

# Verificatie rapport Cobas Liat SARS-CoV-2 & Influenza A/B

Naam auteur:

5.1.2e

Uitvoerend analist:

5.1.2e

Datum:

6-11-2020

## # Doel

Het doel van dit onderzoek is verifiëren van de SARS-CoV-2 en Influenza A/B PCR op de Cobas Liat

## # Principe (inleiding)

Met de Cobas Liat is het mogelijk om de uitslag van een monster voor SARS-CoV-2 en Influenza A/B binnen 30 minuten bekend te hebben. De Cobas Liat is een real-time PCR en in deze PCR zit ook een interne controle in verwerkt. De cassette is kant en klaar waaraan alleen ongeveer 250ul sample toegevoegd dient te worden.

De PCR is een cyclisch proces waarbij een specifiek stukje DNA in vitro wordt vermeerderd. De cyclus van de PCR bestaat uit een denaturatie- (uitsmelten), een annealing- (primeraanhechting), en een extensie- (ketenverlenging) stap. Deze stappen worden bij verschillende temperaturen uitgevoerd. Door veelvuldige herhaling van deze cyclus neemt de concentratie van het DNA exponentieel toe. In een real-time PCR wordt het geamplificeerde product zichtbaar gemaakt door fluorescentie. Deze fluorescentie is gebonden aan een probe (DLP) welke specifiek bindt aan het geamplificeerde product. Dit fluorescentie signaal is direct gerelateerd aan de hoeveelheid geamplificeerd product. Bij een multiplex real-time PCR kunnen meerdere target sequenties in één reactie geamplificeerd en gedetecteerd worden.

De gebruikte targets zijn ORF1 a/b non-structural region en het nucleocapsid protein (N) gen voor SARS-CoV-2, een geconserveerde region van het matrix gen voor Influenza A, en het non-structural protein gen van Influenza B. De test is voor wat betreft Influenza A en Influenza B vergelijkbaar met de Cobas Liat Influenza A/B & RSV assay (zie verificatie rapport Cobas Liat voor Influenza/RSV dd 09/11/2018). Daarom betreft deze verificatie met name het SARS-CoV-2-deel van de test.

## # Definities en afkortingen

AM	Arts-microbioloog
CBSL	Centraal Bacteriologisch en Serologisch Laboratorium
SEH	Spoed Eisende Hulp
DNA	Deoxyribo Nucleic Acid
RNA	Ribo Nucleic Acid
MMM	Medisch Moleculair Microbioloog
nmPCR	Nested multiplex Polymerase Chain Reaction
UA	Uitvoerend analist
VTM	Virus Transport Medium
UTM	Universal Transport Medium
CE-IVD	Conformité Européenne - in vitro diagnostic
FDA	Food and Drug Administration

## # Doelgroep

Dit validatie rapport is van toepassing op de medewerkers van het CBSL. Elke medewerker die avonddiensten draait dient dit rapport gelezen te hebben en te worden ingewerkt. Dit zal gemonitord worden aan de hand van een aftekenlijst.

5.1.2h

## # Veiligheid

Er wordt gewerkt met besmettelijk materiaal. Werk daarom volgens de algemene veiligheidsvoorschriften voor microbiologische laboratoria. De regels die hierop betrekking hebben liggen vast in: Veilig werken met micro-organismen, parasieten en cellen in laboratoria en andere werkruimten, theorie en praktijk, 3<sup>de</sup>, geheel herziende druk, 2009. Voor veiligheid specifiek voor de afdeling moleculair, zie [WV-MOL-WVA Algemene werkwijze Moleculair](#).

## # Verantwoordelijkheden

De UA is verantwoordelijk voor het volgens protocol uitvoeren van het onderzoek en de administratieve verwerking van de resultaten.

De MMM is verantwoordelijk voor de juiste interpretatie en technische validatie van deze testen.

De AM is verantwoordelijk voor het autoriseren van de onderzoeksresultaten.

## # Reagentia, media en hulpstoffen

- Distel (of ieder andere 10% chloor houdende oplossing)
- Alcohol 70%
- Cassette

## # Apparatuur en hulpmiddelen

- Cobas Liat
- Pasteurse pipet

## # Biologisch materiaal

- Nasopharynx-swab in UTM of VTM

## # Uitvoering

### Verificatie: Plan van aanpak:

De Cobas Liat SARS-CoV-2 & Influenza A/B is een commerciële kit, CE-IVD/FDA goedgekeurd en daarom wordt enkel een verificatie uitgevoerd. Daarbij worden de volgende parameters getest, zie tabel 2.

Tabel 1: Parameters die uitgevoerd dienen te worden bij een verificatie.

	Verificatie parameters
	CE-IVD/FDA test zonder aanpassingen
<b>Literatuuronderzoek</b>	
<b>Accuraatheid</b>	
<b>Analytische sensitiviteit</b>	
Limit of detection/analytische sensitiviteit	
Efficiëntie	
Lineariteit (indien kwantitatief)	
<b>Analytische specificiteit</b>	
Specificiteit	
Selectiviteit	
<b>Variatie</b>	
Intra-assay variatie	X (geborgd in het apparaat)
Inter-assay variatie	X (geborgd in het apparaat)
Juistheid en precisie	X (geborgd in het apparaat)
<b>Laboratorium validatie (optioneel)</b>	
Sensitiviteit	X

Specificiteit	X
Prevalentie (prior kans)	
Positief voorspellende waarde	
Negatief voorspellende waarde	

Werk altijd met handschoenen aan en wissel bij het inzetten van ieder nieuw monster.

#### Laboratorium validatie:

Acceptatie criteria van de laboratorium validatie: resultaten core-monsters specificiteits- en sensitiviteitspanel RIVM moeten aan RIVM criteria voldoen.

Er zijn in totaal 19 monsters getest met de Cobas Liat, 10 uit het RIVM specificiteitspanel 2020-5, 7 uit het RIVM sensitiviteitspanel 2020-3, 1 LC480 SARS-CoV-2 positief monster, 1 LC480 SARS-CoV-2 negatief monster, zie tabel 1. Alle resultaten zijn conform verwachting. Behalve de core-monsters van het RIVM sensitiviteitspanel wordt zelfs het educatieve monster gedetecteerd. De test voldoet aan de acceptatie criteria.

Tabel 1. Resultaten

Panellid nummer	Cobas Liat uitslag			Verwachte waarde
	SARS-Cov-2	Influenza A	Influenza B	
Liat nieuw 136509	nieuw	nieuw	Nieuw	
Liat oud 132073	oud	oud	oud	
EQA_CoV20-01	neg	neg	neg	Neg ( pos voor coV-OC43)
EQA_CoV20-02	neg	neg	neg	Neg
EQA_CoV20-03	pos	neg	neg	Pos SARS-CoV-2
EQA_CoV20-04	pos	neg	neg	Pos SARS-CoV-2
EQA_CoV20-05	neg	pos	neg	Pos Infl A
EQA_CoV20-06	pos	neg	neg	Pos SARS-CoV-2
EQA_CoV20-07	neg	neg	neg	Neg (pos voor coV-229E)
EQA_CoV20-08	neg	neg	pos	Pos Infl B
EQA_CoV20-09	neg	neg	neg	Neg (pos voor coV-NL63)
EQA_CoV20-10	neg	neg	neg	Neg (pos voor Rhinovirus A16)
Sen. Serie-01	pos	neg	neg	Pos SARS-COV-2 (10 <sup>-5</sup> verdunning)
Sen. Serie-02	neg	neg	neg	Neg (10 <sup>-9</sup> verdunning)
Sen. Serie-03	pos	neg	neg	Pos SARS-COV-2 (10 <sup>-8</sup> verdunning, educatief monster)
Sen. Serie-04	pos	neg	neg	Pos SARS-COV-2 (10 <sup>-7</sup> verdunning)
Sen. Serie-05	pos	neg	neg	Pos SARS-COV-2 (10 <sup>-6</sup> verdunning)
Sen. Serie-06	neg	neg	neg	Neg (10 <sup>-10</sup> verdunning)
Sen. Serie-07	pos	neg	neg	Pos SARS-COV-2 (10 <sup>-4</sup> verdunning)
Pos 20450652101	pos	neg	neg	SARS-CoV-2 positief, Ct 16.91
Neg 20450680401	neg	neg	neg	SARS-CoV-2 negatief, Ct>45

## # Interpretatie, berekening, uitslag

### Criteria voor positieve of negatieve uitslagen:

De interne controle dient aan de door de fabrikant gesteld eisen te voldoen. Indien dit niet het geval is genereert de Cobas Liat het resultaat invalid en moet de test herhaald worden.

### Remming:

Er is bij deze PCR sprake van remming als het monster 2x invalid is.

### Conclusie en discussie:

Uit deze vergelijking van de 2 verschillende apparaten ten opzichte van referentiepanels en klinische monsters, is gebleken dat de Cobas Liat voldoet aan de gestelde acceptatie criteria. De Cobas Liat kan per direct gebruikt worden in de huidige diagnostiek.

Uit ervaring met de Influenza A/B & COV2 test blijkt dat een invalid melding kan voorkomen als er slijm in de VTM aanwezig is. Dit materiaal moet eerst 1 minuut afgedraaid worden bij 14.000rpm. Wanneer het supernatant gebruikt wordt werkt de Cobas Liat hier wel op met overeenkomstige resultaten met de LC480.

### Aanbevelingen:

Aanbevolen wordt om op korte termijn de Cobas Liat in gebruik te nemen in de diagnostiek.

## # Kwaliteitsbeheersing

Voordat deze methode in gebruik genomen gaat worden, dienen de volgende acties uitgevoerd te worden:

#### 1. Testcodes definiëren:

Cobas Liat test kan is gedefinieerd in GLIMS en HiX.

#### 2. Werklijst definiëren

Een werkljst voor de Cobas Liat is gedefinieerd.

#### 3. Kwaliteitscontrole definiëren

Bij elk nieuw lotnummer moet een positieve en een negatieve controle getest worden om het lotnummer te verifiëren.

#### 4. Evt. online koppelingsresultaten verifiëren/printer installeren:

Koppeling met GLIMS zal gemaakt gaan worden, tevens gaat het apparaat aan netwerk gekoppeld worden, zodat de resultaten uitgeprint kunnen worden.

#### 5. Voorraadbeheer regelen:

De SARS-CoV-2 & Influenza A/B kit en de controle staan al in het bestelsysteem. De kit heeft artikelnummer 9211101190 en de controle heeft artikelnummer 9211128190. De minimale voorraad voor de kit is nu ingesteld op 4 kits (à 20 stuks). Er zijn 75 kits besteld, waarvan 9 kits geleverd, verwachting is wekelijks levering van 4-5 kits. Er wordt minimaal 1 controle per 500 tests (25 kits) besteld, meer indien het aantal lotnummers daar aanleiding toe geeft.

#### 6. SOP uitbreiden en geldig verklaren zodat de kit in gebruik kan worden genomen.

Een gebruikersvoorschrift is reeds beschikbaar in kwaliteitsportaal.

Iedere CBSL medewerker is ingewerkt voor het gebruik van Cobas Liat. Aanvragen voor deze testen zullen voornamelijk overdag ingezonden gaan worden, maar het is mogelijk om deze testen ook in de avonddiensten en weekenden te draaien.

Medewerkers die al bekwaam en bevoegd zijn voor het gebruik van andere testen op de Cobas Liat behoeven geen aparte training. Voor andere medewerkers wordt de Cobas Liat op de inwerklijst opgenomen.

## # Samenhangende procedures en formulieren

Algemene werkwijze moleculair

## # Bijlagen

N.v.t.

## # Literatuur

## # Akkoord verslag

Opstellers:

Naam:

5.1.2e

5.1.2e :

Datum:

12

Handtekening(en)

5.1.2e

5.1.2e

## # Einde docu

5.1.2e

# Validatie rapport SARS-CoV-2 PCR, extractie met InGenius en MagNA Pure 96

Naam auteur : ██████████ 5.1.2e / ██████████ 5.1.2e  
 Datum : 01-04-2020

## # Doel

Het doel van dit onderzoek is de validatie van de SARS-CoV-2- PCR op de Light Cycler 480 II.

## # Principe

Sinds maart 2020 is een SARS-CoV-2 pandemie gaande. Het RIVM en Erasmus MC hebben de protocollen opgesteld voor de detectie van dit virus met behulp van PCR. De protocollen, de primers en probes sequenties en de panels zijn beschikbaar gesteld om een validatie snel uit te voeren. De verkregen resultaten worden aan het RIVM gerapporteerd ter goedkeuring. Na deze goedkeuring mag het laboratorium zelfstandig diagnostiek doen. De eerste 10 negatieve en 5 positieve monsters ook bevestigd door het RIVM. Dit rapport beschrijft de validatie van real-time RT-PCR protocollen voor SARS-CoV-2 detectie.

## # Definities en afkortingen

AM	Arts-microbioloog
CBSL	Centraal Bacteriologisch en Serologisch Laboratorium
Ct	Cycle threshold
CTR-CPE	Interne Controle
DNA	Deoxyribonucleïnezuur
DTT	Dithiothreitol
MMM	Medisch Moleculair Microbioloog
PCR	Polymerase Chain Reaction
PPV	Positive predictive value
RNA	ribonucleïnezuur
UA	Uitvoerende analist
VA	Viserend analist

## # Doelgroep

Dit verificatie rapport is van toepassing op de medewerkers van het CBSL.

## # Veiligheid

Er wordt gewerkt met besmettelijk materiaal. Werk daarom volgens de algemene veiligheidsvoorschriften voor microbiologische laboratoria. De regels die hierop betrekking hebben liggen vast in: Veilig werken met micro-organismen, parasieten en cellen in laboratoria en andere werkruimten; theorie en praktijk, 4e editie, 1ste druk 2016.

Voor veiligheid specifiek voor de afdeling Moleculair, zie: ██████████ 5.1.2e [Algemene werkwijze Moleculair](#)

## # Verantwoordelijkheden

De UA is verantwoordelijk voor het volgens protocol uitvoeren van het onderzoek.

De VA is verantwoordelijk voor de administratieve resultaatverwerking.

De MMMer is verantwoordelijk voor de juiste interpretatie en technische validatie van deze testen.

De AM is verantwoordelijk voor het autoriseren van de onderzoeksresultaten.

## # Reagentia, media en hulpstoffen

- Nuclease Free water

- Guanidinium thiocyanat/Triton lysis buffer (blauwe lysis buffer)
- DTT 0.3%
- Epjes 1,5 ml
- LightCycler® Multiplex RNA Virus mastermix
- Thermofischer mastermix

De primers en probes zoals die gepubliceerd zijn door [5.1.2e](#), gebruikt (<https://www.eurosurveillance.org/content/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045>). Dit zijn primers en FAM gelabelde probes voor RdRP-gen en E-gen RT-PCR (tabel 1).

Tabel 1. Primers en probes en specificiteit

Target	Oligonucleotide	Sequentie	Specificiteit
RdRP gene	RdRp_SARSr-F	GTGARATGGTCATGTGTGGCGG	
	RdRp_SARSr-P2	FAM-CAGGTGGAACCTCATCAGGAGATGC-BBQ	Specifiek voor 2019-nCoV, zal SARS-CoV niet detecteren
	RdRp_SARSr-P1	FAM-CCAGGTGGWACRTCATCMGGTGATGC-BBQ	Pan Sarbeco-Probe zal 2019-nCoV, SARS-CoV and bat-SARS-related CoVs detecteren
	RdRp_SARSr-R	CARATGTTAAASACACTATTAGCATA	
E gene	E_Sarbeco_F	ACAGGTACGTTAATAGTTAATAGCGT	
	E_Sarbeco_P1	FAM-ACACTAGCCATCCTTACTGCGCTTCG-BBQ	Pan Sarbeco-Probe zal 2019-nCoV, SARS-CoV and bat-SARS-related CoVs detecteren
	E_Sarbeco_R	ATATTGCAGCAGTACGCACACA	

## # Apparatuur en hulpmiddelen

- ELITe InGenius Elitech
- ELITe InGenius SP 200 Extraction (cartridges)
- ELITe InGenius SP 200 Consumable Set
- ELITe InGenius PCR Cassette
- ELITe InGenius waste box
- Epjes 1,5 ml
- LC480 II 96 wells plate
- LC480 II: zie [5.1.2e](#) LightCycler 480
- MagNA Pure 96
- Filter tips 300 Axygen
- Pipetten P20, P200, P1000 met bijbehorende puntjes
- Vortex
- Centrifuge
- PCR kabinet
- Bioveiligheidskast/LAF kast

## # Biologisch materiaal

Respiratoir materiaal (sputa, bronchiaal secreet, BAL), keel en nasofarynx uitstrijk

## # Uitvoering

### Validatie/verificatie proces: Plan van aanpak

SARS-CoV-2 PCR is door de referentie labs, RIVM en EMC, gevalideerd en daarom zal er alleen een beperkte validatie uitgevoerd worden. Er wordt gewerkt volgens de instructies die gegeven zijn door deze twee laboratoria.

Volgende punten blijven onveranderd:

- Voorbehandeling materialen voor extractie; 5.1.2e Voorbehandeling van materialen voor DNA/RNA isolatie
- Extractie op InGenius
- Extractie op MagNA Pure 96

Naast Ingenius kan extractie ingezet worden op MagNa Pure 96 volgens de werkvoorschrift: WV-MOL-WVA Voorbehandeling van materialen voor DNA/RNA isolatie. Tussen extractie en PCR wordt nog een handeling verricht door PiRo, het apparaat pipetteert het eluaat bij de mastermix. De mixen worden gemaakt volgens WV-MOL-WVA Template mastermix. PCR wordt uitgevoerd op de Light Cycler 480 II. Voor primer en probe mix zie tabel 2.

Tabel 2. Primer probe mix

Target	Oligonucleotide	pmol per reactie	Eindconc in primer probe mix pmol/µl
RdRP gene	RdRp_SARSR-F	10	3.33
	RdRp_SARSR-P2	5	1.67
	RdRp_SARSR-P1	5	1.67
	RdRp_SARSR-R	10	3.33
E gene	E_Sarbeco_F	10	3.33
	E_Sarbeco_P1	5	1.67
	E_Sarbeco_R	10	3.33

Totale duur van het programma is 96 minuten.

Ivm gebrek aan reagentia is naast Roche Virus mastermix is ook Thermo Fisher Fast Viral master mix getest. Voor de resultaten zie tabel 5.

Tabel 3. Het PCR programma op de Light Cycler 480 II voor SARS-CoV-2- PCR:

Detection Format:			Multi Color Hydrolysis Probe		
PCR Program	Segment number	Temp Target (°C)	Hold Time (sec.)	Slope (°C/sec.)	Acquisition mode
Reverse Transcription	1	50	900	EXTERNAL	
Denaturation/Inactivation	1	95	120	EXTERNAL	
Denaturation	1	95	60	4.4	None
Amplification (cycles:50)	1	95	10	4.4	None
	2	58	30	2.2	Single
Cooling	1	40	30	4.4	None

Tabel 4. Verificatie/validatie parameters

Parameter	Verificatie
	CE-IVD/FDA/onderzoeksprocedure (van een ander lab) ZONDER AANPASSINGEN
1 Literatuuronderzoek	X
2 Analytische sensitiviteit	X, gedaan met de verdunningsreeksen van de SARS-CoV-1 en SARS-CoV-2 controles
2.1 Limit of detection/analytische sensitiviteit	X
2.2 Efficiëntie	X
2.3 Lineariteit (indien kwantitatief)	
3 Analytische specificiteit	X, gedaan met het panel van het RIVM
3.1 Specificiteit	
3.2 Selectiviteit	
4 Variatie	X
4.1 Intra-assay variatie	X
4.2 Inter-assay variatie	X
4.3 Juistheid en precisie	X

5	Robuustheid: testen van kritische punten (optioneel)	
6	Laboratorium validatie / accuraatheid	X, dmv opsturen van 5 positieve en 10 negatieve monsters ter bevestiging naar het RIVM
6.1	Sensitiviteit	
6.2	Specificiteit	
6.3	Prevalentie (prior kans)	
6.4	Positief voorspellende waarde	
6.5	Negatief voorspellende waarde	
7	Kwaliteitsbeheersing	X
7.1	GLIMS gereed maken (definiëren van testcodes, werklijsten, koppelingen, aanvraagcodes)	X
7.2	Kwaliteitscontroles definiëren	X
7.3	SOP z.s.m. geldig verklaren	X
7.4	Medewerkers inwerken (indien nodig)	X
7.5	De onderzoeksprocedure toevoegen in de Excel document met de verrichtingen en de hyperlink maken naar de juiste verificatie/validatie rapport	X
7.6	Prospectieve risico-analyse doen en bespreken met de medewerkers	X
7.7	PDCA volledig invullen	X
7.8	Communicatie naar de aanvragers	X (Indien nodig)

## Prestatiekenmerken en acceptatiecriteria

### Validatie/verificatie proces: uitvoering van plan

#### Analytische sensitiviteit

Voor de analytische sensitiviteit worden de verdunningen van twee controles van SARS-CoV-1 en SARS-CoV-2 voor het E-gen het RdRP-gen getest, zie tabel 5.

#### Analytische specificiteit

Voor het bepalen van de specificiteit van deze PCR worden er verschillende types Corona virussen getest, deze zaten in het RIVM panel, zie tabel 5.

#### Laboratorium validatie

Hiervoor zijn 5 positieve en 10 negatieve monsters ter bevestiging naar het RIVM gestuurd, zie tabel 5.

#### Acceptatie criterium laboratorium validatie:

De resultaten voor de SARS-CoV-2 detectie die zijn verkregen op het CBSL dienen overeen te komen met de resultaten van het RIVM.

Tabel 5. Resultaten voor SARS-CoV PCR geteste positieve RIVM panel en verdunningen van SARS-CoV-1 en SARS -CoV-2 run controles

Panellid nummer	E-gen RT-PCR	RdRP-gen RT-PCR	Resultaten RIVM E-gen	Resultaten RIVM RdRp gen
EQA_CoV20-01(Cov-229E)	-	-	-	-
EQA_CoV20-02(InfA-H3N2)	-	-	-	-
EQA_CoV20-03	26.58	28.75	23.30	25.59 (28.86)

EQA_CoV20-04(Cov-NL63)	-	-	-	-	
EQA_CoV20-05(Rhinovirus A16)	-	-	-	-	
EQA_CoV20-06	32,67	33,95		32,28	
EQA_CoV20-07(Geen virus)	-	-			
EQA_CoV20-08(Cov-OC43)	-	-			
EQA_CoV20-09(Inf B/Victoria)	-	-			
EQA_CoV20-10	31,32	32,84	28,89	31,04	
SARS-CoV-1 onvervd.	26,10	27,79	25,93	26,08	
SARS-CoV-1 10 <sup>-1</sup>	30,44	31,07	29,28	29,22	
SARS-CoV-1 10 <sup>-2</sup>	32,12	32,78	32,23	31,90	
SARS-CoV-1 10 <sup>-3</sup>	33,87	34,02	34,72	34,49	
SARS-CoV-1 10 <sup>-4</sup>	-	-	35,99	34,94	
SARS-CoV-1 10 <sup>-5</sup>	-	-	-	-	
SARS-CoV-1 10 <sup>-6</sup>	-	-	-	-	
SARS-CoV-1 10 <sup>-7</sup>	-	-	-	-	
SARS-CoV-2 onvervd	24,28	26,42	21,71	24,64	
SARS-CoV-2 10 <sup>-1</sup>	26,64	28,30	25,01	27,97	
SARS-CoV-2 10 <sup>-2</sup>	29,83	30,90	28,61	31,46	
SARS-CoV-2 10 <sup>-3</sup>	32,56	32,75	31,55	33,54	
SARS-CoV-2 10 <sup>-4</sup>	34,35	33,96	33,56	35,32	
SARS-CoV-2 10 <sup>-5</sup>	-	-	34,53	-	
SARS-CoV-2 10 <sup>-6</sup>	-	-	-	-	
SARS-CoV-2 10 <sup>-7</sup>	-	-	-	-	
Negatieve monster 1	-	-	-	-	
Negatieve monster 2	-	-	-	-	
Negatieve monster 3	-	-	-	-	
Negatieve monster 4	-	-	-	-	
Negatieve monster 5	-	-	-	-	
Negatieve monster 6	-	-	-	-	
Negatieve monster 7	-	-	-	-	
Negatieve monster 8	-	-	-	-	
Negatieve monster 9	-	-	-	-	
Negatieve monster 10	-	-	-	-	
Positieve monster 1	19,44		21,56	17,8	17,3
Positieve monster 2	21,85		26,8	22,6	19,9
Positieve monster 3	20,82		26,62	22	18,7
Positieve monster 4	22,17		23,81	22,8	20,6
Positieve monster 5	22,89		23,74	23,9	21,3

Tabel 5. Geteste monsters in Roche Virus mastermix en in Thermo Fisher Fast Viral master mix

Panellid nummer	RNA Virus Master			Thermofischer Fast Virus Mastermix		
	PDV	Egen/PDV	RdRP gen	PDV	Egen/PDV	RdRP gen
EQA_CoV20-01	-	-	-	25,46	-	-

EQA_CoV20-02	26,33	-	-	25,63	-	-
EQA_CoV20-03	-	26,62	28,73	25,5	24,92	27,46
EQA_CoV20-04	-	-	-	26,02	-	-
EQA_CoV20-05	26,35	-	-	25,68	-	-
EQA_CoV20-06	-	33,85	31,79	26,14	36,61	32,55
EQA_CoV20-07	26,66	-	-	25,9	-	-
EQA_CoV20-08	-	-	-	26,08	-	-
EQA_CoV20-09	26,6	-	-	25,97	-	-
EQA_CoV20-10	-	31,51	31,71	25,68	28,74	29,23
<b>Runcontrole SARS-CoV-1 (het 2003 SARS coronavirus) (PC1)</b>						
Run contr. onverdund	-	26,75	27,79	-	25,24	26,46
Run contr. 10-1	-	29,81	31,07	-	28,53	29,41
Run contr. 10-2	-	31,67	32,78	-	31,72	31,48
Run contr. 10-3	-	-	34,02	-	36,01	32,77
Run contr. 10-4	-	-	-	-	-	-
Run contr. 10-5	-	-	-	-	-	-
<b>Runcontrole SARS-CoV-2 (het 2019 nieuwe coronavirus) (PC2)</b>						
Run contr. onverdund	-	24,57	26,42	-	23,26	25,86
Run contr. 10-1	-	26,75	28,3	-	25,95	28,78
Run contr. 10-2	-	29,73	30,8	-	28,57	30,96
Run contr. 10-3	-	32,13	32,75	-	30,44	32,48
Run contr. 10-4	-	34,15	33,96	-	-	-
Run contr. 10-5	-	-	-	-	-	-
<b>Positieve samples</b>						
201101181	27,31	19,44	21,56	26,17	18,74	19,46
201101732	26,87	21,85	26,8	24,46	21,02	22,93
201200055	26,96	22,17	23,81	25,26	21,97	21,86
201200036	27,91	22,89	23,74	25,85	22,56	21,99

## # Interpretatie, berekening, uitslag

-Criteria voor positieve of negatieve uitslagen

SARS-CoV-2 diagnostiek, screening wordt gedaan met E-gen PCR met PDV (= interne controle) in 1 reactie (dwz multiplex PCR):

E-gen PCR uitslag negatief => negatief uitslaan

E-gen PCR uitslag positief met een Ct waarde onder 30 en een mooie S-curve=> positief uitslaan, geen aanvullende confirmatie PCR nodig. In GLIMS bij de RdRp PCR exacte dezelfde Ct waarde zetten als bij de E-gen PCR (dit is nodig om de monster positief uit te slaan).

PCR uitslag positief met een Ct waarde boven 30 => blijft een aandachtspunt. Is de curve S-vormig dan is confirmatie met RdRp PCR niet echt nodig. Is de curve afwijkend - PCR herhalen. E-gen en RdRp PCR doen.

Beide PCRs negatief: negatief uitslaan

Beide PCR positief met een mooie S-curve: Positief uitslaan, onafhankelijk van de Ct waarde

E-Gen PCR positief met een mooie S-curve en Ct >30 en RdRp PCR negatief: zwak positief uitslaan (RdRp is minder gevoelig, vandaar zwak positief uitslaan en in GLIMS voor RdRp PCR exact dezelfde CT waarde zetten als bij E-gen). Daarnaast een nieuw materiaal opvragen voor de bevestiging.

E-Gen PCR negatief en RdRp PCR positief met een mooie S-curve: herhalen inclusief nieuwe extractie en een nieuw monster opvragen.

- Remming

De remming van de PCR wordt gecontroleerd mbv PDV, voor geremde uitslagen zie uitleg die eerder beschreven is.

-Turn-a-round en hands-on time

Aan de hands-on time wordt niks veranderd. Voorbehandeling van de monsters blijft hetzelfde.

-Algemene conclusie

Uit deze validatie is gebleken dat de SARS-CoV-2 PCR voldoet aan de volgende voorwaarden:

- Proficiency panel van RIVM getest met goed resultaat.
- Runcontroles SARS-CoV-1 en SARS-CoV-2 verdunningsreeksen getest met goed resultaat
- Confirmatie van 5 positieve en 10 negatieve monsters bij de expertiselaboratoria met goed resultaat

Na het succesvol doorlopen van de drie validatiepunten kunnen we SARS-CoV-2 PCR diagnostiek uitvoeren.

- Aanbevelingen

Aanbevolen wordt om op korte termijn SARS-CoV-2 PCR in gebruik te nemen.

## # Kwaliteitsbeheersing

Voordat deze methode gebruikt gaat worden, dienen de volgende acties uitgevoerd te worden:

1. Testcodes definiëren; gedaan in GLIMS
2. Werklijst definiëren; gedaan in GLIMS
3. Kwaliteitscontrole definiëren; gedaan
4. Online koppelingsresultaten verifiëren, de koppeling in LabTrain
5. Voorraadbeheer regelen; gedaan
6. Medewerkers inwerken; bestaande apparatuur en werkljsten. Inwerken voor de moleculaire analisten niet nodig.
7. Er worden extra analisten ingewerkt, daarvoor komt wel een inwerklijst. gedaan

## # Samenhangende procedures en formulieren

Ingenius bedieningsvoorschrift

MagNa Pure bedieningsvoorschrift

PIRo bedieningsvoorschrift

PCR op LightCycler 480 (96 wells plaat - ATP / Borrelia / Bordetella / Influenza / RSV / Virale gastro-enteritis), werkvoorschrift

Risicomanagement CBSL, PRI

## # Bijlagen

[Info over de primers, probes, proficiency panel uit RIVM.pdf](#)

[Instructie PCR runcontrole EQA Panel SARS-CoV-2 voor niet-OAL.pdf](#)

[Bijlage 1 Protocollen SARS-CoV-2 diagnostiek RIVM-EMC.pdfBijlage 2](#)

[Euro Surveill 2020 25 3 pii 2000045 5.1.2e et al.pdf](#)

[Inwerklijsten extra analisten voor SARS diagnostiek.pdf](#)

## # Akkoord

Opsteller

5.1.2e

Datum : Maart 2020

Naam

Handtekening

5.1.2e

## # Einde document

5.1.2h

## Validatie rapport Pureprep96

Naam auteur : 5.1.2e  
 Datum : 03-02-2021

### # Doel

Het doel is om de Pureprep96 te valideren voor gebruik. Hiermee worden zowel de capaciteit vergroot voor het dagelijks aantal DNA/RNA extracties als de tijdsduur verkort voor een extractie.

### # Principe (inleiding)

DNA/RNA extractie uit een materiaal is een cruciale stap voor de PCR. In de lysis stap wordt het DNA/RNA vrijgemaakt, vervolgens wordt het DNA/RNA gebonden aan de magnetische beads en door middel van verschillende was stappen wordt het DNA/RNA gezuiverd (remmende stoffen worden verwijderd). Het verschil van de Pureprep96 t.o.v. andere extractie robots zoals bijvoorbeeld de MagNApure96 is dat er geen vloeistoffen gepipetteerd worden. De magnetische beads met DNA/RNA binden aan magnetische staafjes die alleen verticaal kunnen bewegen. De carousel met wasbuffers en elutiebuffer draait hieronder door. Dit versnelt het proces aanzienlijk.

Tijdens deze validatie gaan we gebruik maken van nasopharynx swabs in VTM buizen aangevraagd voor SARS-CoV-2. Later middels een nieuwe validatie wordt gekeken naar andere materialen voor extractie. Met de aanschaf van 2 Pureprep96 is het mogelijk om de capaciteit van de vele SARS-CoV-2 aanvragen te vergroten en te kunnen voldoen aan de verwachte vraag. Bovendien wordt met 2 Pureprep96's de continuïteit van dienstverlening geborgd bij uitval van een apparaat. Tevens wordt de tijd tot extractie ten opzichte van de MP96 verkleind van ~55 minuten naar ~25 minuten.

In deze validatie worden een aantal methodes van de PP96 (lang protocol, kort protocol, pipetteren middels Cybio Selma 96 en houdbaarheid van uitgevulde buffers) gevalideerd. Hierbij wordt de extractie van de PP96 vergeleken met de MP96 extractie aan de hand van Ct-waardes. De mastermix, volume RNA aan de mastermix en PCR template worden niet gewijzigd hierin.

### # Definities en afkortingen

AM	Arts Microbioloog
CBSL	Centraal Bacteriologisch en Serologisch Laboratorium
Cybio Selma 96	Pipetteer robot
DNA	Desoxyribo Nucleïc Acid
IC	Interne controle
LC480	LightCycler 480
MM	Master mix
MMM	Medisch Moleculair Microbioloog
MP96	MagNApure96
NEC	Negatieve Extractie Controle
PCR	Polymerase chain reaction
PEC	Positieve Extractie Controle
PiRo	Pipetting Robot
PP96	Pureprep96
Cq/Ct/Cp	Quantification cycle/threshold cycle/crossing point. Deze begrippen worden door elkaar gebruikt.
RNA	Ribo Nucleïc Acid
UA	Uitvoerend Analist
VA	Viserend Analist
VS	Vakspecialist
VTM	Virus Transport Medium

## # Doelgroep

Dit validatie rapport is van toepassing op de medewerkers van het CBSL. Elke medewerker die moleculaire werkzaamheden uitvoert dient dit rapport gelezen te hebben.

## # Veiligheid

Er wordt gewerkt met besmettelijk materiaal. Werk daarom volgens de algemene veiligheidsvoorschriften voor microbiologische laboratoria. De regels die hierop betrekking hebben liggen vast in: Veilig werken met micro-organismen, parasieten en cellen in laboratoria en andere werkruimten; theorie en praktijk, 3<sup>de</sup>, geheel herziene druk, 2009. Voor veiligheid specifiek voor de afdeling Moleculair, zie [WV-MOL-WVA Algemene werkwijze Moleculair](#)

## # Verantwoordelijkheden

De UA is verantwoordelijk voor het volgens protocol uitvoeren en de technische validatie van het onderzoek.

De VA is verantwoordelijk voor de administratieve resultaatverwerking.

De MMM is verantwoordelijk voor de juiste interpretatie van deze testen.

De AM is verantwoordelijk voor het autoriseren van de onderzoeksresultaten.

## # Reagentia, media en hulpstoffen

- o Lysis buffer
- o Binding buffer
- o Magnetische partikels (beads)
- o Proteïnase K
- o Poly-A-RNA
- o Poly-A-RNA buffer
- o Was buffer 1
- o Was buffer 2
- o Elutie buffer

## # Apparatuur en hulpmiddelen

- o Pureprep96
- o Tip comb
- o Deepwell plate
- o Elutie plate
- o Filtertips
- o (multichannel) pipet
- o Cybio Selma 96
- o Reagent reservoir (bakje voor vloeistoffen) voor zowel multichannel als Cybio Selma 96
- o Afplak folie voor platen

## # Biologisch materiaal

Nasopharynx uitstrijken in VTM

## # Uitvoering

### Validatie proces

Voor elke parameter die bepaald wordt in de validatie worden de acceptatiecriteria (prestatie kenmerken) bepaald. Voor elke parameter die niet gevalideerd wordt, wordt er beargumenteerd waarom dat niet gedaan wordt.

Tijdens deze validatie worden er geen wijzigingen gedaan in de PCR en PCR setup (Mastermix en template RNA), dus zal alleen een laboratorium validatie met de bijbehorende acceptatie criteria tussen de twee verschillende extracties (MP96 en PP96) gedaan worden. De analytische validatie (sensitiviteit, specificiteit en variatie) van de SARS-CoV-2 PCR zal niet gedaan worden. De Ct-waardes van de RNA's verkregen uit beide extracties worden met elkaar vergeleken.

Parameter	Validatie In-house óf CE-IVD/FDA/onderzoeksprocedure (van een ander lab) met aanpassingen.
1 Literatuuronderzoek	Nee
2 Analytische sensitiviteit	Nee
2.1 Limit of detection/analytische sensitiviteit	Nee
2.2 Efficiëntie	Nee
2.3 Lineariteit (indien kwantitatief)	Nee
3 Analytische specificiteit	Nee
3.1 Specificiteit	Nee
3.2 Selectiviteit	Nee
4 Variatie	Nee
4.1 Intra-assay variatie	Nee
4.2 Inter-assay variatie	Nee
4.3 Juistheid en precisie	Nee
4.4 Meetonzekerheid (kwantitatief gerapporteerde testen)	Nvt
5 Robuustheid: testen van kritische punten (optioneel)	Nvt
6 Laboratorium validatie / accuraatheid	Ja
6.1 Sensitiviteit	Ja
6.2 Specificiteit	Ja
6.3 Prevalentie (prior kans)	Ja
6.4 Positief voorspellende waarde	Ja
6.5 Negatief voorspellende waarde	Ja

Het validatie rapport bestaat uit 4 gedeeltes:

1. PP96 extractie middels 'standaard' protocol (~50 minuten) volgens fabrikant voorschriften
2. PP96 extractie middels 'kort' protocol (~25 minuten) volgens fabrikant voorschriften
3. Houdbaarheid testen van buffers indien klaargemaakt
4. Elutie in 50ul buffer ipv 100ul buffer

#### Prestatiekenmerken en acceptatiecriteria

Voor alle 4 de gedeeltes gelden dezelfde acceptatiecriteria:

- 1] De gemiddelde Ct-waarde van het E-gen target is maximaal 0,5 Cq-waarde hoger voor de te testen methode t.o.v. de referentiemethode.
- 2] De gemiddelde Ct-waarde van de Interne Controle (PDV) is maximaal 0,5 Cq-waarde hoger voor de te testen methode t.o.v. de referentiemethode.
- 3] Er zijn geen monsters met Cq<32 die een kwalitatief ander resultaat bevatten.

#### Laboratorium validatie:

Er zijn per gedeelte in totaal 96 monsters getest ter vergelijking. Deze monsters zijn uit de routine diagnostiek gehaald.

In gedeelte 1 wordt de PP96 extractie met het lange protocol vergeleken met MP96 extractie.

In gedeelte 2 wordt de PP96 extractie met het lange protocol vergeleken met de PP96 extractie met het korte protocol.

In gedeelte 3 wordt de houdbaarheid van de PP buffers vergeleken (beide kort protocol).

In gedeelte 4 wordt de PP96 extractie met 100ul elutievolume vergeleken met de PP96 extractie met 50ul elutievolume (beide kort protocol).

De Pureprep96 is na gedeelte 2 in gebruik genomen in de diagnostiek. Gedeelte 3 is voor praktische verbeteringen om de diagnostiek te optimaliseren. Dit is dus gedaan nadat de PP96 in gebruik genomen is.

In onderstaande tabel is het schema weergegeven volgens fabrikant om alle buffers en mixen te maken:

Tabel 1: pipetteer schema van mixen en buffers volgens fabrikant

Positie in PP96	Plaat	Type	Reagentia	Reagentie	volume voor 1 reactie	volume 100 reacties	
1.	Tip Plate	2 mL Deepwell plate	Tip-Com toevoegen, geen buffers	Tip-Com	-	-	
				1) lysis mastermix	200 µL	20 mL	
				Proteinase K	10 µL	1,0 mL	
				Poly-A-RNA	1 µL	100 µL	
				Totaal volume	211 µL	21,1 mL	
2.	Sample plate	2 mL Deepwell plate	2) Sample	PDV, toevoegen aan lysis mastermix	50 µL 1:10		
				Totaal volume	200 µL		
				3) Binding buffer mix	Binding Buffer U1	400 µL	40 mL
					Binding beads	20 µL	2 mL
					Totaal volume	420 µL	42 mL
3.	Wasbuffer 1 (1ste keer)	2 mL Deepwell plate	Wasbuffer 1	Totaal volume	800 µL	80 mL	
4.	Wasbuffer 1 (2de keer)	2 mL Deepwell plate	Wasbuffer 1	Totaal volume	800 µL	80 mL	
5.	Wasbuffer 2	2 mL Deepwell plate	Wasbuffer 2	Totaal volume	800 µL	80 mL	
5.	Elutie buffer	200 µL square-well Elution Plate	Elutiebuffer	Totaal volume	100 µL	10 mL	

Dit schema wordt gebruikt in gedeeltes 1 en 2 en is aangepast voor gedeeltes 3 en 4.

#### Gedeelte 1:

In het eerste gedeelte wordt de vergelijking getrokken tussen extractie op de MP96 ten opzichte van extractie met het lange protocol op de PP96.

In tabel 2 is het protocol weergegeven dat de Pureprep draait met het lange protocol.

Tabel 2: lange extractie protocol op de Pureprep

Lange protocol									
PP									
Stap	naam	plaat	mix tijd (min)	mix snelheid (%)	wacht tijd (min)	volume (µL)	mix snelheid (1-10)	tempratuur (Celsius)	
1	load	1							
2	bind	2	10	80	0	830	8	OFF	
3	wash1	3	1	80	0	800	7	OFF	
4	wash2	4	1	80	0	800	7	OFF	
5	wash3	5	1	80	10	800	7	OFF	
6	elution	8	10	80	0	100	4	60	
7	unload	2							

In tabel 3 zijn de resultaten weergegeven van dezelfde samples opgewerkt met de MP96 en de PP96.

Tabel 3: vergelijking Cq waarden MP96 met PP96 lang protocol

Nr	Name	MP96		PP96 lang	
		Egen	PDV	Egen	PDV
1	NAC_CoV2				
2	PEC_SARS-CoV2	25,83	28,86	25,63	28,67
3	917C005764901		26,12		26,82
4	917C005611401		26,08		26,93
5	917C004879101	28,13	26,43	23,31	26,49
6	917C005606301	20,68	25,29	18,43	26,59
7	917C004848401		26,21		27,07
8	917C005585401	33,17	26,12	34,49	27,28
9	917C005773901		26,22		27,48
10	917C005764601		26,26		26,97
11	917C005579901		26,17		26,85
12	917C004885201		26,29		27,03
13	917C004968101		26,08		27,31
14	917C005621301		26,21		27,10
15	917C005789401		26,03		26,67
16	917C005613901		26,08		26,79
17	917C005766801		25,82		26,15
18	917C006234601		25,69		26,61
19	917C005003901	22,95	25,24	22,55	26,11

20	917C005624501		26,02		26,07
21	917C005815701		26,09		27,01
22	917C006232401		26,05		26,85
23	917C005372401		26,12		26,91
24	917C005738501	27,91	25,99	25,62	26,22
25	917C004894301		26,09		27,21
26	917C005726301		25,99		27,13
27	917C005776401		26,20		27,15
28	917C005591201		26,09		26,97
29	917C005832301		26,02		26,91
30	917C005790301	24,23	25,54	23,05	26,10
31	917C005782001		25,93		26,89
32	917C005788701		26,16		27,00
33	917C006047301		26,20		27,11
34	917C004884101	20,08	25,37	19,51	26,43
35	917C005595401		25,92		27,12
36	917C005397601		26,19		26,98
37	917C005394301		26,07		27,47
38	917C005780101		26,06		27,00
39	917C005820001		25,91		26,42
40	917C005521601		26,11		26,93
41	917C005776701		26,12		27,02
42	917C005786501		25,87		26,54
43	917C005784901		25,95		26,80
44	917C004886701		25,93		26,94
45	917C005774601		26,06		27,01
46	917C005739601		26,13		27,08
47	917C005741901		26,27		27,09
48	917C005780001		26,17		26,97
49	917C005739401		26,35		27,19
50	917C005772501		26,14		27,03
51	917C005735401		25,96		27,24
52	917C005724501		26,01		26,96
53	917C005576201		26,01		26,51
54	917C005393901		26,23		27,04
55	917C005787301		26,09		27,00
56	917C005825401		26,23		27,11
57	917C005824401		25,99		26,93
58	917C005786801	32,03	26,12	29,65	27,08
59	917C005821901		26,07		26,98
60	917C005739901		26,21		27,11
61	917C004899701		26,18		26,35
62	917C005382401	32,14	26,34	31,00	27,09
63	917C005605401		26,13		27,04
64	917C005623701		26,18		26,84
65	917C005792601		26,18		27,05
66	917C005793101		26,30		27,08
67	917C006056601		26,32		27,13
68	917C005582801		26,58		26,97
69	917C005576101		26,15		26,93
70	917C005754901		26,19		26,98
71	917C006283601		25,33		27,52

72	917C005731401		26,24		27,05
73	917C005626701		26,13		26,80
74	917C005789801		26,28		27,07
75	917C005743701		26,16		26,98
76	917C005776901		26,29		27,41
77	917C005731701		26,19		26,83
78	917C005777601		26,15		26,18
79	917C005606901		26,29		27,03
80	917C005591701		26,25		26,66
81	917C005791401		26,17		26,85
82	917C005785201	21,60	25,25	20,91	26,28
83	917C005400201		26,36		27,09
84	917C005792301		26,34		27,17
85	917C005793401		26,18		27,04
86	917C005730101		26,20		27,15
87	917C005437201		26,07		26,73
88	917C006059101		26,18		26,91
89	917C005740201	22,88	25,31	20,66	26,58
90	917C005787501		26,43		27,46
91	917C005830401		26,44		27,34
92	917C005622001		26,70		26,25
93	917C005390601		26,72		26,98
94	917C004878601		26,19		27,88
95	b		26,73		27,84
	<b>Gemiddelde</b>	25,97	26,13	24,57	26,95

In tabel 3 is te zien dat kwalitatief alle resultaten overeen komen, dus aan acceptatiecriterium 3 is voldaan. De gemiddelde Ct-waarde van het E-gen target is 1,4 lager bij de Pureprep, d.w.z. gemiddeld is de concentratie amplificeerbaar target RNA meer dan 2x zo hoog in Pureprep extract. Aan acceptatiecriterium 1 is voldaan. De gemiddelde Ct waarde van de IC, PDV, is 0,82 hoger, dus aan acceptatiecriterium 2 is niet voldaan. Dit wordt geaccepteerd, omdat voor target RNA de Pureprep gevoeliger is en de inter-run-variatie binnen één methode groter blijkt dan het gestelde criterium (vergelijk gemiddelden voor PDV tussen verschillende MagNApure-runs en verschillende Pureprep-runs in tabel 3 en 4).

Omdat de diagnostiek op beide Purepreps getest kan worden is ook een diagnostiek run getest op de 2<sup>e</sup> PP96. Ook hierin is de vergelijking tussen MP96 en PP96 getrokken. In tabel 4 zijn de resultaten tussen de 2<sup>e</sup> PP96 en de MP96 weergegeven.

Tabel 4: resultaten Egen 2<sup>e</sup> PP96 en MP96

Name	MagNApure		Pureprep	
	Egen	PDV	Egen	PDV
917C004979701		26,68		27,79
917C005065501	22,66	25,62	22,16	26,29
917C005447801		26,62		27,23
917C005448001		26,49		27,32
917C005450001		26,49		27,27
917C005459801	23,23	25,51	21,83	26,47
917C005461101		26,52		27,09
917C005461901		26,27		27,48
917C005462301		26,48		27,65
917C005463701		25,64		27,12
917C005463901		26,24		27,10
917C005467601		26,48		27,44
917C005469401		26,33		27,23
917C005472201		26,58		26,98

917C005472601	23,64	25,67	22,69	26,65
917C005487201		26,57		27,61
917C005489401		26,49		27,81
917C005493801		26,53		27,61
917C005525601		26,10		27,14
917C005529301		26,51		27,61
917C005556001		26,31		27,13
917C005558401		26,60		27,55
917C005569601		26,29		27,42
917C005627501		26,54		27,12
917C005629201		26,31		27,20
917C0056305	21,08	25,73	19,64	26,97
917C005634101		26,32		27,42
917C005635401		26,64		27,43
917C005637001		26,04		26,77
917C005637801		26,20		26,92
917C005641801	23,10	25,77	22,52	26,26
917C005642801		26,25		27,55
917C005642901		26,31		27,32
917C005643201		26,18		27,26
917C005643501		26,18		26,83
917C005643601		26,78		27,54
917C005645801		26,29		27,20
917C005646701	18,99	26,17	18,54	26,92
917C005646901		26,14		27,24
917C005648301		26,25		27,18
917C005652401		26,20		27,09
917C005655401		26,43		27,79
917C005655501		26,43		26,12
917C005657101		26,24		26,92
917C005657201		26,45		27,20
917C005662401		26,25		27,46
917C005663101		26,54		26,73
917C005691401		26,45		27,42
917C005691901		26,63		27,27
917C005692701		26,61		27,03
917C005693401		26,10	32,09	27,57
917C005693601		26,52		27,54
917C005695001		26,28		27,10
917C005698401		26,21		27,18
917C005703801		26,25		27,23
917C005704101		26,25		27,28
917C005707301		26,50		27,48
917C005714001		26,30		27,57
917C005716501		26,31		27,60
917C005717301		26,60		27,31
917C005717401		26,25		26,99
917C005718001		26,57		27,31
917C005719001		26,43		27,45
917C005719301		26,45		27,46
917C005719701		26,28		26,73
917C005720001		26,63		27,57

917C005722001		26,24		27,32
917C005790801	32,35	26,34	31,74	27,06
917C005805701		26,64		27,19
917C005820901		26,33		27,15
917C005826901		26,34		27,46
917C005913401		26,47		27,23
917C005959601		26,13		27,24
917C005963701		26,29		27,27
917C005964801		26,58		27,57
917C005973101		26,22		27,46
917C005981701		26,33		27,45
917C005983301		26,47		27,14
917C005985601		26,63		27,56
917C005986501		26,26		26,95
917C005990301		26,48		27,00
917C005992601		26,57		27,43
917C005997201		26,24		27,26
917C006000401		26,43		27,31
917C006004801		26,45		27,13
917C006004901		26,24		27,50
917C006008401		26,62		27,28
917C006009001		26,31		26,73
917C006076401	19,75	25,67	18,97	26,83
917C006084701		26,48		27,21
917C006231001	21,25	25,46	19,90	26,84
917C006243801		26,76		27,21
917C006288101		26,63		27,62
Blanco		27,14		
NAC_CoV2				
PEC_SARS-CoV2	24,6	28,05	24,78	28,15
<b>Gemiddelde</b>	<b>23,07</b>	<b>26,35</b>	<b>22,28</b>	<b>27,23</b>

In tabel 4 is te zien dat sample 917C005693401 extra positief is met de extractie op de 2<sup>e</sup> PP96 tov de MP96. Dit wordt geaccepteerd aangezien de Ct>32 is en PP96 extractie gevoeliger is dan de MP96 extractie.

Tevens is te zien dat voor de blanco de PDV niet op komt. Hiervoor is PBS gebruikt ipv water. Beide discrepanties (917C005693401 en blanco) zijn niet meegenomen in de gemiddelde Ct-waarde.

De gemiddelde Ct-waarde van het E-gen target is 0,79 lager bij de Pureprep, d.w.z. gemiddeld is de concentratie amplificeerbaar target RNA hoger in Pureprep extract. Aan acceptatiecriterium 1 is voldaan.

De gemiddelde Ct waarde van de IC, PDV, is 0,92 hoger voor de Pureprep t.o.v. de MagNAPure. Aan acceptatiecriterium 2 is niet voldaan. Dit wordt geaccepteerd, omdat voor target RNA de Pureprep gevoeliger is en de inter-run-variatie binnen één methode groter blijkt dan het gestelde criterium (vergelijk gemiddelden voor PDV tussen verschillende MagNAPure-runs en verschillende Pureprep-runs in tabel 3 en 4).

#### **Gedeelte 2:**

In het tweede gedeelte wordt de vergelijking getrokken tussen extractie met het lange protocol en het korte protocol op de PP96.

Er is RNA geëxtraheerd van 48 monsters met het lange protocol en van dezelfde 48 monsters met het korte protocol. Deze in totaal 96 samples zijn in 1 PCR run getest. Het korte extractie protocol van de Pureprep staat weergegeven in tabel 5. De resultaten van het verschil tussen het lange en het korte extractie protocol staan weergegeven in tabel 6.

Tabel 5: korte extractie protocol op de Pureprep

Korte protocol PP								
Stap	naam	plaat	mix tijd (min)	mix snelheid (%)	wacht tijd (min)	volume (µL)	mix snelheid (1-10)	tempratuur (Celsius)
1	load	1						
2	bind	2	5	80	0	830	8	OFF
3	wash1	3	1	80	0	800	8	OFF
4	wash2	4	1	80	0	800	8	OFF
5	wash3	5	1	80	5	800	8	OFF
6	elution	8	5	80	0	100	5	60
7	unload	2						

Tabel 6: vergelijking lang en kort protocol op de PP96

Name	Pureprep kort protocol		Pureprep lang protocol	
	Egen	PDV	Egen	PDV
NAC_CoV2				
PEC_SARS-CoV2	25,40	28,64		
1	23,29	26,75	22,81	26,02
2	22,92	26,50	22,90	26,04
3	23,15	-	22,75	25,98
4	23,41	26,83	22,92	26,06
5	22,92	26,71	23,04	26,23
6	23,10	26,80	22,64	26,02
7	22,93	26,96	23,32	26,48
8	23,09	26,65	23,12	25,96
9	23,50	26,80	22,95	26,01
10	23,16	26,51	23,01	26,20
11	23,08	26,61	22,86	25,98
12	23,28	26,81	23,45	26,58
13		27,30		26,45
14		26,61		26,48
15		27,17		26,46
16		27,25		26,21
17		27,46		26,62
18		26,56		26,84
19		27,47		26,87
20		27,58		26,91
21		27,13		26,75
22		27,32		26,90
23		27,20		27,48
24		27,46		27,61
25		27,48		27,49
26		24,02		26,61
27		27,21		26,83
28		27,18		26,69
29		27,61		26,75
30		27,46		26,76
31		27,63		26,96
32		27,18		26,16
33		27,46		26,63
34		27,24		26,85
35		27,42		26,78

36		26,47		26,79
37		27,44		26,72
38		27,47		26,93
39		27,23		27,06
40		27,22		28,09
41		27,30		26,67
42		27,73		26,58
43		27,44		26,66
44		27,74		26,85
45		27,57		26,61
46		27,26		26,71
<b>Gemiddelde</b>	<b>23,15</b>	<b>27,09</b>	<b>22,98</b>	<b>26,64</b>

In de resultaten van tabel 6 is te zien dat bij monster 3 van het korte protocol de PDV niet positief is. Dit wordt geaccepteerd, omdat het target (Egen) wel positief is en het sample correct als positief uitgeslagen zou worden in de diagnostiek. Tevens wordt de PEC in het korte protocol wel gedetecteerd en niet in het lange protocol. Dit is een incident en is niet meegenomen in de gemiddelde Ct-waarde berekening.

De gemiddelde Ct-waarden zijn <0,5 afwijkend tussen beide protocollen en het kwalitatief resultaat van alle samples is overeenkomend. Hiermee wordt voldaan aan alle acceptatiecriteria.

In november 2020 is ook een landelijk external quality assessment (LEQA) panel rondgestuurd door het RIVM. De samples zijn in alle workflows op het CBSL getest. In tabel 7 staan de resultaten van de PP96 (kort protocol) en de MP96 weergegeven.

Tabel 7: Resultaten LEQA panel RIVM

Panel codering	Pureprep96 --> LC480	Magnapure96 --> LC480	Virus	Conclusie	Type
LEQA_CoV20-1	pos	pos	SARS-CoV-2	pos	core
LEQA_CoV20-2	neg	neg	Corona NL63	neg	core
LEQA_CoV20-3	neg	neg	Corona 229E	neg	core
LEQA_CoV20-4	neg	neg	SARS-CoV-2	zwak pos	educational
LEQA_CoV20-5	pos	neg	SARS-CoV-2	pos	core
LEQA_CoV20-6	neg	neg	Corona OC43	neg	core
LEQA_CoV20-7	pos	pos	SARS-CoV-2	pos	core
LEQA_CoV20-8	neg	neg	Influenza A	neg	core
LEQA_CoV20-9	neg	neg	Negatief	neg	core
LEQA_CoV20-10	pos	pos	SARS-CoV-1	pos	educational

Wat in tabel 7 te zien is, is dat monster 5 wel positief gedetecteerd wordt middels de PP96 ten opzichte van de MP96. Met beide systemen wordt (educational) monster 4 gemist. De PP96 met het korte protocol is in deze rondzending gevoeliger dan de MP96.

### Gedeelte 3:

In gedeelte 3 wordt getest of de buffers na uitvullen langer houdbaar zijn dan bij direct gebruik na klaarmaken en of de binding buffer al toegevoegd kan worden aan de lysis mastermix.

Er zijn een paar variabelen getest nadat ze aangemaakt/uitgevuld zijn vanuit de fles:

1. Houdbaarheid wasbuffer 1 en wasbuffer 2
2. Houdbaarheid elutiebuffer
3. Houdbaarheid lysis mastermix+PDV
4. Houdbaarheid lysis mastermix+PDV met toevoegen 1<sup>o</sup> deel binding buffer

1. Houdbaarheid wasbuffer 1 en wasbuffer 2:

Om de houdbaarheid van de wasbuffers te testen is er wasbuffer gemaakt, afgedekt en 1 dag bewaard. Uitsluitend PDV is vergeleken van 2 verschillende data sets en weergegeven in tabel 8, omdat bij E-gen target de houdbaarheid van het monster invloed zou kunnen hebben. Het korte protocol is gebruikt.

Tabel 8: Vergelijking wasbuffer houdbaarheid. Dag 1 is 1 dag oude buffer en dag 0 is verse buffer.

	Wasbuffers dag 1	Wasbuffers dag 0
	PDV	PDV
1	28,18	28,76
2	27,31	28,87
3	27,73	28,51
4	28,92	28,59
5	28,50	28,68
6	29,11	28,71
7	29,09	28,16
8	28,81	28,85
9	28,92	28,23
10	29,57	29,02
11	29,50	28,89
12	29,16	28,99
13	29,23	28,23
14	28,30	27,89
15	28,03	27,74
16	28,57	28,53
17	28,67	28,44
18	29,47	28,61
19	29,55	28,06
20	29,69	28,34
21	29,16	28,89
22	29,73	29,42
23	29,79	28,64
24	29,19	29,54
25	28,91	27,75
26	27,73	28,15
27	28,80	28,61
28	27,85	28,49
29	29,24	28,69
30	28,99	28,94
31	29,51	28,83
32	28,99	28,84
33	29,16	27,20
34	29,78	29,02
35	28,78	29,49
36	29,04	29,26
37	28,71	27,77
38	28,68	28,19
39	28,97	27,67
40	29,02	28,98
41	28,27	28,65
42	29,08	28,85
43	29,52	28,60
44	29,45	28,87
45	29,70	28,52
46	28,02	28,93
47	29,66	28,33
48	29,21	28,95
49	28,59	27,25

50	28,94	27,77
51	29,27	28,58
52	29,41	27,71
53	28,83	28,74
54	28,71	27,77
55	29,68	27,85
56	29,71	29,14
57	29,10	29,09
58	29,93	28,85
59	29,44	28,85
60	29,45	29,20
61	28,77	26,62
62	28,48	28,43
63	28,87	27,04
64	28,60	28,60
65	28,85	27,91
66	29,08	29,16
67	29,47	27,61
68	27,59	29,31
69	27,90	28,77
70	29,54	28,92
71	29,58	29,27
72	30,31	29,51
73	28,88	28,44
74	28,79	27,45
75	29,54	28,56
76	29,17	28,31
77	28,83	28,49
78	28,47	28,67
79	29,19	28,76
80	29,45	28,79
81	28,87	29,58
82	29,45	28,89
83	29,47	28,82
84	28,00	28,03
85	26,86	27,97
86	28,33	28,66
87	29,56	26,50
88	28,71	28,28
89	29,46	28,43
90	29,64	28,61
91	29,26	28,28
92	29,86	29,61
93	29,65	29,29
94	29,58	29,22
95	29,73	29,52
96	29,07	28,89
Gemiddelde	29,01	28,54

In tabel 8 is te zien dat de PDV gemiddelde Ct-waarde  $<0,5$  afwijkt. Hiermee wordt voldaan aan acceptatie criterium 2 en is dit toegestaan.

Wat tevens te zien is, is dat de waardes niet structureel lager zijn met gebruik 1 dag oude wasbuffer, maar dat dit fluctueert. De ene keer levert dag 0 wasbuffer betere resultaten en de andere keer dag 1 wasbuffer.

## 2. Houdbaarheid elutiebuffer

Om de houdbaarheid van de elutiebuffer te testen is er elutiebuffer gemaakt, afgedekt en 1 dag bewaard. PDV is vergeleken van 3 verschillende data sets en weergegeven in tabel 9. Het gemiddelde van 2 datasets van dag 0 zijn gebruikt ten opzichte van 1 dag 1 dataset.

Tabel 9: Vergelijking elutiebuffer houdbaarheid. Dag 1 is 1 dag oude buffer en dag 0 is verse buffer.

	dag 1	dag 0	dag 0
	PDV	PDV	PDV
1	29,57	30,84	28,11
2	29,21	30,07	28,45
3	29,17	30,25	27,43
4	29,63	30,55	27,98
5	29,88	30,73	26,92
6	28,98	30,75	27,91
7	29,57	29,94	27,94
8	29,83	29,51	27,89
9	29,69	30,12	28,59
10	29,58	30,53	29,18
11	29,43	30,09	28,24
12	27,46	29,17	27,17
13	29,54	30,44	27,65
14	29,45	29,00	29,44
15	29,93	29,30	29,00
16	29,42	29,78	27,91
17	29,78	30,11	28,01
18	29,90	29,97	27,91
19	28,84	28,27	28,08
20	28,64	29,01	28,14
21	29,67	29,45	28,54
22	29,71	29,64	27,57
23	29,52	29,82	28,26
24	27,19	28,72	26,86
25	29,19	28,79	27,63
26	29,68	29,92	27,75
27	29,61	29,08	28,55
28	29,12	29,94	28,15
29	29,67	29,28	28,48
30	29,49	29,65	27,68
31	29,61	29,46	28,28
32	29,80	29,07	28,59
33	29,81	29,44	28,17
34	29,85	29,29	28,88
35	29,94	29,55	27,91
36	27,59	28,76	27,21
37	29,21	29,04	27,71
38	29,52	29,47	29,57
39	29,32	29,14	28,60
40	28,11	29,09	28,65
41	29,04	28,97	27,22

42	29,59	29,60	27,50
43	28,80	29,32	28,46
44	29,63	29,04	28,18
45	29,58	29,17	28,25
46	29,67	29,13	28,80
47	29,61	28,63	28,45
48	27,62	28,46	26,72
49	28,96	29,00	27,92
50	29,34	29,23	29,44
51	29,74	29,35	27,27
52	29,58	29,03	27,92
53	29,14	28,88	28,04
54	28,94	29,16	27,25
55	29,96	29,54	28,00
56	29,19	29,16	28,89
57	29,91	28,87	27,87
58	29,72	28,87	29,08
59	29,72	28,80	27,80
60	27,64	28,60	27,53
61	29,48	28,89	28,47
62	28,51	29,31	28,43
63	28,86	29,19	27,88
64	29,46	29,14	28,26
65	29,64	29,20	27,94
66	29,35	29,25	27,65
67	29,59	29,01	28,28
68	29,09	28,90	28,44
69	29,77	28,67	28,15
70	29,47	27,61	28,54
71	29,44	28,92	28,10
72	28,15	28,73	27,28
73	29,67	29,01	28,19
74	29,02	29,21	27,63
75	29,77	28,08	28,45
76	28,66	29,30	28,48
77	29,74	29,67	27,54
78	30,49	29,20	27,94
79	29,80	29,26	29,00
80	29,30	28,33	28,66
81	29,74	28,84	28,21
82	29,62	28,29	28,49
83	29,49	28,97	28,25
84	27,28	28,57	26,79
85	29,44	28,38	27,78
86	29,29	29,31	28,25
87	28,25	29,81	26,92
88	29,61	29,26	28,46
89	29,05	29,09	27,63

90	29,84	29,12	28,82
91	29,61	28,71	28,45
92	29,96	28,50	27,21
93	29,16	28,92	28,58
94	29,54	28,77	28,43
95	29,57	29,01	28,81
Gemiddelde	29,32	28,67	

In tabel 9 is zichtbaar dat de gemiddelde afwijking >0,5 Ct is van de 1 dag oude elutiebuffer ten opzichte van de vers gemaakte elutiebuffer. Het bewaren van elutiebuffer is géén optie.

### 3. Houdbaarheid lysis mastermix+PDV

Er is een verdunningsreeks van een sterk positief monster getest ( $10^4$  -  $3$  t/m  $10^4$  -  $6$ ) en in triplo getest. Daarnaast is een NAC, PEC en Blanco meegenomen. Deze verdunningen worden getest met lysis mastermix+PDV die: vers is, 1 dag oud is en 5 dagen oud is. In tabel 10 is het gemiddelde van zowel Egen als PDV zichtbaar voor de verschillende dagen:

Tabel 10: vergelijking houdbaarheid van de lysis mastermix + PDV

Sample	1 dag Egen	1 dag PDV	5 dagen Egen	5 dagen PDV
NAC	>45	>45	>45	>45
PEC	25,10	28,73	23,74	27,14
Blanco	>45	27,47	>45	27,24
Gemiddelde 1:1000	22,38	26,24	22,03	26,44
Gemiddelde 1:10.000	25,62	26,73	25,77	27,11
Gemiddelde 1:100.000	28,30	26,93	28,99	27,13
Gemiddelde 1:1.000.000	32,18	27,04	32,11	27,27

In tabel 10 is zichtbaar dat de lysis mastermix+PDV even goed bruikbaar is na 5 dagen als na 1 dag.

### 4. Houdbaarheid lysis mastermix+PDV met toevoegen 1° deel binding buffer

In deze houdbaarheid test wordt eerst een lysis mastermix+PDV gemaakt en wordt hieraan al een gedeelte van de bindingbuffer toegevoegd (220ul). Dit zorgt ervoor dat er in het tweede gedeelte bindingbuffer+beads nog 200ul overblijft wat in 1x te pipetteren valt met de Cybio Selma 250ul. In tabel 11 is het schema weergegeven van de buffers.

Tabel 11: pipetteer schema van mixen en buffers na aanpassing CBSL

Positie in PPS96	Plaat	Type	Reagentia	Reagentie	volume voor 1 reactie	volume 100 reacties	
1	Tip Plate	2 mL Deepwell plate	Tip-Com toevoegen, geen buffers	-	-	-	
2	Sample plate	2 mL Deepwell plate	1) Lysis mastermix	Lysisbuffer	200 µL	20 mL	
				Proteinase K	10 µL	1,0 mL	
				Poly-A-RNA	1 µL	100 µL	
				PDV 1:10	0,5 µL	50 µL 1:10 = 100 reacties	
				Bindingbuffer U1	220 µL	22 mL	
				Totaal volume	431 µL	43,15 mL	
2	Sample plate	2 mL Deepwell plate	2) Sample	Totaal volume	200 µL	20 µL	
						100 reacties	110 reacties
				Bindingbuffer U1	180 µL	18 mL	19,8 mL
				Binding beads	20 µL	2 mL	2,2 mL
			Totaal volume	200 µL	20 mL	22 mL	
						100 reacties	
3	Wasbuffer 1 (1ste keer)	2 mL Deepwell plate	Wasbuffer 1	Totaal volume	800 µL	80 mL	
4	Wasbuffer 1 (2de keer)	2 mL Deepwell plate	Wasbuffer 1	Totaal volume	800 µL	80 mL	
5	Wasbuffer 2	2 mL Deepwell plate	Wasbuffer 2	Totaal volume	800 µL	80 mL	
8	Elutie buffer	200 µL square-well Elution Plate	Elutiebuffer	Totaal volume	100 µL	10 mL	

In tabel 12 staan de resultaten tussen lysismastermix+PDV en lysismastermix+PDV+deel 1 binding buffer volgens het schema in tabel 11 kort protocol.

Tabel 12: vergelijking lysismastermix+PDV tegen lysismastermix+PDV+binding deel 1

Name	Origineel		Lysismastermix+PDV+binding	
	PDV	Egen	PDV	Egen
NAC_CoV2				
PEC_SARS-CoV2	25,56	22,17	25,91	22,53
917C006807101	26,90		27,45	
917C004336001	27,01		27,42	
917C006861801	27,80		27,69	
917C006820701	27,77		28,33	
917C006802901	27,11		27,42	
917C004664601	27,10		27,27	
917C004350301	27,16		27,48	
917C006858901	26,89		27,55	
917C006784001	28,10		27,50	
917C004343001	28,69		27,62	
917C006795801	28,80		27,81	
917C004658801	27,15		27,06	
917C006782201	27,08		27,58	
917C006433301	28,26		27,18	
917C006487501	27,17		27,43	
917C006797201	27,03		28,16	
917C004337301	27,56		27,44	
917C006799701	27,15		28,42	
917C006790101	26,92		28,00	
917C006857001	27,66		26,87	
917C006777701	27,57		27,61	
917C004529401	28,33		27,97	
917C006862001	26,93		27,62	
917C006839901	27,09		27,79	
917C006960001	26,08	21,45	28,20	20,76
917C006784801	26,27		27,56	
917C004204001	27,55		27,16	
917C006799201	26,93		27,50	
917C006792301	26,77	27,98	27,73	28,06
917C004350601	27,59		27,15	
917C006849201	26,79	17,84	27,76	19,28
917C006787201	27,27		27,72	
917C006770601	26,35	25,27	28,08	25,76
917C004140201	27,24		26,72	
917C006831301	27,15		28,00	
917C006784501	27,05		27,70	
917C006775201	27,20		27,60	
917C004528401	27,65		27,71	
917C004672301	26,73		27,56	
917C004334701	26,56		27,60	
917C006806701	27,25		27,54	
917C006797701	27,31		27,56	
917C004340401	27,03		27,76	
917C004367001	26,75	20,23	27,79	20,31
917C004348701	27,35		27,20	

917C004202201	27,27		27,72	
917C004534501	27,64		27,89	
917C006801701	29,21		28,66	
917C006771801	27,95	18,70	28,18	19,45
917C006791701	27,73		27,30	
917C006857701	27,77		28,24	
917C006811901	27,88		28,18	
917C006803601	27,23		28,57	
917C004663001	27,23		28,15	
917C006773501	26,74	25,24	27,72	25,49
917C006799601	27,06		27,08	
917C006796201	27,77		27,86	
917C006851201	27,47		28,53	
917C006735401	27,61		28,54	
917C006793101	27,55		27,92	
917C006796901	27,78		28,19	
917C004362801	27,80		27,63	
917C004369601	27,50		27,71	
917C006798501	28,08		28,00	
917C006775401	27,16		27,21	
917C006791801	28,15		27,84	
917C004664701	27,84		28,05	
917C006799801	27,85		28,45	
917C004354901	27,70		28,42	
917C004339201	27,62	29,94	28,04	30,48
917C006798401	27,83		28,10	
917C004535001	27,80		28,09	
917C004353901	27,45		28,26	
917C006795401	28,08		28,21	
917C004541401	27,69		27,96	
917C003354701	27,61		28,20	
917C006772001	28,45		27,87	
917C006775101	27,78		28,01	
917C006830401	27,70		28,17	
917C004337701	27,79		28,34	
917C004341001	27,80		28,25	
917C004783001	28,04		28,34	
917C006729401	26,62	25,76	28,35	25,96
917C004787001	28,12		27,10	
917C006780801	27,86		28,45	
917C006856001	27,97		28,48	
917C006861901	27,53		28,29	
917C003871201	27,72		28,07	
917C006835101	28,07		27,85	
917C006824901	27,84		28,57	
917C006806101	27,94		27,98	
917C006808101	29,15		28,77	
<b>Gemiddelde</b>	<b>27,48</b>	<b>23,46</b>	<b>27,83</b>	<b>23,81</b>

In tabel 12 is te zien dat de gemiddelde afwijking van de Ct-waardes  $< 0,5$  is en kwalitatief de resultaten niet afwijken. Dit valt geheel binnen de gestelde acceptatiecriteria, wat inhoudt dat lysismastermix+PDV+binding buffer aangemaakt kan worden en 2 dagen bewaard kan blijven in de koelkast.

In tabel 13 staat opgesomd weergegeven hoe lang de buffers bewaard kunnen blijven.

Tabel 13: Houdbaarheid van de buffers

Buffer:	Tijd:
Lysisbuffer (PDV+ProtK+PolyA)	5 dagen (Koelkast)
Lysisbuffer (PDV+ProtK+PolyA) + binding buffer	1 dag (Koelkast)
Was buffer I	1 dag (afdekken)
Was buffer II	1 dag (afdekken)
Binding buffer + beads	1 dag (Bij voorkeur vers maken)
Elutiebuffer	Zelfde dag

**Gedeelte 4:**

In gedeelte 4 wordt de PP96 extractie in 100ul elutiebuffer vergeleken met de PP96 extractie in 50ul elutiebuffer (beide kort protocol). Er wordt bekeken of 50ul eluaat de gevoeligheid vergroot van het Egen. Van dezelfde samples is twee keer een extractie gedaan; 1x in 100ul eluaat en 1x in 50ul eluaat. Beide eluaten zijn gescheiden van elkaar in de PCR gegaan. In tabel 14 zijn de resultaten hiervan te zien.

Tabel 14: 100ul vs 50ul elutie buffer

Name	Pureprep 50ul eluaat		Pureprep 100ul eluaat	
	PDV	Egen	PDV	Egen
21060264301	26,32		27,63	
21060254901	26,92		27,77	
21060246201	26,79		27,89	
917C0088792	27,07		27,98	
917C0093993	26,56	25,02	27,26	25,87
917C0093938	27,07		28,15	
917C0085109	27,01		28,11	
917C0073800	27,21		27,90	
917C0093855	27,00		27,93	
917C0093817	26,92		27,86	
917C0082864	26,88		27,88	
917C0082816	26,84		28,09	
917C0091147	26,92		27,87	
21060253601	26,76	18,32	27,60	18,83
21060250101	30,49	17,98	29,52	16,19
917C0093970	27,13		28,02	
917C0093858	26,57	19,72	27,47	20,19
917C0095133	27,04		28,00	
917C0085057	26,95		27,89	
917C0093871	27,11		27,90	
917C0108768	26,95		28,12	
917C0083177	27,07	36,49	28,02	36,26
917C0108766	27,13		28,03	
917C0093957	26,92		27,89	
917C0100787	26,73		27,80	
21060251301	26,89		27,74	
21060251801	26,82	16,01	27,93	15,68
917C0085328	26,96		28,00	
917C0093882	27,03		27,73	
917C0085136	27,08		27,94	
917C0084581	27,03		27,95	
917C0109757	27,04		28,01	
917C0093895	27,09		28,08	
21060264401	27,00		28,10	
917C0108136	27,00		27,94	
917C0094033	26,94		27,76	

917C0094004	26,07	20,59	27,11	21,62
21060250601	26,93		27,88	
21060251701	26,97		27,78	
917C0093880	27,02		27,96	
917C0103208	27,08		27,92	
917C0085706	26,95		27,87	
917C0085292	27,01		27,88	
917C0093893	27,01		28,03	
917C0092726	26,96		27,90	
21060263701	27,77		28,14	
917C0085211	26,96		27,83	
917C0094024	27,01		27,97	
917C0093942	26,81		27,72	
21060249601	26,92		27,51	
917C0085297	26,92		27,70	
917C0093896	26,95		27,88	
917C0082976	27,08	34,83	27,99	35,86
917C0084582	26,97		27,98	
917C0093972	27,02		28,12	
917C0093865	27,08		27,98	
917C0085260	27,07		27,67	
917C0100804	27,06		28,05	
917C0101966	26,98		28,03	
pec	25,91	23,47	27,12	24,50
917C0102070	26,88		27,70	
21060249101	26,88		27,88	
917C0093959	26,93		27,79	
917C0094012	26,95		27,94	
917C0094027	26,96		27,79	
917C0101811	27,03		28,03	
917C0074377	26,95		28,00	
917C0093778	27,06		27,94	
917C0093699	26,91		28,00	
917C0108753	26,76	17,58	27,63	18,15
917C0101654	26,97		27,91	
nec	26,75		27,83	
917C0109610	26,90		27,90	
21060251201	27,43		28,47	
917C0082946	26,90		27,92	
917C0093930	27,00		27,94	
917C0093861	26,94		28,05	
917C0093813	27,08		27,99	
917C0093758	26,99		27,96	
917C0085370	26,80		27,60	
917C0093919	27,05		27,91	
917C0085353	26,98		27,74	
917C0101646	26,48	18,89	27,74	19,26
21060255101	26,57		26,95	
21060250401	27,05		27,73	
21060236101	26,88		27,77	
917C0089571	26,89		27,79	
917C0085154	26,14	20,81	27,17	21,73

917C0108235	26,77		27,91	
917C0094383	26,92		28,01	
917C0085142	27,51		27,97	
917C0085047	26,84		27,84	
917C0088623	26,85		28,01	
917C0093729	26,63	26,47	27,47	27,17
<b>Gemiddelde</b>	<b>26,96</b>	<b>22,78</b>	<b>27,87</b>	<b>23,18</b>

In tabel 14 is te zien dat de gemiddelde Ct-waarde <0,5 afwijkt en het kwalitatieve resultaat niet afwijkt. Hiermee wordt voldaan aan de criteria en is dit toegestaan. De beoogde verhoging van de gevoeligheid is kleiner dan verwacht. Er is echter ook geen verhoogde remming te zien in de PDV data. Beide elutievolumina voldoen.

## # Interpretatie, berekening, uitslag

- Turnaround-time en hands-on time

De turnaround time voor extractie is verkort van ~55 minuten naar ~25 minuten.

De hands-on-time is een paar minuten langer geworden mits je 1 run draait. Dit heeft te maken met het maken en uitvullen van alle buffers. Indien buffers gemaakt worden voor meerdere runs dan is de extra arbeid een fractie langer gemiddeld per run.

- Algemene conclusie

De Pureprep96 is een toevoeging voor de extractie van materialen op het CBSL. De capaciteit is hiermee vergroot en detectie via Pureprep96 is een fractie gevoeliger dan de MagNAPure96. Alle resultaten wijken kwalitatief niet af en de gemiddelde afwijking is voor het Egen kleiner dan 0,5 waarmee aan de acceptatiecriteria voldaan wordt.

- Aanbevelingen

Aanbevolen wordt om de Pureprep96 direct in gebruik te nemen als vervanging/aanvulling op de MP96 diagnostiek voor SARS-CoV-2.

## # Kwaliteitsbeheersing

Als deze methode in gebruik genomen gaat worden, dienen de volgende acties uitgevoerd te worden:

Nr.	Actie	Gedaan
1	Testcodes definiëren (bij methode)	Nvt
2	Werklijst definiëren (bij methode)	Nvt
3	Kwaliteitscontrole definiëren (bij methode)	Nvt
4	Evt. on-line koppelingsresultaten verifiëren (bij methode)	Nvt
5	Voorraadbeheer regelen	Ja
6	Bediendingsvoorschrift/werkvoorschrift z.s.m. geldig verklaren	Ja
7	Medewerkers inwerken	Ja
8	De onderzoeksprocedure toevoegen in het Excel document met de verrichtingen en de hyperlink maken naar de juiste verificatie/validatie rapport	Ja
9	PRI uitvoeren en PRI bespreken met medewerkers	Ja
10	PDCA invullen (alle stappen tot aan het eind) en daarin evaluatie datum inplannen	Nvt
11	Aanvragers informeren (nieuwsbrief, mail, website)	Nvt

## # Samenhangende procedures en formulieren

[WV-MOL-WVA Algemene werkwijze Moleculair](#)  
[PR storingen, melding, afhandeling en registratie](#)  
[PR Risicomanagement CBSL, PRI](#)

## # Bijlagen

## # Akkoord verslag

Opsteller

Datum : 12-2-2021

Naam :

Handtekening :

5.1.2e

5.1.2e

5.1.2e

# Einde document

5.1.2e

# Validatie rapport N/E-gen triplex SARS-CoV-2 rapport

Naam auteur: 5.1.2e

Datum: 02/06/2021

## # Doel

Het doel van dit onderzoek is de optimalisatie van de toegepaste Corman RT-PCR voor SARS-CoV-2 detectie, door de introductie van een extra specifiek SARS-CoV-2 target, het N-gen target.

## # Principe (inleiding)

Het gebruikte Sarbeco E-gen voor de SARS-CoV-2 PCR is niet SARS-CoV-2 specifiek (is ook in staat om SARS-CoV-1 te detecteren) en levert regelmatig moeilijk interpreteerbare resultaten op, die vervolgens bevestigd moeten worden op een ander platform. Om de snelheid en het gemak van interpretatie te verhogen, wordt er een N-gen/E-gen/PDV triplex RT-PCR ontwikkeld, waarbij het N-gen specifiek is voor SARS-CoV-2, en een beter onderscheidend vermogen heeft tussen positief en negatief.

## # Definities en afkortingen

AM	Arts-microbioloog
CBSL	Centraal Bacteriologisch en Serologisch Laboratorium
Ct	Cycle threshold
E-gen	Envelope gen
LOD	Limit of Detection
MMM	Medisch Moleculair Microbioloog
N-gen	Nucleocapsid gen
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDV	Phocid Distemper Virus
RNA	Ribonucleïnezuur
RT	Reverse-Transcriptase (enzyme)
UA	Uitvoerende analist
VA	Viserend analist

## # Doelgroep

Dit validatie rapport is van toepassing op de medewerkers van het CBSL. Elke medewerker die moleculaire werkzaamheden uitvoert dient dit rapport gelezen te hebben.

## # Veiligheid

Er wordt gewerkt met besmettelijk materiaal. Werk daarom volgens de algemene veiligheidsvoorschriften voor microbiologische laboratoria. De regels die hierop betrekking hebben liggen vast in: Veilig werken met micro-organismen, parasieten en cellen in laboratoria en andere werkruimten; theorie en praktijk, 3<sup>de</sup>, geheel herziene druk, 2009. Voor veiligheid specifiek voor de afdeling Moleculair, zie [WV-MOL-WVA Algemene werkwijze Moleculair](#)

## # Verantwoordelijkheden

De UA is verantwoordelijk voor het volgens protocol uitvoeren en de technische validatie van het onderzoek.  
De VA is verantwoordelijk voor de administratieve resultaatverwerking.  
De MMM is verantwoordelijk voor de juiste interpretatie van deze testen.  
De AM is verantwoordelijk voor het autoriseren van de onderzoeksresultaten.

## # Reagentia, media en hulpstoffen

- Nuclease Free water
- LightCycler® Multiplex RNA Virus mastermix
- RT-enzym
- Primers en probes voor Egen en Ngen
- PDV (IC)

## Primers en probes:

Tabel 1 Sarbeco E gen primers en probe sequentie informatie. Corman PCR (1)

Naam		Sequentie	Label
E_Sarbeco_F	SARS(like)-CoV E-gene forward	ACAGGTACGTTAATAGTTAATAGCGT	
E_Sarbeco_R	SARS(like)-CoV E-gene reverse	ATATTGCAGCAGTACGCACACA	
E_Sarbeco_P1	SARS(like)-CoV E-gene probe	ACACTAGCCATCCTTACTGCGCTTCG	FAM-BBQ

Tabel 2 N gen primers and probe sequentie informatie. (2) verkregen van CDC

Naam		Sequentie	Label
2019-nCoV_N1-F	2019-nCoV_N1 Forward Primer	GAC CCC AAA ATC AGC GAA AT	
2019-nCoV_N1-R	2019-nCoV_N1 Reverse Primer	TCT GGT TAC TGC CAG TTG AAT CTG	
2019-nCoV_N1-P	2019-nCoV_N1 Probe	ACC CCG CAT TAC GTT TGG TGG ACC	LC610-BHQ2

Tabel 3 PDV-gen primers en probe sequentie informatie

Naam		Sequentie	Label
PDV_FW	Phocine distemper virus forward	CGG GTG CCT TTT ACA AGA AC	
PDV_RV	Phocine distemper virus reverse	TTC TTT CCT CAA CCT CGT CC	
PDV_P	Phocine distemper virus probe	ATG CAA GGG CCA ATT CTT CCA AGT T	Cy5-BBQ

## Mastermix:

E_Sarbeco_P1 (FAM)	465-510
2019-nCoV_N1-P (LC610)	533-610
PDV_P (Cy5)	610-680

In tabel 4 staat de gebruikte mastermix voor Egen-PDV:

Tabel 4: SARS-CoV-2 mastermix voor 1 reactie Egen-PDV. Alle stockoplossingen bevatten een concentratie van 25pmol/µl

E-gen/PDV mix			
Mix voor:	1 reacties		1x reactie µl
LC multiplex 2: RT-qPCR Reaction Mix	Mastermix	4.00	µl
Nuclease-Free Water	Water	9.85	µl
Egen	E_Sarbeco_F	0,20	µl
Egen	E_Sarbeco_P1	0,20	µl
Egen	E_Sarbeco_R	0,20	µl
PDV	FW-primer IC - PDV	0,20	µl
PDV	REV-primer IC - PDV	0,20	µl
PDV	Probe IC - PDV	0,05	µl
	RT Enzyme	0,10	µl
	Totaal:	15,00	µl

In tabel 5 staat de gebruikte mastermix voor Egen-Ngen-PDV:

**Tabel 5: SARS-CoV-2 mastermix voor 1 reactie Egen-Ngen-PDV.** Alle stockoplossingen bevatten een concentratie van 25pmol/µl

E-gen/N-gen/PDV mix				
Mix voor:	1	reacties	1x reactie µl	
LC multiplex 2: RT-qPCR Reaction Mix		Mastermix	4,00	µl
Nuclease-Free Water		Water	9,18	µl
Egen		E_Sarbeco_F	0,20	µl
Egen		E_Sarbeco_P1	0,20	µl
Egen		E_Sarbeco_R	0,20	µl
PDV		FW-primer IC - PDV	0,20	µl
PDV		REV-primer IC - PDV	0,20	µl
PDV		Probe IC - PDV	0,05	µl
Ngen		2019-nCoV_N1-F	0,30	µl
Ngen		2019-nCoV_N1-R	0,30	µl
Ngen		2019-nCoV_N1-P	0,07	µl
		RT Enzyme	0,10	µl
		Totaal:	15,00	µl

In tabel 6 staat het gebruikte RT-PCR programma:

**Tabel 6: SARS-CoV-2 RT-PCR programma**

Program name	Cycles	Temperature (°C)	Time (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Analysis
Reverse Transcriptase	1	50 °C	00:05:00	4.4	None
Denaturation/inactivation	1	95 °C	00:00:20	4.4	None
Amplification	45	95 °C	00:00:10	4.4	Quantification
		58 °C	00:00:25	2.2	Quantification
Cooling	1	40 °C	00:00:10	2.2	None

## # Apparatuur en hulpmiddelen

- LC480
- 96 wells plaat voor LC480
- MagnaPure96 & PurePrep96 voor SARS-CoV-2 RNA extractie
- PiRo pipetteer robot voor pipetteren PCR mastermix
- CyBio Selma pipetteer robot voor pipetteren eluaat

## # Biologisch materiaal

Nasopharynx swabs in VTM/UTM geëxtraheerd tot RNA voor SARS-CoV-2 PCR

## # Uitvoering

**Validatie/verificatie proces: Plan van aanpak**

Volgende punten blijven onveranderd:

Het oudere RT-PCR programma blijft onveranderd. De enige parameter die aangepast kan worden is de temperatuur, om de annealing van de primers en probe te optimaliseren.

De validatie betreft een nieuwe onderzoeksprocedure, waarbij primers en probe voor detectie van een extra SARS-CoV-2 RT-PCR target wordt toegevoegd voor analyse.

Prestatiespecificaties:

**Tabel 7: Prestatiespecificaties: (validatie parameters)**

	Parameter	Validatie
		In-house onderzoeksprocedure
1	Literatuuronderzoek	X, primers en probes verkregen van CDC (N-gen)
2	Analytische sensitiviteit	X, a.d.h.v verdunningsreeks met een SARS-CoV-2 positief monster
2.1	Limit of detection/analytische sensitiviteit	X, gedaan a.d.h.v RIVM sensitiviteit/LEQA panel
2.2	Efficiëntie	X, a.d.h.v verdunningsreeks met een SARS-CoV-2 positief monster
2.3	Lineariteit (indien kwantitatief)	X, a.d.h.v verdunningsreeks met een SARS-CoV-2 positief monster
3	Analytische specificiteit	X
3.1	Specificiteit	X, RIVM LEQA panel + subtypes SARS-CoV-2
3.2	Selectiviteit	X, RIVM LEQA en sensitiviteitspanel
4	Variatie	X
4.1	Intra-assay variatie	X
4.2	Inter-assay variatie	X
4.3	Juistheid en precisie ((semi-)kwantitatieve bepalingen)	X
4.4	Meeteonzekerheid (kwantitatief gerapporteerde testen)	X
5	Robuustheid: testen van kritische punten (optioneel)	X
6	Laboratorium validatie	X

### Prestatiespecificaties en acceptatiecriteria

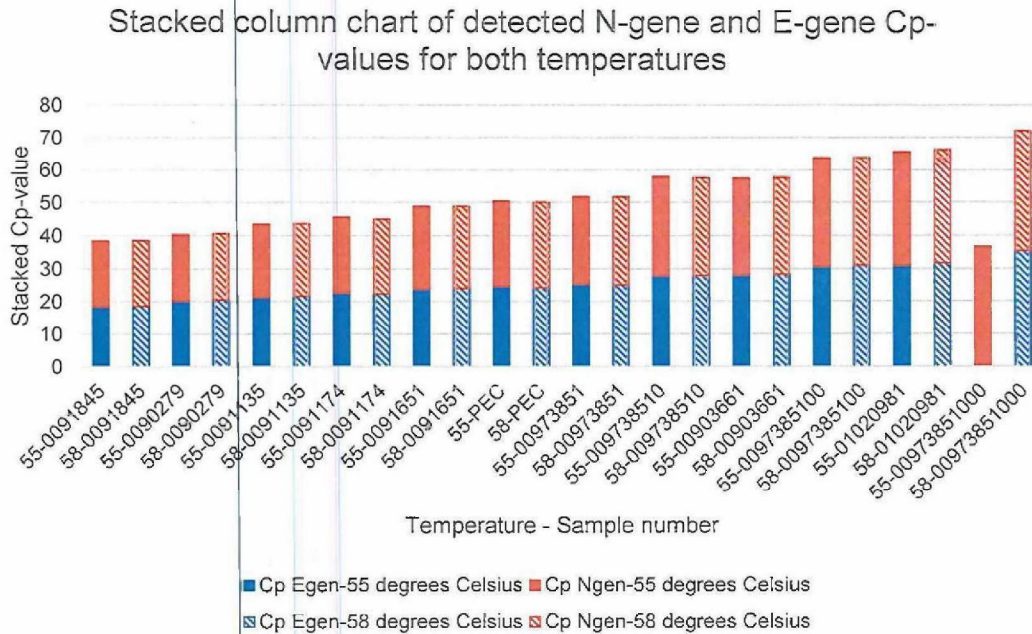
Validatie is uitgevoerd in een multiplex PCR.

Deze PCR zal geaccepteerd worden indien:

- De analytische sensitiviteit voldoet aan onze criteria als:
  - Efficiëntie van de amplificatie curve ( $R^2$ ) mag niet lager zijn dan 0,95.
  - Efficiëntie van de PCR varieert tussen 0,95 – 1,00 (95%-100%)
  - Lineariteit varieert tussen 3,0 en 3,6 CT waarden
- De analytische specificiteit wordt getest, de acceptatie criteria zijn:
  - De virussen moeten met de primers en probes gedetecteerd worden
  - Niet kruis-reageren met de andere humane respiratoire virussen uit RIVM specificiteits-panel.
- Laboratorium validatie
  - Verkregen resultaten (positief/negatief) moeten voor 95% overeenkomen met referentie test/laboratorium
  - Sensitiviteit: Minimaal een van beide targets scoort 100% sensitiviteit
  - Specificiteit: Beide targets uit de triplex scores 100% voor SARS-CoV-2 specificiteit
- Variatie van de PCR:
  - De standaard deviaties van juistheid en precisie, intra- en inter-assay variatie mogen niet hoger zijn dan 3.
  - De variatie coëfficiënt mag niet hoger zijn dan 10% voor precisie, intra- en inter-assay variatie.

**N-gen primer/probe temperatuur validatie:**

Op 58 graden Celsius vindt de elongatie van het E-gen in de duplex plaats, volgens de RT-PCR van Corman (2). De annealingtemperatuur van de primers voor het N-gen target ligt op de 55 graden Celsius (1). Er wordt getest welke temperatuur het beste is voor de triplex meting. Hiervoor worden twaalf SARS-CoV-2 positieve monsters geëxtraheerd, en de eluaten worden voor beide temperaturen getest. Figuur 1 bevat de gedetecteerde Ct-waardes. In Figuur 1 wordt eerst de geteste temperatuur (55 of 58 graden) weergegeven, gevolgd door het sample nummer. Van monster 917C0097385 is een 10, 100 en 1000-voudige verdunning gemaakt. N-gen primers 10pmol/reactie, probe 5pmol/reactie.



**Figuur 1** De 12 GGD monsters die getest zijn. De gedetecteerde Ct-waardes zijn bij elkaar opgeteld en in oplopende hoeveelheid geordend. 55-00973851000 wordt alleen gedetecteerd door het N-gen.

**Conclusie:**

- Het E-gen target werkt minder goed in de triplex bij een temperatuur van 55 graden Celsius, omdat deze bij een lage virale load geen resultaat geeft. Hierom wordt er verder getest met 58 graden Celsius.

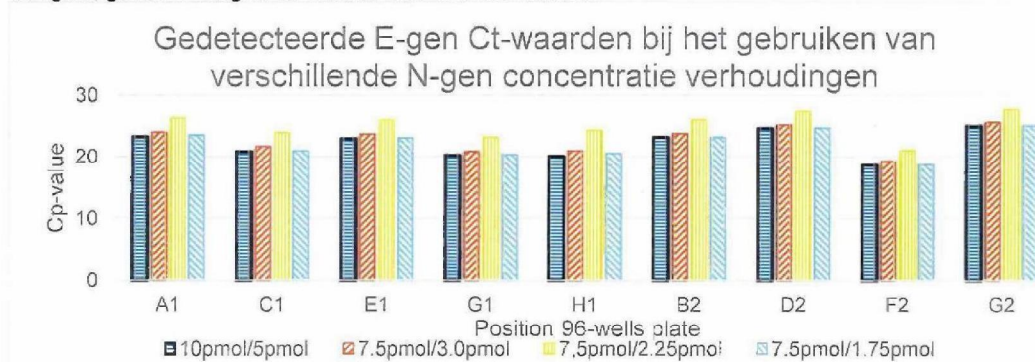
### N-gen primer/probe concentratie:

Locatie: LC480-I DB5 210325 Ngen concentratie bepaling

Er worden verschillende concentraties primers/probe getest, om te bepalen welke concentratie optimaal is. Er is getest wat de invloed is van de concentratieverhouding op het detecteren van het E-gen gevolgd door het gevolg op het detecteren van het N-gen. De geteste N-gen concentraties(primers/probe) zijn:

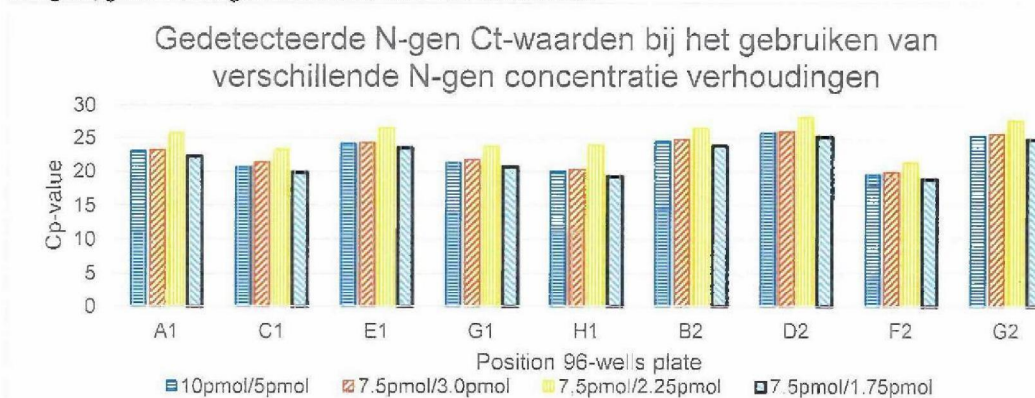
- 10pmol/5pmol
- 7,5pmol/3,0pmol
- 7,5pmol/2,25pmol
- 7,5pmol/1,75pmol
- De E-gen verhouding primers/probe blijft ongewijzigd (5pmol/5pmol)

Resultaten, Figuur 2, laten zien dat een hogere concentratie N-gen primers en probe zorgen voor het detecteren van lagere Ct-waarden van het E-gen, in alle geteste monsters. De met zwart omlijnde staven uit de figuur, geven de laagste Ct-waarde weer van dat monster.



**Figuur 2** Gedetecteerde E-gen Ct-waarden bij het gebruiken van verschillende N-gen concentratie verhouding, 10pmol/5pmol (primers/probe) detecteert de laagste Ct-waarden voor het E-gen.

Resultaten, Figuur 3, laten zien dat een lagere concentratie N-gen primers/probe verhouding zorgen voor het detecteren van lagere Ct-waarden van het N-gen, in alle geteste monsters. De met zwart omlijnde staven uit de figuur, geven de laagste Ct-waarde weer van dat monster.



**Figuur 3** Gedetecteerde N-gen Ct-waarden bij het gebruiken van verschillende N-gen concentratie verhouding, 7.5pmol/1.75pmol (primers/probe) detecteert de laagste Ct-waarden voor het N-gen.

Conclusie:

- Omdat de geteste monsters met een lagere concentratie verhouding N-gen (7,5pmol/1,75pmol) zorgen voor het detecteren van lagere N-gen target wordt deze concentratie verhouding verder toegepast.

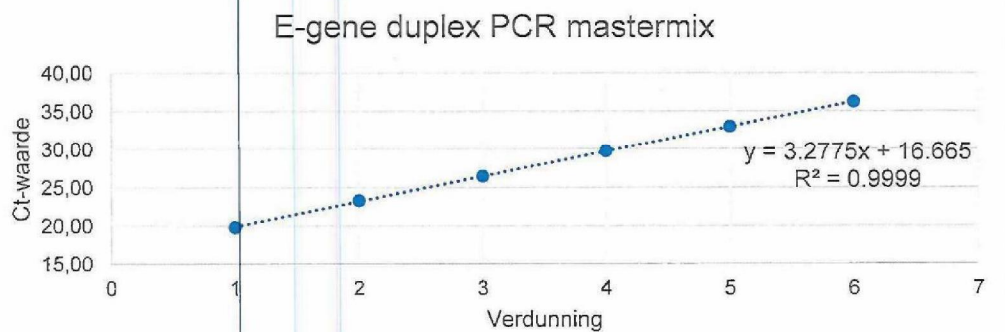
**Lineariteit en efficiëntie:**

Locatie: LightCycler480-I DB5 210331 Ngen lineariteit test

Wordt gedaan door middel van een lineariteit bepaling, waarbij een 10-voudige seriële verdunning is gebruikt en in 8-voud is getest. Voor beide RT-PCR mastermixen zijn dezelfde eluaten gebruikt, en in één PCR-reactie getest.

**Tabel 8** Ct waardes E-gen duplex RT-PCR gebruikt als controle conditie. Rood getal is uitbijter.

E-gene control	10 <sup>1</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>6</sup>
A	19.49	23.17	26.25	29.68	32.66	37.58
B	19.83	23.22	26.35	29.97	32.75	35.27
C	19.92	23.28	26.55	29.81	33.26	36.21
D	19.94	23.34	26.57	29.93	33.47	36.03
E	19.94	32.72	26.62	29.69	33.07	36.58
F	19.89	23.45	26.59	29.87	32.85	36.52
G	20.02	23.51	26.63	29.86	33.22	36.12
H	19.81	23.32	26.3	29.61	33.08	36.11
<b>Gemiddelde (n = 8)</b>	<b>19.86</b>	<b>23.33 (n=7)</b>	<b>26.48</b>	<b>29.80</b>	<b>33.05</b>	<b>36.30</b>
SD	0.16	0.12	0.16	0.13	0.28	0.65
VC	0.81%	0.52%	0.59%	0.43%	0.83%	1.80%



**Figuur 4** Efficiëntie en lineariteit van E-gene duplex (controle conditie). R<sup>2</sup>/efficiëntie = 99.99%, lineariteit = 3.28

**Tabel 9** Ct waardes E-gen triplex RT-PCR

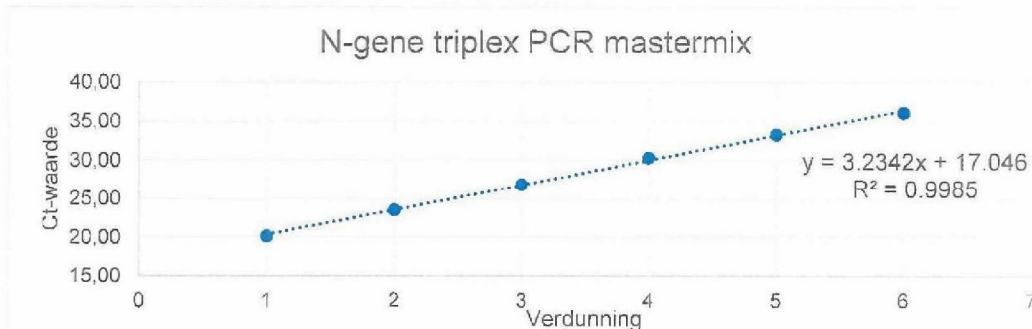
E-gene triplex	10 <sup>1</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>6</sup>
A	19.34	22.59	25.94	29.06	31.18	>45
B	19.48	22.67	25.89	29.53	30.85	>45
C	19.53	22.82	26.00	29.26	31.68	>45
D	19.32	22.86	26.04	29.06	30.95	>45
E	19.48	22.78	26.07	29.10	31.84	>45
F	19.32	22.88	26.07	29.06	31.47	>45
G	19.49	22.89	26.1	29.17	31.50	>45
H	19.36	22.79	25.93	29.35	31.51	>45
<b>Gemiddelde (n = 8)</b>	<b>19.42</b>	<b>22.79</b>	<b>26.01</b>	<b>29.20</b>	<b>31.37</b>	<b>&gt;45</b>
SD	0.09	0.11	0.08	0.17	0.35	
VC	0.45%	0.50%	0.30%	0.59%	1.11%	



**Figuur 5** Efficiëntie en lineariteit van E-gen triplex (test conditie).  $R^2$ /efficiëntie = 99,45%, lineariteit = 3,03

**Tabel 10** Ct-waardes N-gen triplex RT-PCR

N-gene triplex	10 <sup>1</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>6</sup>
A	19.87	23.42	26.81	30.15	33.29	36.44
B	20.62	23.43	26.62	31.13	32.78	>45
C	20.06	23.23	26.93	30.50	33.25	36.23
D	19.87	23.54	26.84	30.09	32.82	35.59
E	20.65	23.50	26.9	30.08	33.81	36.60
F	19.82	23.67	26.91	30.11	33.20	>45
G	19.97	23.66	26.93	30.18	33.37	35.81
H	19.78	23.55	26.82	30.29	34.03	>45
<b>Gemiddelde (n = 8)</b>	<b>20.08</b>	<b>23.50</b>	<b>26.85</b>	<b>30.32</b>	<b>33.32</b>	<b>36.13</b>
SD	0.35	0.15	0.10	0.36	0.43	0.42
VC	1.76%	0.66%	0.38%	1.18%	1.30%	1.17%



**Figuur 6** Efficiëntie en lineariteit van N-gen triplex (test conditie).  $R^2$ /efficiëntie = 99,85%, lineariteit = 3,23

	$R^2$	Efficiëntie	lineariteit
E-gen duplex	0,9999	99,99%	3,28
E-gen triplex	0,9945	99,45%	3,03
N-gen triplex	0,9985	99,85%	3,23

**Conclusie:**

De triplex laat zien dat het E-gen minder presteert ten opzichte van E-gen duplex, omdat de E-gen triplex niet in staat is om de hoogste verdunning te detecteren. De efficiëntie en lineariteit liggen wat lager voor de triplex en de hoogste verdunning wordt niet gedetecteerd. Alle gemeten waarden vallen wel binnen de gestelde acceptatie criteria.

**Limit of Detection:****RIVM sensitiviteit panel:****Locatie:** 210423 LC480-I DB5 SARS sens spe panel

Voor het bepalen van de Limit of Detection (LOD, detectielimietwaarde) is een RIVM sensitiviteit panel (nr. 3) getest. Door het testen van dit panel werd een indicatie gegeven van de Ct-waarde range, waarin getest moest worden voor het bepalen van de LOD van de verschillende targets. Het RIVM panel is met PurePrep96 geëxtraheerd, en vervolgens zijn alle bepalingen in één in een LightCycler480 plaat gedaan. Voor de probit analyse werd een aflopende concentratiereeks getest met verdunningsstappen van twee of kleiner vanaf 12800 kopieën/ml. (Resultaten in Bijlage tabel 19, 20, 21)

Conclusie:

- Sen4.2 heeft een fout ondergaan bij de MagNa Pure96. Er is veel afwijking bij het N-gen, en door het E-gen wordt deze SARS-CoV-2 verdunning niet gedetecteerd. Ook wijken de waarden veel af van de PurePrep96 en van de RIVM resultaten.
- E-gen triplex detecteert Sen1 met 100% op beide extractie platforms, en Sen5 met 75% waarbij de MagNa Pure96 (geel) zwakke lijnen vertoont.
- Omdat het E-gen triplex moeite krijgt bij het detecteren van SARS-CoV-2 monsters met een Ct waarde van >30 wordt dit de start waarde voor de PROBIT analyse

**Limit of Detection door PROBIT analyse:**

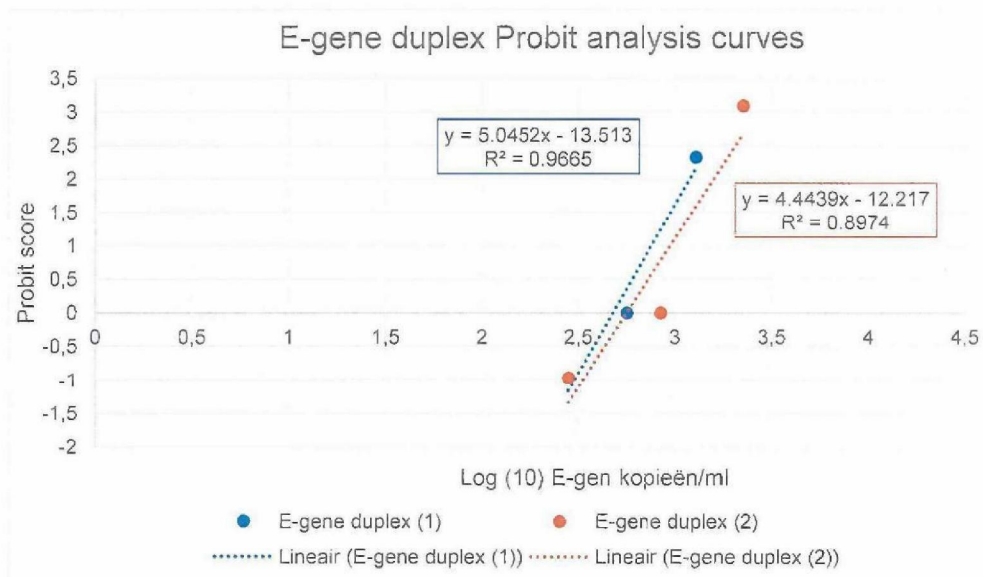
Locatie: LightCycler-I DB5 210503 Probit N-gen

Om de detectielimiet te bepalen van de triplex RT-PCR wordt een RIVM-gevoeligheidspanel gebruikt met een bekende virale load (kopieën/ml). De LoD is de laagste hoeveelheid analytische meting in een monster die met waarschijnlijkheid kan worden gedetecteerd. Hieruit kan een betrouwbaarheid van 95% berekend worden, en daarmee welke concentratie de LoD tenminste moet zijn om met 95% zekerheid te zeggen dat dit een positief resultaat geeft (door middel van PROBIT analyse).

Er is een verdunningsreeks gemaakt van Sen1 met  $1,28 \cdot 10^4$  E-gen kopieën/ml tot 17 E-gen kopieën/ml. Deze concentraties zijn allemaal in zesvoud ( $n=6$ ) geëxtraheerd, en getest met de N/E-gen triplex en E-gen duplex PCR. Bijlage 1 laat de gemeten Ct-waardes zien met de bijbehorende concentratie E-gen kopieën/ml. Voor het bereken van de PROBIT score wordt de Excel formule (=NORM.S.INV(propotion)) gebruikt waarbij een score van 100% (6/6 detecties) een proportie heeft van 1. Een proportie van 1 kan niet gebruikt worden in de formule en is daarom gecompenseerd voor 0,999.

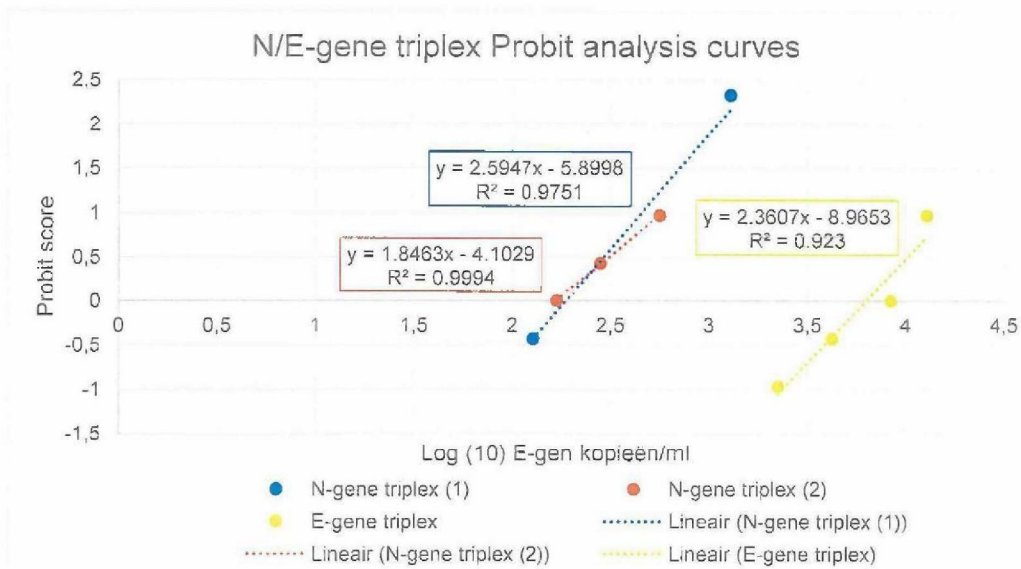
Door de  $\log_{10}$  concentratie van de verdunningsreeks uit te zetten tegen de PROBIT score, kan de lineariteit van de grafiek bepaald worden. Het meest lineaire gebied is gekozen voor de verdere bepaling, waarbij de E-gen duplex en N-gen triplex twee lineaire lijnen hebben. De formule ( $y=ax+b$ ) wordt vervolgens gebruikt om de concentratie van de viral load te bepalen. Daarvoor moet de formule worden omgeschreven tot  $x = (z-b)/a$  waarbij Z-waarde = 1,96 voor 95% betrouwbaarheidsinterval.

Bijvoorbeeld Figuur 7 waarbij E-gen duplex (1)  $y = 5,0452x - 13,513$  wordt omgeschreven tot  $x = (1,96+13,513)/5,0452$ .  $x \approx 3,07$ , is de  $\log_{10}$  concentratie.  $10^{3,07} = 1,166$  E-gen kopieën/ml. E-gen duplex (2) =  $(10^{3,19}) = 1,550$  E-gen kopieën/ml.



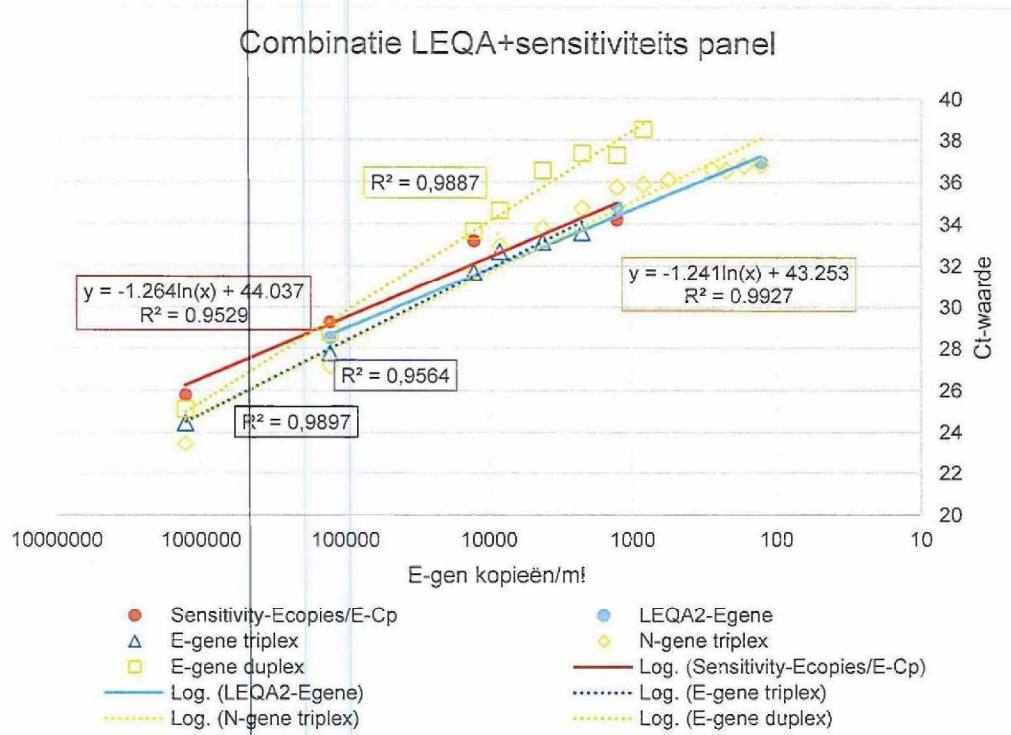
**Figuur 7** E-gene duplex PROBIT analyse curves met bijbehorende formules

Figuur 8 geeft een concentratie voor  
 E-gene triplex van  $(10^{4,63}) = 42461$  E-gene kopieën/ml  
 N-gene triplex (1) =  $(10^{3,03}) = 1069$  E-gene kopieën/ml  
 N-gene triplex (2) =  $(10^{3,28}) = 1922$  E-gene kopieën/ml



**Figuur 8** N/E-gene triplex PROBIT analyse curves met bijbehorende formules

Aan de hand van de RIVM panels (sensitiviteit en LEQA) kan een indicatie gegeven worden welke Ct-waarde bij de virale load hoort. Omdat beide panels dezelfde concentraties hebben gebruikt, en de Ct-waardes bekend zijn, konden er twee ijklijnen gemaakt worden. In de ijklijnen zijn vervolgens de gemeten (lineaire) punten van de LoD gezet, om te kijken of de punten op een lijn lagen (Figuur 9)



**Figuur 9** Combinatie LEQA+Sensitiviteits panel RIVM, voor ijklijn bepaling.

De formules van de panels zijn gebruikt om een indicatie te geven welke Ct-waarde per mastermix met 95% betrouwbaarheid gemeten kan worden.

E-gen duplex (1166-1550 E-gen kopieën/ml) = 34,14 – 35,11

E-gen triplex (42461 E-gen kopieën/ml) = 30,03 – 30,57

N-gen triplex (1069-1922 E-gen kopieën/ml) = 33,87 – 35,22

**Conclusie:**

- Het gebruiken van de vernieuwde triplex laat zien dat de gevoeligheid van het E-gen in de triplex afneemt t.o.v. de duplex.
- Dit verschil wordt echter gecompenseerd door de gevoeligheid van het N-gen in de triplex, die minstens zo gevoelig is als het E-gen.
- Er zijn twee targets aanwezig in de vernieuwde triplex, i.p.v. één target, dit gaat niet ten koste van de totale sensitiviteit.

**Analytische specificiteit:**

Locatie: LightCycler480-2 DB3 210208 Ngen SEN-SPE

Wordt gedaan door middel van het testen van een RIVM specificiteitspanel. Dit panel bevat een seriële verdunning van SARS-CoV-2 en een aantal humane respiratoire (corona) virussen. Ook zijn er bekende SARS-CoV-2 varianten getest die door het RIVM getypeerd zijn inclusief Ct-waardes. Deze varianten bevatten voornamelijk mutaties in het S-gen, er wordt daarom verwacht dat deze mutaties geen invloed zullen hebben in de triplex PCR. Tabel 12 en Figuur 10 bevatten de gemeten resultaten van de RIVM specificiteitspanels.

**Tabel 12** Overzicht met geteste LEQA-virussen (1-5) en geteste SARS-CoV-2 varianten (6-9)

Humaan respiratoir virus	RIVM Ct-waardes	Ct-waardes E-gene triplex	Ct-waardes N-gene triplex
hCoV-NL63	28,1	>45	>45
hCoV-229E	17,22	>45	>45
hCoV-OC43	27,77	>45	>45
Influenza A	22,76	>45	>45
SARS-CoV-1	28,57	28,74	>45
Braziliaanse P1 variant	26,85	27	29
Zuid-Afrikaanse variant 0072282	26,7	26,12	26,66
E484K UK variant	16,9	18,97	18,43
Britse variant	21,32	22,64	23,1

**Conclusie:**

- De triplex geeft geen kruisreactie met andere bekende humane corona virussen
- Het E-gen kan wel SARS-CoV-1 detecteren, maar het N-gen detecteert geen SARS-CoV-1
- De verschillende varianten van het RIVM worden ook nog gedetecteerd, er bevinden zich dus geen mutaties in deze sequentie gedeeltes die een nadelig effect hebben op de PCR.
- In onderstaand variatie experiment is ook nog een SARS-CoV-2 variant meegenomen met een N-gen mutatie in de forward primer en probe sequentie. Beide op de 4<sup>de</sup> positie waarbij een C – T mutatie heeft plaatsgevonden. Uit de resultaten van dat experiment is aangetoond dat de N-gen primers en probe geen moeite ondervinden tijdens de amplificatie van deze mutatie.

**Laboratorium validatie:**

Wordt gedaan door middel van verschillende parallel runs uit te voeren die zijn geëxtraheerd met de PurePrep96 of de MagNa Pure 96, en resultaten worden vergeleken met de E-gen PCR. De extractie wordt een keer uitgevoerd, en de eluaten worden parallel in de PCRs getest. Verwacht wordt, aan de hand van de analytische sensitiviteitsbepaling, dat het E-gen van de triplex de Ct-waardes >31,5 mogelijk niet detecteert, en daarom een lagere sensitiviteit zal scoren dan het N-gen. Tabel 13 bevat de resultaten van de twee parallelruns.

**Sample 1-85**

- E-gen duplex = run 3 210512 LC480 II DB3
- N/E-gen triplex = run 3 210512 LC480 I DB5

**Sample 86-166**

- E-gen duplex = run 3 210512 LC480 II DB3
- N/E-gen triplex = run 3 210512 LC480 I DB5

**Berekeningen:**

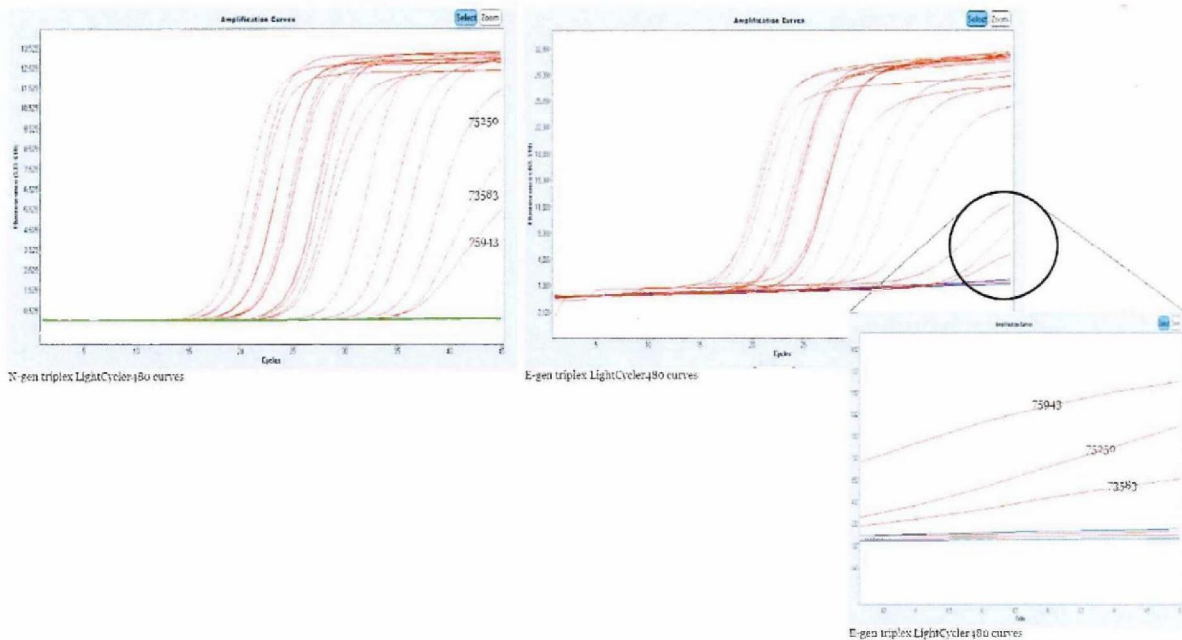
- **Sensitiviteit:**  $(A/A+C)*100\%$
- **Specificiteit:**  $(B/B+D)*100\%$
- **Positief voorspellende waarde:**  $(A/A+B)*100\%$
- **Negatief voorspellende waarde:**  $(B+D/C+D)*100\%$
- **Prevalentie:**  $(A+C/A+B+C+D)*100\%$

Tabel 13 Parallel run SARS-CoV-2 gemeten Ct-waardes.

nummer	Name	E-gen triplex Ct	N-gen triplex Ct	E-gen duplex Ct	
1	917C0161212	>45	>45	>45	
2	917C0175029	>45	>45	>45	
3	917C0171620	>45	>45	>45	
4	917C0176810	>45	>45	>45	
5	917C0172611	>45	>45	>45	
6	917C0165729	17,77	18,67	17,78	
7	917C0176808	>45	>45	29,17	Fout positief E-gen duplex, platte lijn in LC480 = negatief
8	917C0176835	>45	>45	>45	
9	917C0175440	>45	>45	>45	
10	917C0165734	>45	>45	>45	
11	917C0169243	21,53	21,91	21,54	
12	917C0172585	>45	>45	>45	
13	917C0165876	>45	>45	>45	
14	917C0170623	>45	>45	>45	
15	917C0165819	>45	>45	>45	
16	917C0165547	>45	>45	>45	
17	917C0155115	21,12	21,95	21,31	
18	917C0165878	>45	>45	>45	
19	917C0166116	>45	>45	>45	
20	917C0169367	29,71	31,44	29,53	
21	917C0175098	>45	>45	>45	
22	917C0166114	>45	>45	>45	
23	917C0175390	>45	>45	9,55	Fout positief E-gen duplex, platte lijn in LC480 = negatief
24	917C0174888	>45	>45	>45	
25	917C0160479	>45	>45	>45	
26	917C0171622	>45	>45	>45	
27	917C0166137	>45	>45	>45	
28	917C0170694	>45	>45	>45	
29	917C0165896	>45	>45	>45	
30	917C0169302	>45	>45	>45	
31	917C0175185	>45	>45	>45	
32	917C0173643	23,93	24,22	24,16	
33	917C0170594	>45	>45	>45	
34	917C0175197	>45	>45	>45	
35	917C0170593	>45	>45	>45	
36	917C0171361	>45	>45	>45	
37	917C0170612	>45	>45	>45	
38	917C0171375	24,32	24,7	24,23	
39	917C0161741	>45	>45	>45	
40	917C0171772	>45	>45	>45	
41	917C0171307	>45	>45	>45	
42	917C0165546	>45	>45	>45	
43	917C0166052	24,07	25,48	24,24	
44	917C0170536	>45	>45	>45	
45	917C0159270	>45	>45	>45	
46	917C0175034	>45	>45	>45	
47	917C0175405	>45	>45	>45	
48	917C0172675	>45	>45	>45	
49	917C0176718	>45	>45	>45	
50	917C0176693	>45	>45	32,67	Detection call uncertain (platte lijn LC480) = negatief
51	917C0172494	>45	>45	>45	
52	917C0165575	23,68	24,17	23,86	
53	917C0165877	32,92	33,16	32,76	
54	917C0175188	>45	>45	>45	
55	917C0175355	>45	>45	>45	
56	917C0165925	>45	>45	>45	

57	917C0176792	>45	>45	>45	
58	917C0158805	>45	>45	26,86	Detection call uncertain = negatief
59	917C0171458	>45	>45	>45	
60	917C0166074	>45	>45	>45	
61	917C0172628	17,45	18,59	17,33	
62	917C0175057	>45	>45	>45	
63	917C0172714	>45	>45	>45	
64	917C0154986	>45	>45	>45	
65	917C0165884	21,11	21,7	21,41	
66	917C0171838	28,11	28,9	28,17	
67	917C0175092	>45	>45	>45	
68	917C0173583	>45	36,85	39,51	Discrepantie E-gen triplex
69	917C0176728	>45	>45	>45	
70	917C0173639	>45	>45	>45	
71	917C0169293	19,69	20,27	19,74	
72	917C0172625	>45	>45	>45	
73	917C0165632	17,5	17,56	17,78	
74	917C0170500	>45	>45	>45	
75	917C0175466	>45	>45	>45	
76	917C0175463	20,58	20,32	20,87	
77	917C0174997	>45	>45	>45	
78	917C0175011	>45	>45	>45	
79	917C0175394	>45	37	36,83	Discrepantie E-gen triplex
80	917C0175378	>45	>45	>45	
81	917C0172713	>45	>45	>45	
82	917C0175250	>45	35,55	40	Late Ct Call (last five cycles) has higher uncertainty (E-gen duplex) Discrepantie E-gen triplex
83	917C0176772	>45	>45	>45	
84	SARS-PEC(1)	25,02	25,19	25,02	
85	SARS-NEC(1)	>45	>45	>45	
86	917C0127252	>45	>45	>45	
87	917C0157714	>45	>45	>45	
88	917C0162866	>45	>45	>45	
89	917C0162899	>45	>45	>45	
90	917C0164502	>45	>45	>45	
91	917C0165357	26,11	25,52	26,65	
92	917C0165364	>45	>45	>45	
93	917C0165373	>45	>45	>45	
94	917C0165374	>45	>45	>45	
95	917C0165380	>45	>45	>45	
96	917C0165384	>45	>45	>45	
97	917C0165418	>45	>45	>45	
98	917C0165467	>45	>45	>45	
99	917C0165488	>45	>45	>45	
100	917C0165601	>45	>45	>45	
101	917C0165603	>45	>45	>45	
102	917C0165606	>45	>45	>45	
103	917C0165621	>45	>45	>45	
104	917C0165675	>45	>45	>45	
105	917C0165814	>45	>45	>45	
106	917C0165868	>45	>45	>45	
107	917C0165888	>45	>45	>45	
108	917C0170514	>45	>45	>45	
109	917C0170960	>45	>45	>45	
110	917C0171007	>45	>45	>45	
111	917C0171547	>45	>45	>45	
112	917C0171633	32,08	30,96	30,63	
113	917C0171771	>45	>45	>45	
114	917C0171779	>45	>45	>45	
115	917C0173461	>45	>45	>45	

116	917C0173530	34,01	33,2	32,77	
117	917C0173629	>45	>45	>45	
118	917C0173890	>45	>45	>45	
119	917C0173969	>45	>45	>45	
120	917C0173970	>45	>45	>45	
121	917C0173971	>45	>45	>45	
122	917C0173973	>45	>45	>45	
123	917C0173974	>45	>45	>45	
124	917C0173978	>45	>45	>45	
125	917C0173982	>45	>45	>45	
126	917C0173986	>45	>45	>45	
127	917C0174010	>45	>45	>45	
128	917C0174014	>45	>45	>45	
129	917C0174023	>45	>45	>45	
130	917C0174029	>45	>45	>45	
131	917C0174061	>45	>45	>45	
132	917C0174087	>45	>45	>45	
133	917C0174089	>45	>45	>45	
134	917C0174090	>45	>45	>45	
135	917C0174100	29,79	29,23	29,92	
136	917C0174106	19,49	18,59	17,92	
137	917C0174124	>45	>45	>45	
138	917C0174133	>45	>45	>45	
139	917C0174134	>45	>45	>45	
140	917C0174176	>45	>45	>45	
141	917C0174202	>45	>45	>45	
142	917C0174204	>45	>45	>45	
143	917C0174263	>45	>45	>45	
144	917C0174271	22,18	21,5	20,7	
145	917C0174281	>45	>45	>45	
146	917C0174286	>45	>45	>45	
147	917C0174289	>45	>45	>45	
148	917C0174347	>45	>45	>45	
149	917C0174391	>45	>45	>45	
150	917C0174850	>45	>45	>45	
151	917C0174863	>45	>45	>45	
152	917C0174928	>45	>45	>45	
153	917C0174952	>45	>45	>45	
154	917C0174967	>45	>45	>45	
155	917C0175012	>45	>45	>45	
156	917C0175032	>45	>45	>45	
157	917C0175078	>45	>45	>45	
158	917C0175100	>45	>45	>45	
159	917C0175104	>45	>45	>45	
160	917C0175106	>45	>45	>45	
161	917C0175150	>45	>45	>45	
162	917C0175242	30,66	29,6	30,21	
163	917C0175256	>45	>45	>45	
164	917C0175265	>45	>45	>45	
165	SARS-NEC(2)	>45	>45	>45	
166	SARS-PEC(2)	25,54	25,98	25,22	



**Figuur 4** Screenshot van parallelrun 1, sample 1 tot en met 85. Waarbij de 4 discrepanties van de E-gen duplex zichtbaar zijn. En er een verschil is tussen de lastig te interpreteren curves van de E-gen duplex t.o.v. van de N-gen triplex.

Tabel 14 en 15 bevatten de berekende sensitiviteit, specificiteit, PPV en NPV.

**Tabel 14** Berekende sensitiviteit en specificiteit van N-gen target in triplex vergeleken met E-gen duplex.

		E-gen duplex		
		Positief	Negatief	
N-gen triplex	Positief	27 (A)	0 (B)	<b>Sensitiviteit:</b> 100% $(27/27+0)*100\%$
	Negatief	0 (C)	139 (D)	<b>Specificiteit:</b> 100% $(139/139+0)*100\%$
				<b>Positief voorspellende waarde:</b> 100% $(27/27+0)*100\%$
				<b>Negatief voorspellende waarde:</b> 100% $(0+139/0+139)*100\%$
				<b>Prevalentie:</b> 16,3% $(27/166)*100\%$

**Tabel 15** Berekende sensitiviteit en specificiteit van E-gen target in triplex vergeleken met E-gen duplex.

		E-gen duplex		
		Positief	Negatief	
E-gen triplex	Positief	24 (A)	0 (B)	<b>Sensitiviteit:</b> 88,89% $(24/24+3)*100\%$
	Negatief	3 (C)	139 (D)	<b>Specificiteit:</b> 100% $(139/0+139)*100\%$
				<b>Positief voorspellende waarde:</b> 100% $(24/24+0)/100\%$
				<b>Negatief voorspellende waarde:</b> 97,9% $(0+139/3+139)*100\%$
				<b>Prevalentie:</b> 16,3% $(27/166)*100\%$

**Conclusie:**

- E-gen duplex, controle conditie bevatte 4 fout positieve resultaten, waarvan twee een rode lijn waren, en twee een blauwe lijn (Detector Call uncertain). Deze vier lijnen waren allemaal platte lijnen, en daarom tijdens het berekenen van de sensitiviteit en specificiteit behandeld als negatieve resultaten.
- Discrepanties van het E-gen target in de triplex is te verklaren doordat de sensitiviteit van het E-gen lager is dan het N-gen in de triplex en het E-gen in de duplex. Er zijn drie monsters gemist (917C0173583, 917C0175250, 917C0175394) met een gemiddelde E-gen Ct-waarde van 38,78.
- N-gen triplex komt met 100% overeen met het E-gen duplex, als de E-gen duplex fout positieve monsters worden gecorrigeerd naar negatief, na het beoordelen van de curves.

**Variatie:**

De nieuwe PCR mastermix wordt op alle LightCycler480 apparaten getest om te testen of er variatie tussen de PCR apparaten zit, bij het gebruiken van de mastermix. Hiervoor zijn 10 positieve, 10 negatieve, 3 controles meegenomen. Voor iedere run is telkens hetzelfde eluaat gebruikt, om verschil in extractie uit te sluiten. Tabel 16 bevat de E-gen resultaten, Tabel 17 bevat de N-gen resultaten.

LightCycler480-1 DB5 = 210601 Sars run 4 pp

LightCycler480-2 DB3 = 210601 intra assay (1)

LightCycler480-3 DB2 = 210601 intra assay 2

**Tabel 16 Resultaten intra-assay variatie E-gen target in triplex PCR**

Pos	Name	LC480-1 (E-gen)	LC480-2 (E-gen)	LC480-3 (E-gen)	$\Delta$ LC480-1 /LC480-2	$\Delta$ LC480-1/ LC480-3	$\Delta$ LC480-2/ LC480-3
F7	Lysis	>45	>45	>45			
H7	nec	>45	>45	>45			
A5	917C0180352	>45	>45	>45			
B5	917C0167428	>45	>45	>45			
C5	917C0170812	>45	>45	>45			
D5	917C0175978	>45	>45	>45			
E5	917C0176431	>45	>45	>45			
F5	917C0170809	>45	>45	>45			
G5	917C0173092	>45	>45	>45			
H5	917C0176675	>45	>45	>45			
A6	917C0176418	>45	>45	>45			
B6	917C0179360	>45	>45	>45			
C7	21220120001	>45	>45	>45	0	0	0
E7	Variant 7 RIVM- 10706/2021P2	30,19	31,04	31,10	0,13	0,19	0,06
G7	pec	24,9	24,95	25,46	0,05	0,56	0,51
C6	917C0176287	22,04	21,95	21,93	0,09	0,11	0,02
D6	917C0178224	24,62	24,68	24,71	0,06	0,09	0,03
E6	917C0172199	20,86	20,57	20,78	0,29	0,08	0,21
F6	917C0180048	19,03	19,05	18,96	0,02	0,07	0,09
G6	917C0169746	27,15	27,2	27,2	0,05	0,05	0
H6	917C0170264	26,47	26,45	26,48	0,02	0,01	0,03
A7	917C0172261	29,03	29,15	29,21	0,12	0,18	0,06
B7	917C0172907	23,8	23,81	23,93	0,01	0,13	0,12
D7	917C0173932	24,97	24,98	25,1	0,01	0,13	0,12
				Gemiddelde verschil	0,07	0,14	0,12

C7, 21220120001 was een zwak positief monster uit de Cobas Liat, later getest op LC480 met Ct-waarde 37,17. Op basis van de resultaten van de PROBIT analyse is het te verklaren waarom deze niet (altijd) wordt gedetecteerd.

Tabel 17 Resultaten intra-assay variatie N-gen target

Pos	Name	LC480-1	LC480-2	LC480-3	$\Delta$ LC480-1/ LC480-2	$\Delta$ LC480-1/ LC480-3	$\Delta$ LC480- 2/LC480-3
F7	Lysis	>45	>45	>45			
H7	nec	>45	>45	>45			
A5	917C0180352	>45	>45	>45			
B5	917C0167428	>45	>45	>45			
C5	917C0170812	>45	>45	>45			
D5	917C0175978	>45	>45	>45			
E5	917C0176431	>45	>45	>45			
F5	917C0170809	>45	>45	>45			
G5	917C0173092	>45	>45	>45			
H5	917C0176675	>45	>45	>45			
A6	917C0176418	>45	>45	>45			
B6	917C0179360	>45	>45	>45			
G7	pec	23,69	23,72	24,08	0,03	0,39	0,36
E7	Variant 7 RIVM- 10706/2021P2	31,30	31,65	31,60	0,35	0,30	0,05
C6	917C0176287	22,45	22,06	22,17	0,39	0,28	0,11
D6	917C0178224	24,24	24,2	24,23	0,04	0,01	0,03
E6	917C0172199	20,77	20,7	20,81	0,07	0,04	0,11
F6	917C0180048	18,63	18,62	18,63	0,01	0	0,01
G6	917C0169746	27,34	27,45	27,28	0,11	0,06	0,17
H6	917C0170264	27,2	27,32	27,31	0,12	0,11	0,01
A7	917C0172261	28,8	28,91	29,23	0,11	0,43	0,32
B7	917C0172907	23,69	23,73	23,96	0,04	0,27	0,23
C7	21220120001	35,32	35,76	35,23	0,44	0,09	0,53
D7	917C0173932	24,92	24,87	25,01	0,05	0,09	0,14
			Gemiddelde verschil		0,13	0,16	0,18

## Conclusie:

- 21220120001 is een zwak positief monster, en wordt daarom niet gedetecteerd door het E-gen. N-gen is wel in staat om deze te detecteren, maar het verschil tussen LC480-2 en LC480-3 is  $>0,50$  Ct.
- De PEC bij het E-gen geeft ook een verschil  $>0,5$  Ct-waarde tussen LightCycler480-3 en LightCycler480-1 en 2
- De gemiddelde (absolute) verschillen tussen de LightCyclers liggen allemaal binnen  $<0,5$  Ct-waarde.

## # Interpretatie, berekening, uitslag

- Criteria voor positieve of negatieve uitslagen

Positief: Voor de PCR geldt dat een patiënten monster positief is als een amplificatie plaatsvindt. Er vindt een exponentiële stijging van de fluorescentie plaats in het desbetreffende kanaal met een Ct < 40.

Negatief: Wordt het monster niet geamplificeerd (rechte lijn) of komt het op na Ct > 45 dan is het monster negatief. Eerst wordt de IC controle gecontroleerd.

- Remming

De remming van de PCR's wordt gecontroleerd mbv PDV.

Als een monster geremd is, zal de extractie over gedaan worden, tenzij een target positief is.

Interpretatie van de drie targets is in onderstaande tabel weergegeven:

Tabel 18: Interpretatie van SARS-CoV-2 LightCycler480 uitslagen:

N-gen	E-gen	Interpretatie
Positief Cq≤32	Positief Cq≤40	SARS-CoV-2 positief
Positief Cq>32	Positief Cq≤40	SARS-CoV-2 zwak positief
Positief Cq≤40	Negatief	SARS-CoV-2 zwak positief
Negatief	Positief Cq≤40	Laat controleren door MMM/TL/VS, mogelijk SARS-CoV-1 positief.
Negatief + PDV positief	Negatief + PDV positief	SARS-CoV-2 negatief
Negatief + PDV negatief	Negatief + PDV negatief	SARS-CoV-2 geremd, herhalen

- Turnaround-time en hands-on time

De hands-on-time blijft gelijk, er wordt alleen een extra target toegevoegd in Ruimte 1.

De turnaround-time is verkort omdat de interpretatie versneld wordt, en er minder twijfelachtige resultaten zijn waardoor het aantal herhalingen wordt verminderd.

- Algemene conclusie

Het gebruiken van een extra target voor SARS-CoV-2 diagnostiek zorgt voor een nauwkeuriger resultaat. Twijfelachtige gevallen worden weg gefilterd omdat het N-gen target een meer zwart-wit beeld creëert tussen positieve en negatieve resultaten.

- Aanbevelingen

Aanbevolen wordt om zo snel mogelijk gebruikt te maken van de vernieuwde SARS-CoV-2 mastermix.

## # Kwaliteitsbeheersing

Nr.	Actie	Gedaan
1	Testcodes definiëren (bij methode)	Ja
2	Werklijst definiëren (bij methode)	Ja
3	Kwaliteitscontrole definiëren (bij methode)	Ja
4	Evt. on-line koppelingresultaten verifiëren (bij methode)	Ja
5	Voorraadbeheer regelen	Ja
6	Bedieningsvoorschrift/werkvoorschrift z.s.m. geldig verklaren	Volgt
7	Medewerkers inwerken	Nvt
8	PRI uitvoeren en PRI bespreken met medewerkers	Nvt
9	PDCA invullen (alle stappen tot aan het eind) en daarin evaluatie datum inplannen	Nvt
10	Aanvragers informeren (nieuwsbrief, mail, website)	Nvt

## # Samenhangende procedures en formulieren

## # Bijlagen

Tabel 19 Probit resultaten E-gen duplex

Copies/ml	LOG10 (copies/ml)	Mean value	Cp-	Hit rate	Percentage	Proportion	Probit value
1280000	5.66	25.13		6/6	100%	1.00*	3.09
128000	4.66	28.78		6/6	100%	1.00*	3.09
12800	3.66	33.67		6/6	100%	1.00*	3.09
8421	3.48	34.66		6/6	100%	1.00*	3.09
4210,53	3.18	36.55		6/6	100%	1.00*	3.09
2245,61	2.90	37.39		6/6	100%	1.00*	3.09
1280	2.66	37.29		6/6	100%	1.00*	3.09
842,1	2.48	38.53		6/3	50%	0.50	0.00
561,4	2.30	40.00		6/3	50%	0.50	0.00
280,7	2.00	37.27		6/1	17%	0.17	-0.97
224,56	1.90	39.07		6/3	50%	0.50	0.00
168,42	1.78	>45		6/0	0%	-	-
128	1.66	>45		6/0	0%	-	-
84,21	1.48	38.82		6/1	17%	0.17	-0.97
56,14	1.30	39.68		6/2	33%	0.33	-0.43
28,07	1.00	39.63		6/2	33%	0.33	-0.43
22,45	0.90	38.77		6/1	17%	0.17	-0.97
16,84	0.78	>45		6/0	0%	-	-

Tabel 20 Probit resultaten E-gen triplex

Copies/ml	LOG10 (copies/ml)	Mean value	Cp-	Hitrate	Percentage	Proportion	Probit value
1280000	5.66	24.47		6/6	100%	1.00*	3.09
128000	4.66	27.79		6/6	100%	1.00*	3.09
12800	3.66	31.70		6/5	83%	0.83	0.97
8421	3.48	32.69		6/3	50%	0.50	0.00
4210,53	3.18	33.15		6/2	33%	0,333333	-0.43
2245,61	2.90	33.60		6/1	17%	0,166667	-0.97
1280	2.66	>45		6/0	0%	-	-
842,1	2.48	>45		6/0	0%	-	-
561,4	2.30	>45		6/0	0%	-	-
280,7	2.00	>45		6/0	0%	-	-
224,56	1.90	>45		6/0	0%	-	-
168,42	1.78	>45		6/0	0%	-	-
128	1.66	>45		6/0	0%	-	-
84,21	1.48	>45		6/0	0%	-	-
56,14	1.30	>45		6/0	0%	-	-
28,07	1.00	>45		6/0	0%	-	-
22,45	0.90	>45		6/0	0%	-	-
16,84	0.78	>45		6/0	0%	-	-

Tabel 21 Probit resultaten N-gen triplex

Copies/ml	LOG10 (copies/ml)	Mean value	Cp-	Hitrate	Percentage	Proportion	Probit value
1280000	5.66	23.47		6/6	100%	1.00*	3.09
128000	4.66	27.21		6/6	100%	1.00*	3.09
12800	3.66	31.75		6/6	100%	1.00*	3.09
8421	3.48	32.97		6/6	100%	1.00*	3.09
4210,53	3.18	33.81		6/6	100%	1.00*	3.09
2245,61	2.90	34.78		6/6	100%	1.00*	3.09
1280	2.66	35.76		6/6	100%	1.00*	3.09
842,1	2.48	35.90		6/3	83%	0.83	0.97
561,4	2.30	36.12		6/3	83%	0.83	0.97
280,7	2.00	36.63		6/4	67%	0.67	0.43
224,56	1.90	36.58		6/2	33%	0.33	-0.43
168,42	1.78	36.81		6/3	50%	0.50	0.00
128	1.66	36.84		6/2	33%	0.33	-0.43
84,21	1.48	>45		6/0	0%	-	-
56,14	1.30	>45		6/0	0%	-	-
28,07	1.00	>45		6/0	0%	-	-
22,45	0.90	>45		6/0	0%	-	-
16,84	0.78	>45		6/0	0%	-	-

## # Literatuur

- (1) Corman VM, Landt O, Kaiser M, Molenkamp R, Meijer A, Chu DKW, et al. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. Eurosurveillance. 2020;25(3).
- (2) <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/rt-pcr-panel-primer-probes.html>
- (3)

## # Akkoord verslag

	Opsteller(s)	
Datum :	25-06-2021	5.1.2e
Naam :		30/6/21
Handtekening :	5.1.2e	5.1.2e

## # Einde document

# Validatie rapport SARS-CoV-2 PCR op de NeuMoDx

Naam auteur : 5.1.2e  
 Datum : 15-05-2020

## # Doel

Het doel van dit onderzoek is de validatie van de SARS-CoV-2- PCR op de NeuMoDx.

## # Principe

Sinds maart 2020 is een SARS-CoV-2 pandemie gaande. Het RIVM en Erasmus MC hebben de protocollen opgesteld voor de detectie van dit virus met behulp van PCR. De protocollen, de primers en probes sequenties en de panels zijn beschikbaar gesteld om een validatie snel uit te voeren. De verkregen resultaten worden aan het RIVM gerapporteerd ter goedkeuring. Na goedkeuring mag het laboratorium zelfstandig SARS-CoV-2 diagnostiek doen. Na het opzetten van de SARS-CoV-2 PCR op de LC480II is deze ook opgezet voor de NeuMoDx. Dit rapport beschrijft de validatie van real-time RT-PCR voor SARS-CoV-2 detectie op de NeuMoDx.

## # Definities en afkortingen

AM	Arts-microbioloog
CBSL	Centraal Bacteriologisch en Serologisch Laboratorium
Ct	Cycle threshold
SPC2	Interne Controle
DNA	Deoxyribonucleïnezuur
MMM	Medisch Moleculair Microbioloog
PCR	Polymerase Chain Reaction
RNA	Ribonucleïnezuur
UA	Uitvoerende analist
VA	Viserend analist

## # Doelgroep

Dit verificatie rapport is van toepassing op de medewerkers van het CBSL.

## # Veiligheid

Er wordt gewerkt met besmettelijk materiaal. Werk daarom volgens de algemene veiligheidsvoorschriften voor microbiologische laboratoria. De regels die hierop betrekking hebben liggen vast in: Veilig werken met micro-organismen, parasieten en cellen in laboratoria en andere werkruimten; theorie en praktijk, 4e editie, 1ste druk 2016.

Voor veiligheid specifiek voor de afdeling Moleculair, zie: [WV-MOL-WVA Algemene werkwijze Moleculair](#)

## # Verantwoordelijkheden

De UA is verantwoordelijk voor het volgens protocol uitvoeren van het onderzoek.

De VA is verantwoordelijk voor de administratieve resultaatverwerking.

De MMer is verantwoordelijk voor de juiste interpretatie en technische validatie van deze testen.

De AM is verantwoordelijk voor het autoriseren van de onderzoeksresultaten.

## # Reagentia, media en hulpstoffen

- Teststrips
- Lysis buffer 3
- Extractie platen
- Cartridges
- Filter tips 300ul en 1000ul
- Wash buffer
- Release buffer

De primers en probes zoals die gepubliceerd zijn door [5.1.2e](https://www.eurosurveillance.org/content/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045) gebruikt (<https://www.eurosurveillance.org/content/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045>). Dit zijn primers en FAM gelabelde probes voor RdRP-gen en E-gen RT-PCR (tabel 1).

Tabel 1. Primers en probes en specificiteit

Target	Oligonucleotide	Sequentie	Specificiteit
RdRP gene	RdRp_SARs-F	GTGARATGGTCATGTGTGGCGG	
	RdRp_SARs-P2	FAM-CAGGTGGAACCTCATCAGGAGATGC-BBQ	Specifiek voor 2019-nCoV, zal SARS-CoV niet detecteren
	RdRp_SARs-P1	FAM-CCAGGTGGWACRTCATCMGGTGATGC-BBQ	Pan Sarbeco-Probe zal 2019-nCoV, SARS-CoV and bat-SARS-related CoVs detecteren
	RdRp_SARs-R	CARATGTTAAASACACTATTAGCATA	
E gene	E_Sarbeco_F	ACAGGTACGTTAATAGTTAATAGCGT	
	E_Sarbeco_P1	FAM-ACACTAGCCATCCTTACTGCGCTTCG-BBQ	Pan Sarbeco-Probe zal 2019-nCoV, SARS-CoV and bat-SARS-related CoVs detecteren
	E_Sarbeco_R	ATATTGCAGCAGTACGCACACA	

## # Apparatuur en hulpmiddelen

- NeuMoDx 96
- Pipetten P20, P200, P1000 met bijbehorende puntjes
- Vortex
- Centrifuge
- Bioveiligheidskast/LAF kast

## # Biologisch materiaal

Keel en nasofarynx uitstrijk

## # Uitvoering

**Validatie/verificatie proces: Plan van aanpak**

SARS-CoV-2 PCR is door referentie labs RIVM en EMC gevalideerd en daarom wordt alleen een beperkte validatie uitgevoerd. Er wordt gewerkt volgens de instructies die gegeven zijn door deze twee laboratoria.

De PCR wordt in ons laboratorium gebruikt in de routine diagnostiek dmv een RNA extractie op de MagNAPure 96 of Ingenius en PCR op de LC480II. De concentratie primers en probes zijn hetzelfde gebleven op de NeuMoDx ten opzichte van de LC480II.

Tabel 2. Primer en probe concentratie in de mix

Target	Oligonucleotide	pmol per reactie	Eindconc in primer probe mix pmol/µl
E gene	E_Sarbeco_F	10	3.33
	E_Sarbeco_P1	5	1.67
	E_Sarbeco_R	10	3.33

De extractie op de NeuMoDx is gewijzigd ten opzichte van de extractie op MagNAPure en Ingenius. Transport medium wordt uit gepipetteerd uit de primaire buis in een vitek buisje in de NeuMoDx. Er wordt gebruikt gemaakt van het door NeuMoDx gestandaardiseerde extractie protocol (550ul Transport medium in combinatie met lysis buffer 3).

Ook de PCR op de NeuMoDx is gewijzigd ten opzichte van de PCR op de LC480II. Hiervoor is het standaard RNA protocol gekozen van de NeuMoDx

Tabel 3. Het PCR programma op de Light Cycler 480 II voor SARS-CoV-2- PCR:

Detection Format:			Multi Color Hydrolysis Probe		
PCR Program	Segment number	Temp Target (°C)	Hold Time (sec.)	Slope (°C/sec.)	Acquisition mode
Reverse Transcription	1	50	900	EXTERNAL	
Denaturation/Inactivation	1	95	120	EXTERNAL	
Denaturation	1	95	60	4.4	None
Amplification (cycles:50)	1	95	10	4.4	None
	2	58	30	2.2	Single
Cooling	1	40	30	4.4	None

Tabel 4. Het PCR programma op de NeuMoDx voor SARS-CoV-2- PCR:

Programma	Tijd	Temperatuur °C
RT (Hold)	15 min	50
Inactivation (Hold)	4 min	95
50 Cycle (Cycle)		
- Denature	6 sec	95
- Anneal	19 sec	60

#### Validatie parameters die worden bepaald:

Voor elke parameter die bepaald wordt in de validatie worden de acceptatiecriteria (prestatie kenmerken) bepaald. Voor elke parameter die niet gevalideerd wordt, wordt er beargumenteerd waarom dat niet gedaan wordt.

De volgende parameters worden bepaald:

Tabel 5. Validatie parameters welke voor een validatie bepaald moeten worden

Parameter	Validatie
	In-house óf CE-IVD/FDA/onderzoeksprocedure (van een ander lab) MET AANPASSINGEN
1 Literatuuronderzoek	X
2 Analytische sensitiviteit	X, gedaan met het paneel van het RIVM
2.1 Limit of detection/analytische sensitiviteit	X
2.2 Efficiëntie	X
2.3 Lineariteit (indien kwantitatief)	
3 Analytische specificiteit	X, gedaan met het paneel van het RIVM
3.1 Specificiteit	
3.2 Selectiviteit	
4 Variatie	X
4.1 Intra-assay variatie	X
4.2 Inter-assay variatie	X
4.3 Juistheid en precisie	X
5 Robuustheid: testen van kritische punten (optioneel)	
6 Laboratorium validatie / accuraatheid	X
6.1 Sensitiviteit	
6.2 Specificiteit	
6.3 Prevalentie (prior kans)	
6.4 Positief voorspellende waarde	
6.5 Negatief voorspellende waarde	
7 Kwaliteitsbeheersing	X
7.1 GLIMS gereed maken (definiëren van testcodes, werklijsten, koppelingen, aanvraagcodes)	X
7.2 Kwaliteitscontroles definiëren	X
7.3 SOP z.s.m geldig verklaren	X

7.4 Medewerkers inwerken (indien nodig)	X
7.5 De onderzoeksprocedure toevoegen in het Excel document met de verrichtingen en de hyperlink maken naar het juiste verificatie/validatie rapport	X
7.6 Prospectieve risico-analyse doen en bespreken met de medewerkers	X
7.7 PDCA volledig invullen	X
7.8 Communicatie naar de aanvragers	X (Indien nodig)

**De volgende parameters zullen niet bepaald worden:**

- Variatie: ivm korte validatie na goedkeuring door RIVM

**Prestatiekenmerken en acceptatiecriteria:**

Deze PCR zal geaccepteerd worden indien:

**- De analytische sensitiviteit voldoet aan onze criteria als:**

- \* Efficiëntie van de amplificatie curve ( $R^2$ ) moet niet lager zijn dan 0.95.
- \* Efficiëntie van de PCR moet tussen 1.15 en 0.85 variëren)
- \* Lineariteit moet variëren tussen 3 en 3.6 Ct waarden)

**- De analytische specificiteit zal ook getest worden en onze acceptatie criteria zijn:**

- \* Deze PCR mag niet kruisreageren met de andere micro-organismen waarvan we middels een PCR detectie doen of aan verwante micro-organismen.

**Aanvullende validatie**

Geldigheid van de PCR

De PCR-test is geldig indien de wekelijkse positieve controle positief is en de wekelijkse negatieve controle negatief is.

De remming wordt getest met SPC2.

De interne controle (SPC2) van ieder monster moet een VALID resultaat geven in deze PCR (afkapwaarde voor transport medium <34,5).

**Analytische validatie:**

1. Analytische sensitiviteit

1.1 Verdunningsreeks E-gen NeuMoDx

Tabel 6: Verdunningsreeks van SARS-CoV-2 op NeuMoDx

	C <sub>t</sub> waarde SARS-CoV-2
10 <sup>-0</sup>	20
10 <sup>-1</sup>	23
10 <sup>-2</sup>	26
10 <sup>-3</sup>	29,5
10 <sup>-4</sup>	32
10 <sup>-5</sup>	>45

1.2 Efficiëntie ( $R^2$ =amplificatie)

SARS-CoV-2  $R^2 = 99,81\%$  PCR = 2,12

1.3 Lineariteit

SARS-CoV-2 Slope: 3,05 = DNA wordt vermeerderd met per 1,12 cycli

De analytische sensitiviteit voldoet aan de gestelde criteria.

Het gedetecteerde monster met de laagste concentratie virus had een load van 8,26 kopieën/ml. Hiermee is de sensitiviteit van de PCR vastgesteld.

**Analytische specificiteit**

2. Specificiteit

Tabel 7: Testen van de specificiteit van de SARS-CoV-2 met andere pathogenen.

Target	Resultaat
Influenza A (H3N2)	Negatief
Influenza B-Victoria	Negatief
CoV-OC43	Negatief
CoV-229E	Negatief

CoV-NL63	Negatief
Rhinovirus A16	Negatief

#### Laboratorium validatie:

Acceptatie criterium laboratorium validatie: resultaten moeten voor >95% overeenkomen.

Er zijn in totaal 33 monsters getest. Hiervan zijn 7 monsters van het RIVM sensitiviteitspanel getest, 10 monsters van het RIVM specificiteits panel getest en 16 diagnostiek monsters parallel vergeleken met het LC480II resultaat.

Van deze 33 monsters zijn er 19 positief en 14 negatief getest. Alles komt overeen met resultaat van LC480 of resultaat van RIVM panels.

Met behulp van de bovenstaande resultaten kunnen we de sensitiviteit, specificiteit, positief voorspellende waarde en negatief voorspellende waarde van de SARS-CoV-2 PCR op NeuMoDx bepalen. De resultaten van RIVM panel en LC480II resultaten worden als standaard gezien tijdens deze validatie. In tabellen 7 en 8 staan de resultaten voor de diagnostiek monsters weergegeven.

Tabel 7: Vergelijking tussen LC480II/RIVM resultaten met NeuMoDx

Uitslag indextest + Uitslag indextest - Totaal	Referentietest (voorheen gedane test)		
	Ziekte +	Ziekte -	Totaal
	19 (a)	0 (b)	19 (a+b)
	0 (c)	14 (d)	14 (c+d)
	19 (a+c)	14 (b+d)	33 (a+b+c+d)

Tabel 8: De berekening van sensitiviteit, specificiteit, PVW en NVW van de NeuMoDx

Parameter	Berekening	Uitslag
Sensitiviteit	$a / (a + c)$	19/19 = 100%
Specificiteit	$d / (b + d)$	14/14 = 100%
Positief voorspellende waarde	$a / (a + b)$	19/19 = 100%
Negatief voorspellende waarde	$d / (c + d)$	14/14 = 100%

Het acceptatiecriterium voor de laboratorium validatie is hiermee voldaan.

In tabel 9 staan alle resultaten van RIVM panels en diagnostiek monsters weergegeven:

Tabel 9: Resultaten voor SARS-CoV PCR geteste RIVM panel en diagnostiek monsters

Panellid nummer	Resultaten LC480II E-gen	Resultaten NeuMoDx
EQA_CoV20-01 (InfA-H3N2)		-
EQA_CoV20-02 (SARS-CoV-2)		34,76
EQA_CoV20-03 (Cov-OC43)		-
EQA_CoV20-04 (SARS-CoV-2)		35,59
EQA_CoV20-05 (Rhinovirus A16)		-
EQA_CoV20-06 (Cov-229E)		-
EQA_CoV20-07(Geen virus)		-
EQA_CoV20-08 (CoV-NL63)		-
EQA_CoV20-09 (Inf B-Victoria)		-
EQA_CoV20-10 (SARS-CoV-2)		26,88
Sen. Serie-03 (8,26*10 <sup>4</sup> kopieën/ml)		21,41
Sen. Serie-07 (8,26*10 <sup>3</sup> kopieën/ml)		25,18
Sen. Serie-01 (8,26*10 <sup>2</sup> kopieën/ml)		26,51
Sen. Serie-05 (8,26*10 <sup>1</sup> kopieën/ml)		32,06
Sen. Serie-04 (8,26 kopieën/ml)		32,20
Sen. Serie-06 (8,26*10 <sup>-1</sup> kopieën/ml)		-
Sen. Serie-02 (8,26*10 <sup>-2</sup> kopieën/ml)		-

Negatieve monster 1	-	-
Negatieve monster 2	-	-
Negatieve monster 3	-	-
Negatieve monster 4	-	-
Negatieve monster 5	-	-
Positieve monster 1	26,84	22,68
Positieve monster 2	24,06	18,75
Positieve monster 3	21,07	16,07
Positieve monster 4	25,65	20,51
Positieve monster 5	32,37	29,55
Positieve monster 6	28,49	26,51
Positieve monster 7	18,76	15,89
Positieve monster 8	23,76	20,01
Positieve monster 9	20,33	15,77
Positieve monster 10	25,48	24,33
Positieve monster 11	25,35	24,54

## # Interpretatie, berekening, uitslag

- Criteria voor positieve of negatieve uitslagen

Voor de PCR geldt dat het patiënten monster positief is als een amplificatie plaatsvindt.

Voor alle pathogenen geldt, dat wanneer de NeuMoDx zelf een Ct waarde geeft deze positief is, bekijk wel zelf of er exponentiële stijging van de fluorescentie te zien is. Bij twijfel wordt met VS/TL/MMM overleg.

Negatief: Geen amplificatie, een vlakke lijn, NeuMoDx interpreteert het monster als negatief. Eerst wordt de IC gecontroleerd.

SARS-CoV-2 diagnostiek, screening wordt gedaan met E-gen PCR.

E-gen PCR uitslag negatief => negatief uitslaan

E-gen PCR uitslag positief met een Ct waarde onder 30 en een mooie S-curve=> positief uitslaan, geen aanvullende confirmatie PCR nodig.

Is de curve S-vormig dan is confirmatie met RdRP PCR niet nodig (zet RdRP gen stop). Is de curve afwijkend - PCR herhalen op LC480II of NeuMoDx (afhankelijk van hoeveelheid materiaal over).

Beide PCRs negatief: negatief uitslaan

Beide PCR positief met een mooie S-curve: Positief uitslaan, onafhankelijk van de Ct waarde

E-Gen PCR positief met een mooie S-curve en Ct >30 en RdRP PCR negatief: zwak positief uitslaan (RdRP is minder gevoelig, vandaar zwak positief uitslaan). Daarnaast een nieuw materiaal opvragen voor de bevestiging.

E-Gen PCR negatief en RdRP PCR positief met een mooie S-curve: herhalen inclusief nieuwe extractie en een nieuw monster opvragen.

- Remming

De remming van de PCR's wordt gecontroleerd mbv SPC2.

Als een monster geremd is, zullen de extractie en de PCR over gedaan worden.

- Turnaround-time en hands-on-time

Turnaround-time en de hands-on-time zijn korter geworden met deze test op NeuMoDx dan op Ingenius of MP96 en LC480II.

De hands-on-time is verkleint aangezien de samples op de NeuMoDx geladen worden en daarna is het wachten tot een uitslag in plaats van extractie op Ingenius/MP96, de PCR setup op de PiRo en daarna door de LC480II in. De hands-on-time zal ongeveer 20 minuten zijn vanaf aanvragen monster tot aan de uitslag. Bij meerdere monsters blijft dit ongeveer gelijk.

De turnaround-time is ongeveer 2 uur bij een paar monsters, maar zal toenemen bij grotere aantallen (tot ongeveer 5 uur bij 96 samples). In vergelijking met extractie van 1 tot 96 samples op MP96, PiRo en LC480II is de turnaround-time voor deze route ongeveer 3-4 uur.

#### - Algemene conclusie

Uit deze validatie is gebleken dat de SARS-CoV-2 PCR op de NeuMoDx voldoet aan de volgende voorwaarden:

- Proficiency panel en sensitiviteits panel van RIVM getest en 100% gescoord
- Diagnostiek monsters komen 100% overeen ten opzichte van de LC480II resultaten met verbeterde Ct-waardes
- Zeer gevoelige meting van wel 8,26 kopieën/ml te detecteren

#### - Aanbevelingen

Aanbevolen wordt om op korte termijn de SARS-CoV-2 PCR op de NeuMoDx te testen voor de (poli)klinische ziekenhuis patiënten om deze snel van een uitslag te kunnen voorzien. Hierdoor kunnen de patiënten sneller uit isolatie.

## # Kwaliteitsbeheersing

Als deze methode in gebruik genomen gaat worden, dienen de volgende acties uitgevoerd te worden:

Nr.	Actie	Gedaan
1	Testcodes definiëren (bij methode)	Ja
2	Werklijst definiëren (bij methode)	Ja
3	Kwaliteitscontrole definiëren (bij methode)	Ja
4	Evt. on-line koppelingsresultaten verifiëren (bij methode)	Ja
5	Voorraadbeheer regelen	Ja
6	Bedieningsvoorschrift/werkvoorschrift z.s.m. geldig verklaren	Ja
7	Medewerkers inwerken	Ja
8	De onderzoeksprocedure toevoegen in het Excel document met de verrichtingen en de hyperlink maken naar de juiste verificatie/validatie rapport	Ja
9	PRI uitvoeren en PRI bespreken met medewerkers	Ja
10	PDCA invullen (alle stappen tot aan het eind) en daarin evaluatie datum inplannen	Nvt
11	Aanvragers informeren (nieuwsbrief, mail, website)	Ja

## # Samenhangende procedures en formulieren

Bedieningsvoorschrift NeuMoDx  
PCR op NeuMoDx  
Risicomanagement CBSL, PRI

## # Bijlagen

Info over de primers, probes, proficiency panel uit RIVM.pdf

5.1.2h

## # Akkoord

Opsteller

5.1.2e

Datum : Mei 2020

Naam

Handtekening

5.1.2e

5.1.2e

## # Einde document

5.1.2h