

## **Falend PCR testbeleid: brandhaard zelf gecreëerd**

Het aantal besmettingen neemt de laatste tijd toe. Niet alleen in absolute aantallen door het opschalen van het testbeleid, maar ook procentueel. Steekt het corona virus weer de kop op of zijn er andere oorzaken?

Recentelijk blijken er twee essentiële zaken te zijn gewijzigd in de COVID-19 richtlijn van het RIVM. De uitleg die het RIVM hierop heeft gegeven, hebben wij voorgelegd aan gepromoveerd moleculair geneticus Dr. Peter Borger, expert op het gebied van PCR. Hieronder deelt hij zijn schokkende reacties.

### **Uitleg RIVM en reacties Dr. Peter Borger (moleculair geneticus)**

Coen Berends (RIVM): "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."

*Dr. Peter Borger: "Deze testen moeten ergens zijn gedocumenteerd, dan wel gepubliceerd, net als de publicatie van het RKI. Het gestandaardiseerde protocol (SOP) willen we graag inzien, zodat we de deze test kunnen reproduceren. Als er meerdere verschillende testen naast elkaar worden gebruikt, dan dienen die allemaal een eigen SOP te hebben. Deze SOPs willen we graag inzien. De verschillende amplificatietechnieken moeten worden gespecificeerd. Er zijn momenteel 2 amplificatietechnieken in de literatuur beschreven, waarvan alleen de PCR techniek is gevalideerd. De alternatieve amplificatietechnieken moeten hier dus worden aangegeven en er moet ergens een publicatie zijn, die toont, dat die werden gevalideerd. PCR data die worden verkregen na 35 cycli zijn volstrekt onbetrouwbaar. Als het aantal amplificatiecycli inderdaad voor het overgrote aantal van de testen tussen de 40 en 45 cycli ligt, dan zijn de testen allemaal gedraaid in de achtergrondruis van het systeem. Volgens de journalist van het Ad zeggen de mensen (Rotterdam geloof ik) dat ze testen tussen 20 en 25 cycli. Dit is volstrekt oké, maar is in volkomen tegenspraak met dit bericht van het RIVM. Dit soort microbiologische diagnostische testen (SOPs) moet opgezet en gevalideerd zijn voor maximaal 35 cycli. Boven 40 cycli worden te veel monsters vals positief. Dat weten ook de mensen in R'dam."*

### **Coen Berends (RIVM): "Het verschil in aantal cycli maakt niet dat meer monsters positief worden of er meer foutief positieven bij zouden komen."**

*Dr. Peter Borger: "Dit is niet correct en wordt ook niet correcter door het vet af te drukken. NB: Elke cyclus geeft een extra amplificatie met factor twee. Als je 5 extra cycli includeert, dan heb je 32x zoveel signaal. Dit gaat dan zeer zeker je positiviteit beïnvloeden. Daarom is het opstellen van een gestandaardiseerde SOP van essentieel belang. Je hebt een SOP nodig om de positieven van de negatieven te onderscheiden. Die SOP moet aangeven welke hoeveelheid uitgangsmateriaal je neemt (stel een wattip met noseswap), de T waarden en het aantal cycli wanneer deze positief mag zijn, dat wil zeggen het maximale aantal cycli. Als dat voorheen 30 cycli waren, dan mag je dat NOOIT verhogen naar 35. Doe je dat wel, dan moet je daarvoor een goede reden hebben en je moet erbij aangeven dat de nieuwe SOP niet meer vergelijkbaar is met de vorige SOP. Doe je dat niet dan misleid je ernstig."*

Coen Berends (RIVM): "Het kan helpen om monsters die laat in het aantal cycli positief worden een nog duidelijkere amplificatiecurve te geven."

*Dr. Peter Borger: "Zo werkt het niet. Je mag niet eindeloos PCR cycli draaien. Je moet een SOP hebben die discrimineert tussen een positief en een negatief resultaat. Het RIVM protocol lijkt erop gericht om een positief resultaat te krijgen. Dit is een enorme bias die je introduceert. In de diagnostiek mag dit NOOIT. In een researchlab is dit toegestaan, maar waar het patiënten betreft niet! In de patiëntendiagnostiek werk je met SOPs, die duidelijke moeten aangeven hoe je moet discrimineren tussen negatief en positief. Daarom zei Kary Mullis, de uitvinder van de PCR technologie, dat je de PCR nooit voor microbiologische/virologische diagnostiek mag gebruiken. Doe je het wel, dan moet je een extreem goede SOP hebben! Maar blijkbaar is die er niet."*

Coen Berends (RIVM): "Door kwaliteitscontrole weten we dat alle PCR testen en andere amplificatietesten die nu in Nederland gebruikt worden een vergelijkbare limiet van detectie hebben."

*Dr. Peter Borger: "Als dat "laat in het aantal cycli" is, zoals het RIVM eerder schrijft, dan is dat tussen 40 en 45 cycli. Dit is het amplificatiegebied gebied dat volstrekt onbetrouwbaar is. Als er labs zijn die >40 cycli draaien, dan verklaart dat een hele boel. Boven 40 cycli vind je een enorme hoeveelheid valse positieven. Er dient dus meteen een SOP te worden opgesteld voor heel Nederland, waarbij het max aantal cycli wordt vastgelegd. En dat moet ver onder de 40 liggen. Ik stel voor maximaal 35 cycli te draaien. Als de test dan negatief is, dan moet de test zo worden verwerkt. Als dit niet is gebeurd, dan is de hele procedure onbetrouwbaar en geeft een grote hoeveelheid valse positieven."*

Coen Berends (RIVM): "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."

*Dr. Peter Borger: "Ja, dat er op deze manier wordt gehandeld kan ik me om economische redenen voorstellen. Er worden te veel mensen neus-swabs afgenomen en men heeft de capaciteit en het geld niet om ze goed te analyseren. En dus wordt er een compromis aangegaan. In plaats van drie genen, wordt er nog maar eentje getest. Daarmee reduceer je de betrouwbaar van de test enorm. Met drie genen heb je drie signalen en als die alle drie positief zijn, dan weet je dat je een virus te pakken hebben. Met een signaal negatief en twee positief ben je al niet meer zeker of je een virus hebt; met slechts één van de drie positief weet je niks meer. Als je het aantal signalen reduceert met factor 3 (van drie genen naar één), dan introduceer je een veel grotere informatieve onzekerheidsmarge. Immers je hebt twee positieve controles uit je experiment verwijderd. En daarom kun je niks meer met zekerheid zeggen over het ene overgebleven signaal."*

Coen Berends (RIVM): "Hierdoor zijn er niet meer of minder foutief positieve resultaten."

*Dr. Peter Borger: "Deze aanname is helaas onjuist, zoals boven uitgelegd."*

Coen Berends (RIVM): "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."

*Dr. Peter Borger: "Omdat ze geen SOP hebben (lijkt het), hebben ze dus ook niet gedefinieerd wat zwak positief is. Wat is zwak positief? 30 cycli? 31 cycli? 32? Dat moet beslist gedefinieerd in een SOP. En wat betekent zwak positief op signaalniveau? Alle drie genen positief? Of twee van drie positief. Ze geven zelf al aan dat voor zwak positieven niet alle signalen (target) optreden. Voor het positief zijn van de test moeten alle targets positief zijn. Als er één positief is, zegt dat dus nog niks. Het kunnen nog steeds vals positieven zijn, omdat de andere twee signalen negatief zijn. Door nu ook nog eens de test op een target te reduceren haal je een enorme groot aantal vals positieven binnen. Als ik het zo inschat, dan is er geen algemene SOP voor de RT-PCR test, die men overal in NL zou kunnen toepassen. Alle labs in NL werken dus naar eigen goeddunken en eigen inzichten. Dat is een uiterst dubieuze en zeer onwetenschappelijke aanpak. Als die SOPs er wel zijn, dan dienen die in heel NL hetzelfde te zijn."*

Coen Berends (RIVM): "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."

*Dr. Peter Borger: "Dit is ook onjuist. Ten eerste is het geen virus, maar een RNA molecuul dat wordt geamplificeerd. Als men erop uit is om één molecuul te vinden tussen miljoenen andere moleculen, dan is er een betere methode, nl. nested PCR. Die zijn betrouwbaar. Maar het gaat er niet om maar één molecuul te vinden. Het gaat erom om de geïnfecteerden van de niet-geïnfecteerden te kunnen onderscheiden. En dan heb je een SOP nodig, die daarvoor is ontworpen."*

Coen Berends (RIVM): "Kortom, het aantal amplificatiecycli wat in PCR testen of ander amplificatietechnieken gebruikt wordt is optimaal voor een sensitieve test."

*Dr. Peter Borger: "Optimaal moet hier gedefinieerd worden. Optimaal voor wat? Voor het aantonen van een molecuul? Of optimaal om te kunnen discrimineren tussen een besmette en een gezonde persoon? Het draaien van 40-45 cycli is in feite lukraak amplificeren en heeft met een diagnostische SOP niks te maken. Een specifiek signaal dat een infectie van een specifiek signaal kan onderscheiden ligt onder de 35 cycli. Zeker als je het met niks gaat vergelijken (let wel het RIVM gebruikt geen kwantitatieve PCR methode)."*

Coen Berends (RIVM): "en het aantal amplificatiecycli is sinds de start van SARS-CoV-2 circulatie in Nederland niet verhoogd om meer monsters positief te vinden."

*Dr. Peter Borger: "Als het niet is verhoogd en steeds al bij 40-45 cycli lag, dan verklaart dat heel erg veel. Dan hebben we te maken met een over-amplificatie die geen enkele relevantie heeft m.b.t. diagnostiek van SARS-CoV2."*

Coen Berends (RIVM): "**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.**"

*Dr. Peter Borger: "Meer dan één target gebruiken we in het lab om zeker te zijn dat we niet te maken hebben met vals positieven. Het heeft niks te maken met mutaties die zouden kunnen optreden. Als PCR deskundige raad ik af, in navolging van Kary Mullis (de uitvinder van de PCR methode), om microbiële en virologische diagnostiek met behulp van RT-PCR uit*

te voeren. De techniek is er niet geschikt voor, omdat ze te gevoelig is (zeker als je 40-45 cycli neemt) en daarmee te veel vals positieven geeft. Als je de techniek wel wilt toepassen, zoals de virologen hebben besloten, dan moet je minstens op zekerheid spelen. Daarom heeft men initieel voor drie signalen (genen) gekozen. Als ze alle drie positief zijn, dan kun je (vrijwel) zeker zijn dat het om het virus gaat. Zijn er maar twee positief, dan zou het virus kunnen zijn, maar dat is dan minder zeker (immers maar 2/3 zijn positief). Met maar één positief signaal heb je waarschijnlijk geen virus en moet je de test opnieuw uitvoeren, of het resultaat als negatief beoordelen. Dat is allemaal zeer bewerkelijk, kost een hoop tijd en is duur. Dus gaan ze nu over op één signaal. Dit is onverantwoord. Zonder de extra controle signalen zullen ze veel meer valse positieven gaan opleveren, omdat je de twee andere signalen hebt weggelaten. Het verklaart de enorme stijging sinds september. Je ziet ook dat de hele procedure erop gericht is maar vooral geen "cases" te missen. We hebben hier te maken met een volstrekt uit de hand gelopen vertrouwen in een onbetrouwbare test-methode. De test dient erop gericht te zijn om positieven van negatieven te kunnen onderscheiden. En daarvoor dienen ze een goed werkende SOP op te zetten. Daarin moet beschreven worden 1) Hoeveelheid uitgangsmateriaal, 2) hoeveel en concentratie van de buffers en primers moeten gespecificeerd, 3) temperatuur en tijdsduur per cyclus, 4) het aantal cycli, 5) interpretatie curves (CT helling en hoogte)."