeerd op basis van vals-positieve uitslagen.

*Het RIVM, Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu, gebruikt modellen om te berekenen hoe snel een infectieziekte zich verspreidt onder een groep mensen. Een rekenmodel is een versimpelde weergave van de werkelijkheid. Het is een gebruikelijke manier om te onderzoeken wat het mogelijke effect is van maatregelen. Het is belangrijk voorzichtig te zijn met het trekken van conclusies op basis van zo'n berekening; er zijn altijd mitsen en maren. Zeker voor nieuwe ziekten zoals het nieuwe coronavirus. Want hierover zijn nog veel dingen onduidelijk. Hoe meer we weten over het virus en de verspreiding, hoe beter de berekeningen aansluiten bij de werkelijkheid. Als er veel onzekerheid is over bepaalde gegevens, berekenen we veel verschillende mogelijkheden. Naarmate we meer kennis opdoen, vallen steeds meer mogelijkheden af. De berekeningen die overblijven worden dan waarschijnlijker. **Het belangrijkste uitgangspunt van het rekenmodel is dat de ziekte besmettelijk is. Bij het doen van de berekeningen kijken we onder andere naar besmettelijkheid en verspreiding van het virus: hoe lang duurt het voordat iemand besmettelijk is, hoe lang is iemand daadwerkelijk besmettelijk en hoeveel andere mensen besmet iemand? Dat uitgangspunt verandert niet, ook niet als een deel van de positief geteste mensen niet besmettelijk is.***

In de vet-cursieve alinea wordt een opmerkelijke uitspraak gedaan: voor het reproductiegetal is de besmettelijkheid belangrijk, en men doet de aanname dat een positief getest persoon besmettelijk is, terwijl men eerder toegeeft dat een positief getest persoon niet besmettelijk hoeft te zijn. Het RIVM neemt naar eigen zeggen vanwege tijd en praktische redenen de moeite niet ~~neemt~~ om te achterhalen of een positief getest persoon daadwerkelijk besmettelijk is. Vervolgens wordt deze persoon kennelijk in de statistieken opgenomen als 'besmet' en 'besmettelijk' terwijl dat geenszins het geval hoeft te zijn. Het RIVM heeft immers zelf toegegeven dat ook op oude virusresten een positieve uitslag kan ontstaan.

Op de vraag Hoe kunnen jullie binnen 24-48 uur testresultaten bekend maken? Hoe wordt de monsterverwerking verricht bij de landelijke coronatesten? Hoe diepgaand wordt er naar het amplicon gekeken? Wat is de methode waarmee het 'positieve signaal' is verkregen?" Komt het volgende antwoord:

De coronavirus PCR is een zogenaamde real-time PCR reactie waarbij er tijdens elke cyclus van de reactie hybridisatie van het gevormde DNA met een virus-specifieke probe plaatsvindt. De interactie van het DNA met de probe wordt iets later in elke cyclus uitgelezen waardoor het mogelijk is om letterlijk in real-time de reactie te volgen. Daarmee is aan het eind van de PCR, die ongeveer een uur duurt, meteen het resultaat bekend. Aanvullende bepalingen zoals sequentie analyse of gel elektroforese van het amplicon zijn niet noodzakelijk.

Deze gang van zaken, in combinatie met het niet bevestigen/uitsluiten van de besmettelijkheid van positief geteste personen en de interne onduidelijkheid over de werkelijke specificiteit van de PCR test wordt nog verontrustender gemaakt door het feit dat de uitslag direct weggaat op basis van de PCR test en hier geen vervolgonderzoek zoals sequentieanalyse of serologisch onderzoek wordt gedaan om de specificiteit en sequentie van het amplicon te beoordelen.

Hieronder volgt een samenvatting van een interview met dhr Martin Voerknecht (huisarts) door dhr Mario Ortiz Buijsse (biochemicus, moleculair bioloog).

Sinds we massaal mogen testen op Corona besmetting zijn we gelukkig veilig! We hebben zekerheid! Of niet?!... Ik zal uitleggen waarom het een schijnzekerheid van "wel of niet besmet" is. De corona PCR testen hebben de eigenschap, dat ze vaak terecht "besmette" mensen aanwijzen, FIJN, maar soms ook ten onterechte mensen als 'positief' aanwijzen, helaas. Dit werd netjes getest in Duits onderzoek. (Voor wie niet het hele onderzoek wil lezen: pagina 20 bevat de uitkomst van de negatieve monsters die toch positief testen) De specificiteit van de testen bleek 92,4% tot 98,6%. Laten we ~~nemen~~ voor ons voorbeeld het beste resultaat nemen : 1,4% fout dus.

Daarnaast werd al eerder bekend dat maar ca 70% van de "besmette" mensen met de PCR test positief test. Het kan liggen in de monsterafname, het stadium van ziek zijn, of de plek van monsterafname. Diverse foutbronnen zijn mogelijk. In ziekenhuizen moest vaker al een test meerdere malen herhaald worden, voor een op CT bewezen Corona patiënt (lage CT waarde eis), daadwerkelijk positief testte. Dit noemen we de sensitiviteit (die is dus ongeveer 70%).

Stel dat nu 10.000 mensen langs de GGD gaan om te testen (waarvan het overgrote deel momenteel hooikoorts en geen Corona heeft) en er zijn naar schatting nu maximaal 20 patiënten met COVID bij deze 10.000 geteste mensen. Dan vinden we 70 % van de 20 , dus ongeveer 14. Maar: 6 van de 20 patiënten lopen ten onrechte met een veilig gevoel door.

98,6% van de niet-zieke mensen krijgt te horen dat ze niet ziek zijn (TOP!), maar ook 1,4% hoort ten onrechte dat ze wel besmet zijn! Dan krijgen we dus 140 ten onterechte positieve uitslagen op basis van de specificiteit.

We geven dus 14 patiënten een correcte uitslag maar helaas ook 146 (!) (TIEN MAAL ZOVEEL MENSEN) een verkeerde waarvan 140 dan 14 dagen ten onrechte met hun familie in quarantaine mogen en 6 besmette mensen die zich veilig wanen lopen door.

Kortom bij deze huidige lage prevalentie zegt de testuitslag vaker niet de waarheid dan dat er een zinnig resultaat uit komt..

Coronatesten betrouwbaar? Trek uw eigen conclusie.... [11],[12]

5.6 Conclusie

RIVM concludeert terecht dat het grootschalig testen van personen met milde klachten geen meerwaarde heeft. De testuitslag leidt er toe dat een groot aantal positief geteste personen onterecht in quarantaine gaan of een verkeerde behandeling krijgt. Als zij dit zelf aangeven, is het des te merkwaardiger dat deze feiten in de praktijk worden genegeerd en zelfs aanleiding geven tot beleid dat voor de burger restrictief is. Verder laat de testopzet te wensen over aangezien er een interne verdeeldheid lijkt te bestaan over de werkelijke specificiteit van de test. Bovendien is het rekenmodel voor het reproductiegetal gewijzigd waardoor de data van het eerste en tweede half jaar van 2020 niet met elkaar kunnen worden vergeleken. Dit omdat in de eerste helft relatief kleine aantallen vooral symptomatische personen werden getest, en in de tweede helft veel grotere aantallen vooral asymptomatische of licht symptomatische personen werden getest waarbij de stijgende foutmarge van een test bij lage prevalentie een grote rol gaat spelen. Verder is het leveren van de uitslag op basis van PCR amplificatie zonder vervolgonderzoek een weinig vertrouwenwekkende praktijk in het licht van de wankelende specificiteit van de test. We hebben alle reden om te twijfelen aan de aantallen positief geteste personen in de tweede helft van 2020 die de zogenaamde tweede golf uitmaken:

- Zij hebben een relatief groot percentage fout-positieven.
- Er bestaat een grotere kans in vergelijking met de eerste helft van het jaar dat amplificatie van oude, dode virusresten plaatsvindt.
- Door de enorme opschaling van de testen is de kwaliteit van het proces veel minder goed te bewaken.
- Er lijkt binnen het RIVM dus geen consensus te bestaan over de werkelijke specificiteit van de COVID-19 PCR test zoals toegepast in de teststraten van de GGD. Al deze feiten dragen bij aan een laag vertrouwen in de specificiteit van de de COVID-19 PCR test.

Cohort	Pre-test probability (prevalence)	Sensitivity	Specificity	Cases	Non-cases	True positive (TP)	False negative (FN)	True negative (TN)	False positive (FP)	PPV	NPV
High performance											
1,000	2.0%	95%	98%	20	980	19	1	960	20	49.2%	100%
1,000	5.0%	95%	98%	50	950	48	2	931	19	71.4%	100%
1,000	10.0%	95%	98%	100	900	95	5	882	18	84.1%	99%
1,000	30.0%	95%	98%	300	700	285	15	686	14	95%	98%
Mid performance											
1,000	2.0%	85%	90%	20	980	17	3	882	98	14.8%	100%
1,000	5.0%	85%	90%	50	950	43	8	855	95	30.9%	99%
1,000	10.0%	85%	90%	100	900	85	15	810	90	48.6%	98%
1,000	30.0%	85%	90%	300	700	255	45	630	70	78%	93%
Low performance											
1,000	2.0%	75%	85%	20	980	15	5	833	147	9.3%	99%
1,000	5.0%	75%	85%	50	950	38	13	808	143	20.8%	98%
1,000	10.0%	75%	85%	100	900	75	25	765	135	35.7%	97%
1,000	30.0%	75%	85%	300	700	225	75	595	105	68%	89%

The expected prevalence of active or previous COVID-19 infection will vary across populations being tested and is therefore an important consideration when selecting tests and interpreting results. Example prevalence ranges for some target populations are summarized below.

Target population	Example prevalence range
Symptomatic healthcare workers	High to very high (10 – ≥ 30%)
Healthcare workers with significant exposure	High (10%)
Contacts of index patient	Low to high (2 – 10%)
Community testing/contact tracing of hotspots	Medium to high (5 – ≥ 10%)
Symptomatic general population	Low (2%)
Asymptomatic general population	Very low to low (≤ 2%)

Afb 20: de foutmarges van de COVID-19 PCR test van Findxx

6. Opmerkingen over de interpretatie van de COVID-19 PCR test

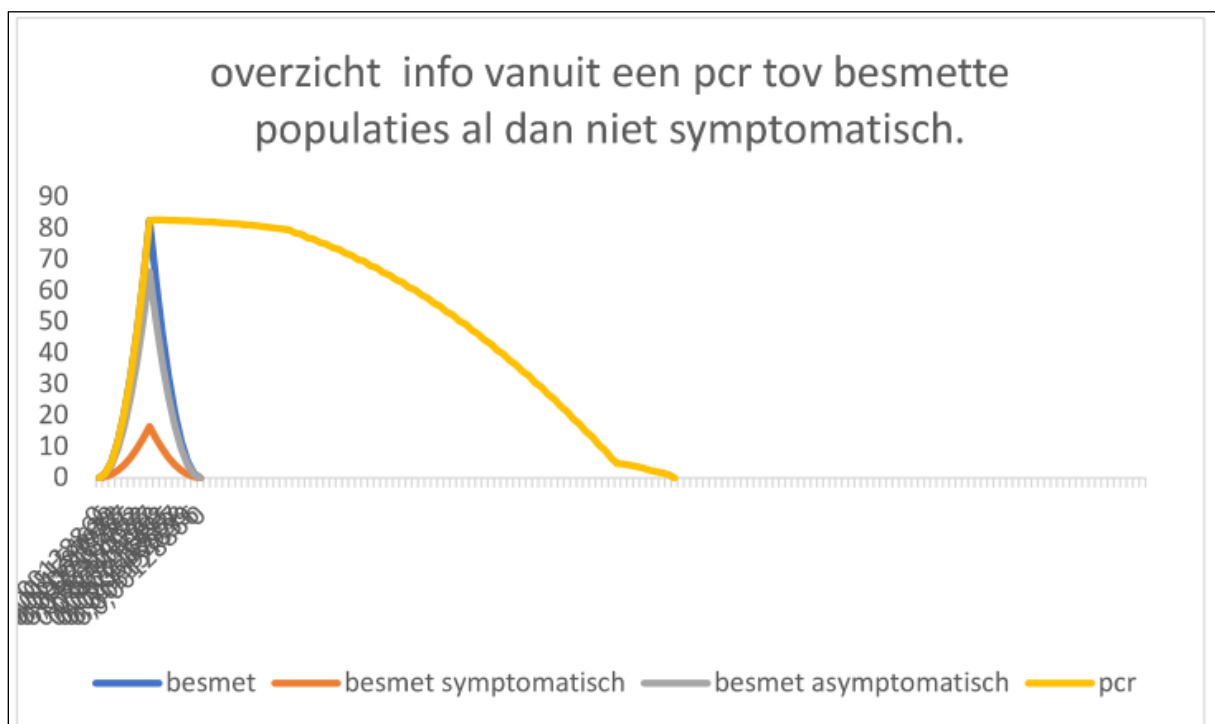
Een positieve testuitslag wordt vertaald naar de klinische sfeer en dat de persoon als 'patiënt' geldt. De landelijke media hebben dit overgenomen en benoemen de positief geteste individuen als 'besmettingen'. Deze sprong is kort door de bocht en niet relevant, aangezien een PCR test al vanaf 3 kopieën van het genoom in staat is te amplificeren. [14] Bij 3 kopieën kan men toch op geen enkele manier spreken van een hoge viral load! Daarbij kan een PCR test het onderscheid niet maken tussen een gepasseerde infectie waarbij nog virusresten aanwezig zijn in de slijmvliezen, een asymptomatische drager die lage hoeveelheden niet vermeerderend virus bij zich draagt, een besmettelijke presymptomaat en een zieke en een herstellende zieke die niet besmettelijk meer is. Het RIVM geeft dit zelf ook aan.

De PCR test wordt op dit moment beschouwd als de standaard voor de COVID-19 diagnostiek. Daarbij is het merkwaardig dat de Ct waarde (het aantal PCR cycli dat nodig is om boven de detectiewaarde uit te komen) als een graadmeter voor de besmettelijkheid van het virus/viral load wordt gezien. Het is een empirisch gegeven dat PCR niet geschikt is om kwantitatief te meten aangezien de efficiëntie van de PCR door zeer veel factoren wordt bepaald, waaronder de stringentie van de PCR condities, pipetteer- en nauwkeurigheden, inconsistenties in de monsterkwaliteit en toevalsfactoren die optreden bij de amplificatie. Er lijkt sprake te zijn van een omgekeerd verband: studies laten zien dat er weliswaar een lagere Ct waarde bij zieke en besmettelijke patiënten wordt waargenomen dan bij patiënten met een gepasseerde infectie [19], maar daarmee is nog niet gezegd dat de Ct waarde ook daadwerkelijk een diagnostische waarde heeft die kan worden gebruikt om besmettelijkheid aan te tonen. Uit studies [22][23] blijkt dat er geen duidelijk verschil zit in de Ct waarde wanneer diverse patiëntenmaterialen (BAL, sputum, neusswab, keelswab, feces) worden gebruikt, maar dat de betrouwbaarheid van de PCR test wel het hoogst is op BAL gevolgd door sputum. Neus- en keelswabs hebben een lagere betrouwbaarheid. Er is dus geen correlatie tussen positiviteit van de test van Ct-waarde. Er is een verband tussen het stadium waarin het ziekteverloop zich bevindt en de Ct waarde [19], maar andersom kan een Ct waarde niet worden gebruikt om ziektestadium of besmettelijkheid te herleiden. Binnen de labinterpretatie wordt gesteld dat een Ct waarde >35 dubieus is en een herhaling behoeft, of wanneer de curve niet S-vorming is. In de praktijk wordt niet verder gegaan dan 35-30 cycli, aangezien bij hogere aantallen cycli de kans op het amplificeren van artefacten fors groter wordt. In protocollen die online beschikbaar zijn gesteld voor de diagnostiek van COVID-19 wordt gesteld dat een Ct waarde gebruikt kan worden van 45 resp. 50 cycli [4][17]. Dit komt de specificiteit niet ten goede. Dit lijkt weliswaar in de Nederlandse labs niet te gebeuren, maar de aanbeveling is hoogst merkwaardig, temeer daar deze van de WHO zelf afkomstig is.

Er is met uitzondering van de extreme, zeldzame complicaties horend bij COVID-19 geen ziektebeeld dat uitsluitend bij COVID-19 hoort. Het feit dat mensen symptomatisch zijn, maakt deze personen nog niet tot een subpopulatie met een verhoogde kans om SARS-CoV-2 aan te tonen. Bij bron- en contactonderzoeken wordt het hoogste percentage positieve uitslagen gevonden [24]. Hier is wel sprake van een subpopulatie met een duidelijke verdenking van COVID-19. In feite wordt er buiten de bron- en contactonderzoeken om random getest binnen de bevolking waarbij men moet

bedenken dat niet iedereen die met het virus in aanraking komt ook symptomen ontwikkelt. Een groep potentiële virusdragers wordt op grond daarvan niet getest, terwijl de symptomen maar een kleine kans hebben dat hun klachten werkelijk door het SARS-CoV-2 virus worden veroorzaakt.

Er zijn veel subpopulaties aan te wijzen in de groep 'test positief voor COVID-19', terwijl daar in het beleid op geen enkele manier rekening mee wordt gehouden. De PCR test geeft aan dat het virus is gedetecteerd (gezien de complicaties is een positieve test bij lage prevalentie absoluut geen bewijs van daadwerkelijke infectie), en vervolgens wordt daar automatisch de conclusie aan verbonden dat iemand die een positieve testuitslag heeft, een gevaar voor de volksgezondheid is omdat hij/zij anderen kan besmetten. Op deze redenering is ook het beleid gebaseerd. In afb. 21 is weergegeven hoe besmetting en de mogelijkheid om een positieve PCR uitslag te genereren op basis van aanwezig viraal RNA zich gedraagt in de tijd. Er is een korte periode van besmettelijkheid en symptomatisch zijn gevolgd door een lange periode waarin het virale RNA nog aanwezig is, maar geen betrekking meer heeft op ziekte of besmettelijkheid. Deze periode duurt vele malen langer dan de besmettelijke fase. Het is daarom zeer waarschijnlijk dat een deel van de positief geteste gevallen is te herleiden tot een gepasseerde infectie uit de periode maart-mei. Deze positieve testen geven echter wel richting aan het beleid en worden opgevat als 'coronagevallen'.



Afb. 21: de periode waarbinnen een PCR test een positieve uitslag kan geven.

In de beroepspraktijk wordt in het geval van lage prevalentie bij grote testpopulaties altijd een duplo- of liever nog een triplomonster genomen om de effecten van toevallige factoren uit te vlakken en tot een betrouwbaarder beeld te komen. Dat gebeurt in dit geval niet. Er wordt één monster genomen, en bij een positieve test wordt hierop een bevestiging uitgevoerd. De toevallige factoren die een vals-positieve uitslag kunnen veroorzaken zijn hiermee, voor zover ze te herleiden zijn tot de monsternamen, niet geëlimineerd.

Conclusie:

Er wordt geen onderscheid gemaakt in subpopulaties.

Er vindt geen verificatie plaats op de vermeende besmettelijkheid van de positief geteste personen.

Uit onderzoek is gebleken dat de betrouwbaarheid van neus- en keelwabs lager is dan BAL. Er wordt dus een foutmarge meegenomen in de PCR test.

Er wordt bij de monsternamen van patiënten zonder gerichte verdenking van COVID-19 geen rekening gehouden met de foutmarge die eigen is aan random/steekproefsgewijs testen.

7. Conclusie

Alles bij elkaar wekt de opzet voor de COVID-19 PCR test weinig vertrouwen voor het werkveld. De twijfel betreft in mindere mate de werkzaamheid van de test, wel de manier waarop de bevindingen uit de test richting geven aan beleid om de corona-uitbraak te beteugelen. Op het gebruikte protocol valt het volgende aan te merken:

- Het gebruikte PCR protocol kan aspecifieke binding in de hand werken doordat de annealingtemperatuur laag is t.o.v. de T_m van de gebruikte primers en de RdRp primerset een groot verschil in T_m laat zien.
- Het RIVM verstrekt tegenstrijdige gegevens over de specificiteit van de test en erkent dat grootschalig testen bij lage ziekteprevalentie het vóórkomen van fout-positieve dan wel fout-negatieve uitslagen in de hand werkt.
- Relatief lage concentraties SARS-CoV-2 virus leiden tot vals-negatieve resultaten.[7]
- Er is door het RIVM geen validatie op klinische monsters beschikbaar gesteld bij initiële ingebruikname van de test. (opmerking: nu meerdere labs de test uitvoeren, is er een in-het-werk klinische validatie aan het ontstaan) [18]

Naast de PCR test valt ook op de omgang met data een en ander op te merken:

- Er is geen fundering van de claim dat de specificiteit van de PCR test 99,9% bedraagt.
- Het RIVM spreekt zichzelf tegen door te stellen dat het grootschalig testen van asymptomatische personen geen meerwaarde heeft maar dit wel gebruikt als testbeleid.
- Het RIVM/de GGD bieden geen viruskweek en sequencing aan in geval van een positieve test zodat geverifieerd kan worden dat de persoon besmettelijk is.

Wij zouden graag onderbouwd willen zien:

- Waarom het RIVM erkent dat grootschalig testen leidt tot vals-positieven en er desondanks mee doorgaat onder de bewering dat er op dit moment geen beter alternatief is, terwijl er aanvullende testen beschikbaar zijn.
- Waarom het RIVM er de voorkeur aan geeft grote aantallen asymptomatische of licht symptomatische mensen snel te testen dan daadwerkelijk zieke mensen grondig te testen.
- Waarom voor de berekening van het reproductiegetal de aanname wordt gedaan dat positief geteste personen besmettelijk zijn terwijl het RIVM ook stelt dat dat niet zo hoeft te zijn.
- Wat de motivatie is achter de keuze om data die niet met uitgebreidere testen bevestigde dan wel uitgesloten vals-positieve uitslagen bevatten door het kabinet te laten benutten als leidraad voor de coronamaatregelen.

Er wordt op basis van een toenemend aantal positief geteste personen in de PCR test zonder bevestiging dat het virus levend aanwezig is en zich vermenigvuldigt, in toenemende mate lokaal en landelijk beleid geïmplementeerd dat voor de burger zeer beperkend is, hem of haar belemmert in beroepsuitoefening en sociale contacten, dat angst en gebrek aan geestelijk welbevinden in de hand werkt, onspanning en lichamelijk en geestelijk herstel van stress tegenwerkt en zelfs traumatiserend kan zijn. Het blijkt lastig te achterhalen of het daadwerkelijk om een patiënt met klachten gaat, of slechts een asymptomatisch persoon die om diverse redenen een positieve uitslag kan krijgen. Het is

een understatement om te stellen dat deze situatie niet in het voordeel van de Nederlandse burger werkt. Aangezien het coronabeleid een mondiaal universeel karakter heeft en uit het buitenland vergelijkbare kritieken komen, lijkt hier sprake te zijn van een groter probleem. [19][20][21] Het is van het allergrootste belang om internationale samenwerking te zoeken om na te gaan wat er precies aan de hand is, op welke schaal het optreedt, wat de gevolgen zijn voor economie, gezondheid en welzijn.

7. Bronnen

- [1] https://www.youtube.com/watch?v=8R2HLATi9_Q
- [2] <https://ruhrkultour.de/probleme-des-pcr-tests-sars-cov-2/>
- [3] <https://www.freiewelt.net/nachricht/pcr-test-ist-wie-kaffeesatzlesen-10082051/>
- [4] Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. Victor M. Corman et al., Eurosurveillance, volume 25, Issue 3, 23/Jan/2020
- [5] <https://www.rivm.nl/bevolkingsonderzoeken-en-screeningen/screening-theorie/uitslagen-en-testeigenschappen>
- [6] <https://lci.rivm.nl/covid-19-testbeleid%20personen%20zonder%20klachten>
- [7] SARS-CoV-2 Genom April 2020.pdf - 200603 DAKs - Virologische INSTAND Ringversuche
- [8] FIND_COVID-19_RDTs_18.05.2020
- [9] FIND_SARS-COV2_molecular-assay-evaluation-results_03Jul2020 (zie bijlage V voor de volledige PDF)
- [10] <https://www.nivel.nl/nl/nivel-zorgregistraties-eerste-lijn/actuele-weekcijfers-aandoeningen-waaronder-griep-surveillance>
- [11] <https://www.dlmpius.nl/wp-content/uploads/2020/05/340-DE-SARS-CoV-2-Genom-April-2020-20200502j.pdf>
- [12] <https://www.demorgen.be/nieuws/coronatest-geeft-bij-30-procent-van-besmetten-vals-negatief-resultaat~b0bb479c/>
- [13] <https://www.cebm.net/covid-19/infectious-positive-pcr-test-result-covid-19/>
- [14] Comparison of commercial realtime reverse transcription PCR assays for the detection of SARS-CoV-2. Zsolt Igloi et al., Journal of Clinical Virology, vol. 129, august 2020
- [15] <https://www.rivm.nl/coronavirus-covid-19/testen>
- [16] <https://www.wodarg.com/covid-19-medical-detectives/medical-detectives-english/>
- [17] https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/real-time-rt-pcr-assays-for-the-detection-of-sars-cov-2-institut-pasteur-paris.pdf?sfvrsn=3662fcb6_2
- [18] <https://lci.rivm.nl/covid-19/bijlage/aanvullend>
- [19] <https://www.cebm.net/covid-19/infectious-positive-pcr-test-result-covid-19/>
- [20] <https://radio1.be/er-geen-tweede-golf-de-betekenis-die-aan-de-cijfers-wordt-gegeven-lijkt-totaal-verkeerd>

[21] <https://www.fluoridefreepeel.ca/health-canada-has-no-record-of-covid-19-virus-isolation/>

[22] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7066521/>

[23] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7066521/>

[24] Epidemiologische situatie COVID-19 in Nederland Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu - RIVM 18 augustus 2020, 1

Bijlagen

Bijlage I Alignment SARCCoV2 NM908947 met SARS CoV ZMY1 AY351680.1

Bijlage II: Alignment SARS-CoV 2 MN908947.3 en SARS coronavirus Tor2 NC_004718.3

Bijlage III: Alignment SARS CoV2 MN908947.3 met HCoV OC43 KU131570.1

Bijlage IV: Alignment SARS-CoV-2 NM MN908947.3 en HCoV 229E KU291448.1