

Toelichting

Ct-waarden in SARS-CoV-2 RT-PCR – 28-10-2020

Adam Meijer, Richard Molenkamp, Rob Schuurman, Ann Vossen

Mee-lezers:

WMDI bestuur (Stefan Boers, Edou Heddema Robin van Houdt, Roel Nijhuis, Noortje van Maarseveen, Suzan Pas, Petra Wolffs)

Menno de Jong, Paul Savelkoul, Janke Schinkel

Dit document is geschreven om uitleg te geven over Ct-waarden en overwegingen weer te geven bij de rapportage van Ct-waarden binnen de publieke gezondheidszorg.

Hoe werkt een RT-PCR?

De gouden standaard voor detectie van SARS-CoV-2 is de RT-PCR. Hierbij wordt het RNA-genoom van SARS-CoV-2 eerst geïsoleerd en gezuiverd (stap 1) en omgezet in DNA middels een reverse-transcriptase (RT) stap (stap 2). Vervolgens wordt een stukje van dit DNA in meerdere rondes of cycli vermenigvuldigd (stap 3). Standaard worden er 40 tot 45 cycli uitgevoerd voor maximale gevoeligheid.

Wat is een Ct-waarde?

Bij aanwezigheid van SARS-CoV-2 RNA in het oorspronkelijke materiaal zal bij elke cyclus een verdubbeling plaatsvinden van het stukje DNA met een bijbehorend fluorescerend signaal. Bij voldoende cumulatief signaal wordt een drempelwaarde (threshold) overschreden en wordt het meetbaar. Het aantal cycli waarbij dit plaatsvindt wordt de Ct (cycle-threshold) -waarde genoemd. Als er veel SARS-CoV-2 RNA aanwezig was in het oorspronkelijke materiaal zijn er weinig cycli nodig voordat het signaal boven de drempel komt. Een lage Ct-waarde geeft dus een hoge virusload weer en vice versa. Bij het afwezig blijven van een signaal na 40-45 cycli noemen we het PCR-resultaat negatief. De Ct-waarden van de SARS-CoV-2 PCR uitgevoerd op een keel-neus-uitstrijk liggen grotendeels tussen de 20 en 35.

Waarom is een Ct-waarde een relatieve waarde en geen absolute waarde?

De Ct-waarde van een PCR zoals hierboven beschreven is gerelateerd aan de hoeveelheid viraal RNA in het oorspronkelijke materiaal. En hoewel de indruk kan bestaan dat met behulp van Ct-waarden een absolute kwantificering mogelijk is, is dit in de praktijk niet mogelijk om meerdere redenen.

1. Technische variatie:
 - a. De veronderstelde lineaire relatie tussen een Ct-waarde en het logaritme van de virusload in het oorspronkelijke materiaal is niet lineair over het volledige spectrum aan virusconcentraties.
 - b. Een Ct-waarde gemeten op hetzelfde materiaal met apparaat/test A kan tot 6 Ct (100-voudig) afwijken van de Ct-waarde gemeten met apparaat/test B (intra-lab en inter-lab variatie).

- c. Een Ct-waarde gemeten op hetzelfde materiaal kan tot 6 Ct (100-voudig) verschillen tussen laboratorium A en B (interlab variatie) zelfs bij gebruik van dezelfde methode.
 - d. Ook binnen een laboratorium kan de Ct waarde aanzienlijk verschillen indien hetzelfde materiaal enkele malen opnieuw geanalyseerd wordt (interrun variatie).
- b&c zeggen niets over verschillen in gevoeligheid van de gebruikte technieken of verschillen in kwaliteit tussen laboratoria.
2. Biologische variatie:
- a. De kwaliteit van afname van het luchtwegmateriaal kan variëren en aanleiding geven tot verschillen in Ct-waarden. In tegenstelling tot de afname van een bloedmonster, is de afname van luchtwegmateriaal minder goed te standaardiseren en bovendien is het type materiaal minder homogeen dan bloed.
 - b. Luchtwegmateriaal afkomstig uit de diepere luchtwegen (sputum of bronchoalveolaire lavage) bevat vaak, zeker wat verder in het ziekteproces bij ernstiger ziekte, hogere virus (of eigenlijk RNA)-loads (lagere Ct-waarden) dan keel-neus-uitstrijk.
 - c. Er is variatie van de virusload over de tijd. De hoogste virusload is aanwezig rondom de eerste ziektedag en neemt daarna in de loop van de eerste week af. Vaak kan nog tot weken, zeker bij ernstige ziekte, viraal RNA worden gemeten in de luchtwegen. De Ct-waarde is daarmee ook afhankelijk van moment van testen: als een persoon de test aanvraagt op de eerste ziektedag, maar pas één tot enkele dagen later getest kan worden zal de Ct-waarde hoger zijn op het moment van testen.

Welke kwaliteitsinstrumenten worden momenteel gebruikt?

Om de kwaliteit te borgen van de Covid-19 diagnostiek in Nederland zijn de volgende instrumenten voorhanden:

1. De deelname aan de kwaliteitstoets van het RIVM, die bestaat uit het testen van een specificiteitspanel, een sensitiviteitspanel en de confirmatie van de eerste 5 positieve en eerste 10 negatieve testresultaten van personen met verdenking Covid-19. (<https://lci.rivm.nl/covid-19/bijlage/aanvullend>)
2. De medische laboratoria worden door de Raad voor Accreditatie (RvA) getoetst aan conformiteit met de ISO15189 norm. De norm beschrijft de eis om alle gebruikte technieken te valideren binnen de eigen setting. Daarnaast wordt deelname aan externe kwaliteitsrondzendingen geëist.
3. De NVMM Richtlijn Moleculaire Diagnostiek van Infectieziekten.

Bovengenoemde punten 1 en 2 maken het mogelijk om apparatuur, testalgoritmen en laboratoria onderling te vergelijken.

Wat zegt een Ct-waarde?

Alle bovengenoemde onzekerheden in acht nemend;

Over besmettelijkheid

Er is een relatie tussen de Ct-waarde van een materiaal en de mogelijkheid om virus te kweken uit dit materiaal (kweekbaarheid). (Bullard et al., Van Kampen et al, Wolfel et al.) Hiermee bestaat ook een (indirecte) aanwijzing voor een relatie tussen Ct-waarde en besmettelijkheid, al zijn er meer factoren die besmettelijkheid beïnvloeden. De mate van klachten (veel hoesten/kuchen/niezen) en de duur van expositie hebben ook effect op overdracht. Bij een lage RNA-concentratie (een hoge Ct-waarde) kan, rekening houdend met ziektegeschiedenis, gesproken worden van lage besmettelijkheid. Voor de lagere Ct-waarden kan alleen een uitspraak over eventuele besmettelijkheid worden gedaan in het licht van ziekteduur, ziekteverschijnselen, maar ook het type materiaal en het moment van monsterafname.

Over infectie

Laboratoria maken gebruik van testalgoritmen waarbij resultaten met hoge virusloads (lage Ct-waarden) vrijwel altijd direct worden gerapporteerd aan de aanvrager. Afhankelijk van het testalgoritme van het laboratorium zal een hoge Ct-waarde direct worden gerapporteerd of pas na bevestiging worden gerapporteerd. Deze algoritmen komen voort uit een voortdurend kwaliteitsborgingsproces, zoals vastgelegd binnen de ISO15189 norm. Hierbij wordt de grootste zekerheid verkregen dat een positief PCR resultaat een aanwijzing is voor een infectie met SARS-CoV-2. Een lage Ct-waarde zal in het algemeen duiden op een recente infectie, terwijl een hogere Ct-waarde past bij een al langer bestaande infectie of eventueel een zeer recente infectie vóór het ontstaan van klachten (pre-symptomatisch).

Over kwaliteit

Soms ontstaat het beeld dat het aantonen van zwak-positieve resultaten een aanwijzing is voor fout-positieve resultaten. Resultaten met een hoge Ct-waarde, zwak-positieve resultaten, worden in ieder laboratorium gevonden. Zoals hierboven beschreven kunnen zwak-positieve resultaten worden gevonden als men wat verder in het ziekteproces zit. Doordat de RT-PCR een zeer gevoelige methode is, in staat om zeer lage hoeveelheden RNA te detecteren, kan er ook rest-RNA worden aangetoond, weken na de infectie. Deze bevinding is dan niet fout-positief, maar zwak-positief. Door het testen van negatieve controles, interne (extractie) controles, positieve controles (waarvan vooraf bekend is welke Ct-waarde verwacht kan worden), het toepassen van een technische autorisatiestap, waaronder het beoordelen van de PCR-curves, en bovengenoemde testalgoritmen wordt het risico op rapportage van fout-positieve resultaten zoveel mogelijk beperkt. Uiteraard is regelmatige beoordeling van alle PCR-resultaten en verschuivingen binnen de positieve PCR-resultaten van belang om de kwaliteit te monitoren.

Over gevoeligheid van de test:

Rond de detectielimiet kan een lage virusload (en dus een hoge Ct-waarde) niet altijd worden bevestigd door een 2^e test of door een ander laboratorium. Er zal altijd een bepaalde mate van onzekerheid rond de detectielimiet zijn. Dat geldt voor elke test.

Toepassing van individuele of geaggregeerde Ct-waarden

Individuele Ct-waarden in de ziekenhuiszorg:

Op dit moment worden Ct-waarden van een individuele patiënt niet altijd gerapporteerd aan de aanvrager in het ziekenhuis. Het rapporteren van de Ct-waarde heeft geen toegevoegde waarde voor het stellen van de diagnose Covid-19 en kan tot foutieve interpretatie leiden wanneer aanvragers niet gewend zijn om met Ct-waarden te werken. Al zijn er aanwijzingen dat een ernstiger klinisch beeld gecorreleerd is met hogere virusloads bij opgenomen patiënten, het klinisch beleid wordt niet beïnvloed door de Ct-waarden van de SARS-CoV-2 PCR. (Rao. et al. A Systematic Review of the Clinical Utility of Cycle Threshold Values in the Context of COVID-19. Infect Dis Ther 9, 573–586 (2020)).

Echter, indien er een veilige cut-off waarde is te definiëren voor besmettelijkheid, kan de Ct-waarde (als getal, of als categorie “niet meer besmettelijk”) worden gerapporteerd. Dit heeft gevolgen voor het verplegen in isolatie, of het gebruik van persoonlijke beschermingsmiddelen. Ook voor zorgmedewerkers kan op basis hiervan worden besloten of iemand veilig aan het werk kan.

Gezien de bovengenoemde variatie tussen testen en laboratoria in Ct-waarden, zou het gebruik van een nationale standaard met een vaste virusload ter waarde van de “besmettelijkheids-cut-off” van toegevoegde waarde zijn. De toepassing hiervan zou in een nationale procedure vastgelegd kunnen worden.

Individuele Ct-waarden in de publieke gezondheid/GGD-teststraten:

Op dit moment worden Ct-waarden van een individueel persoon niet gerapporteerd aan de aanvrager in de GGD-teststraat, maar uitsluitend de interpretatie van het testresultaat. Het rapporteren van de Ct-waarde heeft weinig toegevoegde waarde voor het stellen van de diagnose Covid-19 en kan tot foutieve interpretatie leiden. Elke Ct-waarde kan duiden op een besmettelijke infectie in de afgelopen dagen en zou aanleiding moeten geven tot contact met de patiënt en, indien er sprake is van een korte ziekte duur, tot een bron-en-contactonderzoek.

Indien het mogelijk is om een “besmettelijkheids-cut-off” te definiëren heeft het rapporteren van de Ct-waarde (als getal, of als categorie “niet meer besmettelijk”) wel toegevoegde waarde, aangezien isolatie van de patiënt kan worden bekort. Ook de quarantaine van contacten, indien deze op een vast moment na laatste contact zouden worden getest, kan mogelijk worden bekort.

Geaggregeerde Ct-waarden:

Het spectrum van geaggregeerde Ct-waarden van één populatie (bv de GGD teststraat) zal een vast verdelingspatroon tonen, namelijk een scheve verdeling naar de lagere Ct-waarden. Hierbinnen zal een klein deel van de monsters hoge Ct-waarden hebben. De verwachting is dat indien meerdere laboratoria dezelfde populatie testen, bijvoorbeeld meerdere teststraten binnen eenzelfde regio, de resultaten een vergelijkbaar spectrum vertonen. Door terugkoppeling van deze gegevens aan de laboratoria kan dit worden gebruikt als kwaliteitsindicator. De verdeling zal wel beïnvloed worden door de gemiddelde tijd tussen de eerste ziektedag en de dag van testen.

Diagnostiek zonder Ct-waarden

Landelijk worden de meeste testen uitgevoerd met de RT-PCR methode waarbij Ct-waarden gegenereerd worden. Daarnaast is er een toename in alternatieve moleculaire diagnostiek, waarbij géén Ct-waarden worden gegenereerd. Deze methoden, waaronder ook de door TNO ontwikkelde Loop-mediated amplification (LAMP) sneltest, kunnen daarmee niet voldoen aan de wens om Ct-waarden te genereren.

Conclusie

Vanwege de hierboven beschreven grote mate van variatie, zijn Ct-waarden moeilijk te interpreteren. Interpretatie van een positieve PCR dient altijd plaats te vinden in het licht van epidemiologische gegevens, de eerste ziektedag, het beloop en de ernst van de klachten. Het rapporteren of vergelijken van individuele Ct-waarden kan tot misinterpretatie en verkeerde besluitvorming leiden.

Onderscheid maken in categorieën (positief versus laag-positief) binnen de positieve resultaten, kan van toegevoegde waarde zijn. Het rapporteren van een laag-positief resultaat kan, in combinatie met bovengenoemde gegevens, duiden op lagere besmettelijkheid en aanleiding geven tot ander beleid, zowel in de ziekenhuiszorg als de publieke gezondheidszorg.