



CENTRAAL VETERINAIR INSTITUUT
WAGENINGEN UR

Mevr. Dr. C.J.M. Bruschke
Ministerie van LNV
Prins Clauslaan 8
Postbus 20401
2500 EK Den Haag

**Divisie Bacteriologie
en TSE's**

DATUM
7 februari 2010

ONDERWERP
PCR Q-foer

ONS KEUWERK
ZIJ/100207/1

BEHANDELD DOOR
F.G. van Zijderveld

DOORKIESNUMMER
(0320) 23 81 51

E-MAIL
fred.vanzijderveld@wur.nl

Geachte mevrouw Bruschke,

Er bestaan in de media en bij verschillende als deskundigen optredende personen twijfels omtrent de betrouwbaarheid van PCR-testen m.b.t. Q-koorts

Zoals eerder vermeld in diverse adviezen van de brede deskundigengroep aan de overheid en zelfstandige adviezen van het CVI aan het Min. Van LNV betreft dit vooral de waarde van een negatieve uitslag: een negatieve uitslag garandeert niet dat het betreffende dier of in geval van een tankmelkmonster het bedrijf niet besmet is. Dit aspect is al uitvoerig beschreven: het wordt bepaald door de momenten waarop dieren meer of minder bacteriën uitscheiden of geen bacteriën uitscheiden. Het herhaald onderzoeken in de tijd van monsters van bedrijven met steeds negatief resultaat geeft meer zekerheid omtrent de niet-besmet status van een bedrijf. Dit is de reden dat het tankmelkonderzoek nu met een interval van 2 weken wordt uitgevoerd.

Recent zijn er echter ook twijfels geuit over de betrouwbaarheid van een positieve uitslag, mede door het feit dat uitslagen van "hetzelfde" monster van diverse laboratoria verschillen. De twijfel over de waarde van een positieve uitslag is echter onterecht. Ik zal proberen deze ogenschijnlijke discrepanties van de resultaten tussen verschillende laboratoria of binnen één laboratorium te verklaren.

Er zijn verschillende PCR-testen mogelijk om in een monster DNA van de bacterie *Coxiella burnetii* aan te tonen in een monster. De gevoeligheid van een dergelijke test hangt ondermeer af van welk "doel DNA" wordt gekozen. Er zijn een aantal voor *Coxiella burnetii* unieke DNA stukjes beschreven. Sommige van deze stukjes komen maar één keer voor in één bacterie. Sommige komen meerder malen voor in één bacterie. Het aantal malen dat een dergelijk stukje DNA voorkomt in *C. burnetii* kan per stam verschillen. Onze CVI-test, gebruikt

**Centraal Veterinair Instituut
van Wageningen UR
Postbus 65
8200 AB Lelystad**

BEZOEKADRES
**Edelhertweg 15
8219 PH Lelystad**

TELEFOON
(0320) 23 88 00

FAX
(0320) 23 81 53

KVK
09098104 - Arnhem

INTERNET
www.cvi.wur.nl

Central Veterinary Institute of Wageningen UR (CVI) is een onafhankelijk onderzoeksinstituut binnen de Stichting Dienst Landbouwkundig Onderzoek, nationaal referentie-instituut voor de overheid, ISO 9001 gecertificeerd en ISO 17025 geaccrediteerd. Specifieke onderdelen werken in compliance met GLP.

voor het detecteren van positieve bedrijven, is gericht op het zogenaamde IS1111 gen, dat in meerdere (per stam verschillend aantal) kopieën in *C. burnetii* aanwezig is. Zoals in het validatierapport van onze test is beschreven is deze PCR ca. 100x gevoeliger dan een PCR test gebaseerd op een DNA-stukje dat maar eenmaal voorkomt in één bacterie. Dit betekent dat er verschillen tussen uitslagen kunnen ontstaan afkomstig van verschillende laboratoria: het ene laboratorium kan afhankelijk van de keuze van het doel DNA gevoeliger testen dan het andere.

Ook indien verschillende laboratoria hetzelfde doel DNA stukje gebruiken, kunnen verschillende uitslagen worden gegenereerd door kleine verschillen in testuitvoering. Zelfs binnen hetzelfde laboratorium kunnen meerdere steekproeven uit één monster verschillende uitslagen geven. Dit kan gebeuren indien het aantal bacteriën in het monster dicht bij de detectiegrens van de test ligt. Bij een positieve uitslag is onomstotelijk de aanwezigheid van *C. burnetii* DNA en daarmee de aanwezigheid van de bacterie aangetoond. Een positieve uitslag is dus zonder meer betrouwbaar.

Bij een negatieve uitslag zijn er twee mogelijkheden: ten eerste zit er geen DNA in het monster en is *C. burnetii* afwezig. Ten tweede is er de kans dat het aanwezige DNA in onvoldoende mate in het monster zit waardoor het niet wordt aangetoond.

Om het bovenstaande te illustreren het volgende: Stel ik heb een monster ontvangen van 1 liter melk. Zoals u weet, maar misschien is dit voor niet-ingewijden niet duidelijk, wordt slechts een deel van het ingestuurde monster gebruikt voor de uiteindelijke test (m.a.w. een enkele test van een monster is slechts een enkele steekproef uit dit monster). Stel ik gebruik 1 ml in mijn test met een detectielimiet van 1 bacterie per ml. Indien bijvoorbeeld 1 miljoen bacteriën in die liter melk zaten, dus 1000 bacteriën per ml, zal elk laboratorium dit monster positief testen en zullen binnen één laboratorium meerdere steekproeven alle een positieve testuitslag geven.

Indien het aantal bacteriën lager is in die liter melk bijv. 1000, dus 1 per ml ligt dit op de detectielimiet van mijn test en kan het dus voorkomen dat een eenmalige steekproef negatief getest kan worden. Dat geldt nog meer bij een nog kleiner aantal bacteriën (bijv. bij 10 steekproeven uit een monster: zeven steekproeven met een negatieve uitslag en drie met een positieve uitslag) De zeven negatieve scores laten onverlet dat wij hier met een positief melkmonster te maken hebben.

Blijkbaar bestaat er ook verwarring over de specificiteit van de test, waarbij gebruik is gemaakt van de gegevens uit het CVI validatierapport.

Om hier duidelijkheid in te brengen: de test heeft een analytische specificiteit van 100%: indien de test positief is, wordt in alle gevallen DNA van de bacterie *Coxiella burnetii* aangetoond. Er zijn geen vals-positieve uitslagen Daar bestaat geen discussie over.

Blijkbaar heeft een deskundige aangegeven dat op basis van gegevens uit ons rapport de voorspellende waarde van een positieve test 84% is. Dit naar aanleiding van een vergelijking van onze resultaten in het validatierapport tussen de PCR test en een ELISA voor de detectie van antilichamen. Dit soort gegevens wordt aan ons gevraagd bij de accreditatie van testen. In vaktermen gaat het hierbij om een vergelijking van 2 verschillende testen bij afwezigheid van de gouden standaard en worden relatieve diagnostische gevoeligheden en specificiteiten wederzijds berekend. Dit soort gegevens zegt echter niets over



Centraal Veterinair Instituut van
Wageningen UR

DATUM
7 februari 2010

ONS KENMERK
ZIJ/100207/1

PAGINA
2 van 3

de voorspellende waarde van de PCR test voor het aantonen van bacterieel DNA en kunnen dus niet gebruikt worden voor de beoordeling van de betrouwbaarheid van een positieve PCR-uitslag, zoals blijkt is gebeurd.



Met vriendelijke groet,

F.G. van Zijderveld
Hoofd Divisie Bacteriologie en TSE's
Plaatsvervangend directeur CVI van Wageningen UR

**Centraal Veterinair Instituut van
Wageningen UR**

DATUM
7 februari 2010

ONS KENMERK
ZIJ/100207/1

PAGINA
3 van 3