

VERIFICATIERAPPORT

COVID-19 PCR's

I. Inleiding

In de regio Wuhan in China startte in december 2019 een uitbraak van een nieuw coronavirus, ook wel SARS-CoV-2 genoemd. Het virus kan de ziekte COVID-19 veroorzaken. De meeste voorkomende klachten zijn koorts, hoesten, kortademigheid en vermoeidheid.

Dit nieuwe coronavirus wijkt af van de bekende coronavirussen die bij mensen voorkomen. De ziekte is van mens op mens overdraagbaar. Er wordt ervan uitgegaan dat één ziek persoon 2-3 andere personen kan besmetten, in een situatie zonder maatregelen.

Bij de start van de uitbraak is er weinig keuze in beschikbare diagnostiek voor het SARS-CoV-2, de beschikbare diagnostiek in Nederland betreft de in-house PCR van Corman et al (2020). Deze PCR bestaat uit 2 RT-PCR's.

Er vindt eerst een screening plaats d.m.v. een PCR die het E gen detecteert (CoVE PCR). De CoVE PCR geeft een brede detectie voor β -CoV (m.n. SARS-CoV en SARS-CoV-2). Een positieve CoVE PCR wordt geconfirmeerd m.b.v. een PCR die het RdRP gen detecteert. Deze is specifiek voor SARS-CoV-2. Beide PCR's zijn niet intern gecontroleerd. De interne controle vindt plaats in een andere mix welke altijd simultaan met de CoVE PCR gedraaid zal worden. Dit zal of een losse Flu/RSV PCR zijn of een totale RVP.

De COVID-19 PCR's zijn in-house ontwikkelde RT-PCR's vanuit literatuur^{1,2}, hier heeft een validatie plaatsgevonden. Een verificatie is van toepassing.

II. Doel

Verificatie van de COVID-19 RT-PCR's, ontwerp van Corman et al (2020).

VERIFICATIERAPPORT

COVID-19 PCR's

III. Definities / afkortingen

CoV	-	Coronavirus
COVID-19	-	Coronavirus disease 2019 (ziekte veroorzaakt door SARS-CoV-2)
Ct	-	Threshold Cycle
EAV	-	Equine Arthritis Virus
EDTA	-	Ethyleen-diamine-tetra-azijnzuur
eM	-	easyMAG
FluA	-	Influenza A Virus
FluB	-	Influenza B Virus
FVMM	-	Fast Virus Master Mix
RNA	-	Ribonucleic Acid
RSV	-	Respiratoir Syncytieel Virus
RT-PCR	-	Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction
RVP	-	Respiratoir Viraal Panel
SARS-CoV-2	-	SARS-Coronavirus-2
SARS-CoV	-	SARS-Coronavirus (SARS)
TE	-	Tris-EDTA

IV. Vooraf gestelde prestatiecriteria

Door het Erasmus MC is een validatie uitgevoerd. De volgende prestatiekenmerken zijn beschreven in literatuur^{1,2}: in-silico analyse oligo's, sensitiviteit m.b.v. virion verdunningen, sensitiviteit m.b.v. genconstructen, specificiteit, kruisreactiviteit.

Ter verificatie moeten de COVID-19 PCR's voldoen aan de volgende prestatiecriteria:

1. Naast beoordeling van de resultaten uit het RIVM worden er in eigen huis 10 klinische materialen getest welk positief of negatief zijn beoordeeld in de eigen in house PCR volgens Corman et al. (2020). De overeenkomsten moeten minimaal 90% overeenkomen, tenzij verklaarbaar door zeer lage load o.b.v. in house PCR.
2. De PCR mag niet kruis-reactief zijn met Influenza A virus, Influenza B virus of Respiratoir syncytieel virus (RSV). De PCR mag ook niet kruis-reactief zijn met de algemeen voorkomende β -CoV zoals CoV OC43.

VERIFICATIERAPPORT

COVID-19 PCR's

V. Materiaal en methode

A. Ontwerp assay

De CoVE en CoVRdRP PCR's zijn ontwikkeld om SARS-CoV-2 te detecteren. Het zijn 2 simplex RT-PCR's die niet intern gecontroleerd worden. Dat betekent dat de controle op remming moet plaatsvinden in een andere RT-PCR mix, bijvoorbeeld FluAB/RSV PCR, die simultaan uitgevoerd wordt met de CoVE en/of CoVRdRP PCR.

1. Oligo's CoVE
 - a. FcovE ACAGGTACGTTAATAGTTAATAGCGT
 - b. RcovE ATATTGCAGCAGTACGCACACA
 - c. PcovE-tq-FAM 6FAM-ACACTAGCCATCCTTACTGCGCTTCG-BHQ1
2. Oligo's CoVRdRP
 - a. FcovRdRP GTGARATGGTCATGTGTGGCGG
 - b. RcovRdRP CARATGTTAAASACACTATTAGCATA
 - c. PcovRdRP1-tq-FAM CCAGGTGGWACRTCATCMGGTGATGC
 - d. PcovRdRP2-tq-FAM 6FAM-CAGGTGGAACCTCATCAGGAGATGC-BHQ1

B. Uitvoering

De primers en probes voor CoVE en CoVRdRP zijn getest met een genconstruct, hierbij zijn originele oligoconcentraties en PCR programma gebruikt, maar de op het LMMI aanwezige mastermix FVMM. De originele assay wordt uitgevoerd met annealing op 58°C, dit is afwijkend aan de RVP PCR's. Daarom zijn beide PCR programma's getest en vergeleken. De originele assay is een simplex reactie. Er is getest of de reactie in duplex met interne controle EAV gedraaid kan worden.

De verificatie is uitgevoerd door middel van een proficiency panel (10) en 2 runcontroles die door het RIVM zijn rond gestuurd naar verschillende laboratoria. De 2 runcontroles betreffen een SARS-CoV-1 en een SARS-CoV-2. Verdunningen van beide controles moeten getest worden tot en met 10⁷. Ook zijn er 10 negatief geteste materialen opgestuurd naar het RIVM ter bevestiging en 4 positief geteste materialen.

Klinische validatie is niet mogelijk omdat er geen klinische materialen (te verkrijgen) zijn.

Ook is er onderzocht of de extractie vervangen kan worden door een kookprotocol. Hierbij wordt er 100 µl 1x TE buffer toegevoegd aan 100 µl materiaal. Vervolgens wordt er 10 µL interne controle EAV/PhHV toegevoegd. Mengingen door vortexen en 10 minuten incuberen bij 100°C. Nadat de materialen zijn afgekoeld tot KT, worden de cupjes 15 seconden afgedraaid bij 13.000 rpm zodat de celresten een pellet vormen. Het DNA bevindt zich in het supernatant, dit is vergeleken met eM extractie. Er zijn 7 materialen getest, 5 COVID-19 positief en 2 negatief.

De levering van de Copan eSwabs is vertraagd, GLY medium is een alternatief voor de eSwab. Er is een korte verificatie gedaan m.b.t. het gebruik van GLY medium in de easyMAG (eM) extractie. Afnames in dit medium zijn vergeleken met de eSwab door afgenomen wattenstokken 24 uur op KT in GLY-medium te laten staan. Er zijn 2 materialen getest.

VERIFICATIERAPPORT

COVID-19 PCR's

VI. Anonimiseren materiaal

N.v.t.

VII. Resultaten

1. Oligo's testen (200226 CoVRdRP CoVE). De oligo's zijn in simplex getest m.b.v. een korte verdunningsreeks van specifieke genconstructen. De oligo's geven goede resultaten.
2. Vergelijking PCR programma (200226 CoVRdRP CoVE / 200227 CoVRdRP CoVE). Het originele programma (58°C annealing) is vergeleken met het PCR programma RVP (60°C annealing). In simplex is er voor zowel CoVE als CoVRdRP geen duidelijk verschil tussen de beide PCR programma's, maar het 60°C programma is mogelijk minder sensitief omdat er voor beide targets 1 verdunning minder is gedetecteerd.
3. Duplex met interne controle (200227 CoVRdRP CoVE). Simplex reacties zijn vergeleken met duplex reacties met interne controle EAV. De RdRP detectie geeft geen goede resultaten in duplex, zowel de RdRP detectie als de EAV detectie verslechteren. Voor de CoVE is er verminderde sensitiviteit indien deze gedraaid wordt in duplex met EAV.
4. Verificatie RIVM; negatieve materialen (200302 CoVE). Er zijn 10 materialen, door het LMMI negatief getest voor COVID19, opgestuurd naar RIVM ter verificatie. Alle materialen zijn door RIVM negatief bevonden, daarmee zijn de negatieve resultaten van het LMMI bevestigd.
5. Verificatie RIVM; positieve materialen (200306, 200310). Er zijn 4 materialen, door het LMMI positief voor COVID19 getest, opgestuurd naar Erasmus MC ter verificatie. De positieve resultaten zijn bevestigd door het Erasmus MC met vergelijkbare Ct-waarden.
6. Verificatie door panel (EQA_CoV20). De materialen zijn geëxtraheerd met de eM, gelijk protocol als wordt uitgevoerd voor de RVP. Alle materialen zijn correct gedetecteerd. Er is geen kruisreactie gevonden. Er is een 100% score behaald.

VERIFICATIERAPPORT

COVID-19 PCR's

Monster:	Virus (resultaat RIVM COVID)	Ct CoVE:	Ct CoV RdRp:	Ct EAV:
EQA_CoV20-01	CoV 229E (neg)	neg	neg	29,09
EQA_CoV20-02	FluA H3N2 (neg)	neg	neg	29,12
EQA_CoV20-03	SARS-CoV-2 (E 23,3 / RdRp 25,59)	22,51	26,06	29,02
EQA_CoV20-04	CoV NL63 (neg)	neg	neg	29,08
EQA_CoV20-05	Rhinovirus A16 (neg)	neg	neg	29,05
EQA_CoV20-06	SARS-COV (E 32,3 / RdRP 33,9)	32,38	34,67	28,97
EQA_CoV20-07	Geen virus (neg)	neg	neg	29,09
EQA_CoV20-08	CoV OC43 (neg)	neg	neg	29,21
EQA_CoV20-09	FluB Victoria-strain (neg)	neg	neg	29,33
EQA_CoV20-10	SARS-COV (E 28,9 / 31,0)	29,11	31,19	29,04
blanco	X	neg	neg	29,04
pos controle	X	29,96	29,33	neg

Tabel 1. Resultaten EQA_CoV20 panel

7. Verificatie door runcontroles RIVM (200310 CoVRdRP CoVE). De runcontroles zijn verdunningsreeksen van RNA. De resultaten voor de CoVE detectie zijn te zien in tabel 2, voor de CoV RdRP in tabel 3.
- Voor de CoV E detectie is de 10^4 verdunning van de SARS-CoV runcontrole niet gedetecteerd door het LMMI. Dit is acceptabel omdat COVID-19 het SARS-CoV-2 virus betreft.

Verdunning	RIVM SARS-CoV	LMMI SARS-CoV	RIVM SARS-CoV-2	LMMI SARS-CoV-2
Origineel	25,93	24,40	21,71	22,32
10^1	29,28	27,00	25,01	24,47
10^2	32,23	30,26	28,61	27,23
10^3	34,72	33,50	31,55	30,76
10^4	35,99	Negatief	33,56	34,35
10^5	Negatief	Negatief	34,53	38,10
10^6	Negatief	Negatief	Negatief	41,49
10^7	Negatief	Negatief	Negatief	Negatief

Tabel 2. Resultaten runcontroles detectie CoVE

Voor de RdRP detectie is de 10^4 verdunning van de SARS-CoV-2 niet gedetecteerd door het LMMI. Dit is acceptabel omdat de RdRP de confirmatie assay betreft en niet de detectie die voor screening gebruikt wordt.

VERIFICATIERAPPORT

COVID-19 PCR's

Verdunning	RIVM SARS-CoV	LMMI SARS-CoV	RIVM SARS-CoV-2	LMMI SARS-CoV-2
Origineel	26,08	26,34	24,64	26,28
10 ¹	29,22	29,37	27,97	28,67
10 ²	31,90	32	31,46	31,05
10 ³	34,49	36,2	33,54	33,63
10 ⁴	34,94	39,65	35,32	Negatief
10 ⁵	Negatief	Negatief	Negatief	Negatief
10 ⁶	Negatief	Negatief	Negatief	Negatief
10 ⁷	Negatief	Negatief	Negatief	Negatief

Tabel 3. Resultaten runcontroles detectie CoV RdRP

8. Kookprotocol (200408). Er is een kookprotocol als alternatief voor eM extractie getest. De resultaten zijn vergeleken met eM extractie. Er zijn 7 materialen getest. Er is meer remming gevonden en een verlies van sensitiviteit met <8 Ct. Deze methode is niet geschikt om te gebruiken voor COVID diagnostiek.
9. GLY medium (200224). Er zijn 2 materialen getest en vergeleken met eSwab, in de eM extractie. De resultaten kwamen overeen. Het GLY medium kan gebruikt worden als alternatief voor eSwab.

VIII. Discussie

Bij vergelijking van de PCR programma's (58°C en 60°C) zijn slechts 2 testen uitgevoerd. In de eerste test zijn 10x verdunningen gebruikt en was er geen verschil in sensitiviteit gevonden. In de tweede test zijn kleinere verdunningen gebruikt, hierbij is er 1 verdunning minder gedetecteerd met het 60°C programma. De hoeveelheid DNA is deze lage verdunningen ligt rond de detectielimiet en zou daarom meerdere keren getest moeten worden om tot een goede conclusie te komen. Door de hoge tijdsdruk, ivm de opkomende COVID19 pandemie, is er voor gekozen om het originele programma (58°C) te gebruiken voor de routine diagnostiek en het verschil in sensitiviteit met het RVP programma (60°) niet verder te onderzoeken. Het gebruik van RVP PCR programma zou voor de routine diagnostiek wel wenselijk zijn, mogelijk kan dit op een later moment alsnog verder onderzocht worden.

Omdat de Copan eSwabs niet geleverd konden worden is er gezocht naar alternatieven. Een daarvan is GLY medium en deze is getest i.c.m. eM extractie. Een ander alternatief is een droge wattenstok in 1x TE-buffer. Deze optie is niet getest, maar TE-buffer wordt in de routine diagnostiek dagelijks i.c.m. eM extractie gebruikt, zonder problemen. Daarom is voor gebruik van TE buffer in de eM extractie geen verificatie nodig.

VERIFICATIERAPPORT

COVID-19 PCR's

IX. Conclusie/aanbevelingen

De resultaten COVID-19 PCR's (CoV E detectie en CoV RdRP detectie) komen volledig overeen met de resultaten van het RIVM. Er zijn geen kruisreacties gevonden met andere virussen, waaronder CoV OC43. Op basis van de kwaliteitsronozendingen van het RIVM (LEQA; landelijk external quality assessment) is de detectielimiet van deze workflow: $\leq 1.28 \cdot 10^2$ copies/ml. Hiermee is voldaan aan de gestelde prestatiecriteria.

X. Risicoanalyse

Alertheid m.b.t. kruisreactiviteit met andere β -CoV zoals CoV OC43 of CoV HKU1 (geen detectie op het LMML aanwezig) is noodzakelijk. Er zijn slechts enkele materialen getest in de verificatie en hierover is nog weinig informatie bekend.

XI. Informeren aanvragers

Aanvragers zijn mondeling en per mail geïnformeerd, dit is in een zeer kort tijdsbestek gecommuniceerd i.v.m. de COVID-19 pandemie.

XII. Bijlagen

- | | | |
|-----------|---|------------------------------------|
| Bijlage 1 | - | Alternatieve annealing-temperatuur |
| Bijlage 2 | - | Speeksel als uitgangsmateriaal |

XIII. Referenties

N.v.t.

XIV. Literatuur

- 1) Corman et al. (2020) "Detection of 2019 novel Coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR". *Euro Surveill.* 25(3): 2000045
- 2) Protocol 'Diagnostic detection of 2019n-CoV by real-time RT-PCR'. Jan 17, 2020.

VERIFICATIERAPPORT**COVID-19 PCR's**

Naam uitvoerenden verificatie: 5.1.2e

Periode verificatie: start datum: 26/02/2020 **eind datum: 24/04/2020**

Vrijgifte voor gebruik door (initialen-datum AM/MMM): 15/5/20 5.1.2e

In gebruik genomen op: 06/03/2020

VERIFICATIERAPPORT
COVID-19 PCR's
Bijlage 1 – alternatieve annealing-temperatuur

I. Inleiding

De COVID-19 RT-PCR's zijn binnen het LMMI geverifieerd t.o.v. de gevalideerde PCR, zoals beschreven door Corman et al¹.

Corman et al. gebruikten 58°C als annealings-temperatuur. Het LMMI gebruikt voor de respiratoire virale diagnostiek 60°C als annealings-temperatuur. Uit oogpunt van gemak, eenduidigheid en efficiency is het ideaal om dezelfde, standaard, temperatuur te gebruiken voor alle pakket-diagnostiek. Tijdens het verificatie-proces (zoals hierboven beschreven) zijn vergelijkingen gemaakt tussen de diagnostiek met 58°C programma en diagnostiek met 60°C programma; hieruit bleek dat op 60°C er mogelijk verminderde sensitiviteit optreedt (1 verdunningsstap minder gedetecteerd).

In verband met de tijdsdruk en grote kennis-lacune rondom COVID-19 diagnostiek is de sensitiviteit niet verder uitgezocht, maar besloten om 58°C als annealings-temperatuur te handhaven (februari 2020). Dit is echter onhandig i.v.m. het separaat bepalen van SARS-CoV-2 t.o.v. andere respiratoir virale verwekkers (RVP). In juni 2020 was er meer bekend over de gewenste klinische sensitiviteit en de performance van de PCRs. Met die kennis is de vergelijking tussen 58°C en 60°C als annealings-temperatuur weer opgepakt. De resultaten van de hernieuwde vergelijking worden hier beschreven.

II. Doel

Vergelijking en verificatie van de COVID-19 RT-PCR's bij annealing op 60°C t.o.v. 58°C.

III. Definities / afkortingen

CoV	-	Coronavirus
COVID-19	-	Coronavirus disease 2019 (ziekte veroorzaakt door SARS-CoV-2)
Ct	-	Threshold Cycle
EAV	-	Equine Arthritis Virus
EDTA	-	Ethyleen-diamine-tetra-azijnzuur
eM	-	easyMAG
FluA	-	Influenza A Virus
FluB	-	Influenza B Virus
FVMM	-	Fast Virus Master Mix
RNA	-	Ribonucleic Acid
RSV	-	Respiratoir Syncytieel Virus
RT-PCR	-	Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction
RVP	-	Respiratoir Viraal Panel
SARS-CoV-2	-	Severe Acute Respiratory Syndrome-Coronavirus-2
SARS-CoV	-	Severe Acute Respiratory Syndrome-Coronavirus
TE	-	Tris-EDTA

VERIFICATIERAPPORT
COVID-19 PCR's
Bijlage 1 – alternatieve annealing-temperatuur

IV. Vooraf gestelde prestatiecriteria

De vergelijking is t.o.v. de reeds geverifieerde in house PCR.

Ter verificatie moeten de COVID-19 PCR's voldoen aan de volgende prestatiecriteria:

1. Resultaten moeten >90% overeen komen met externe resultaten (RIVM rondzending), tenzij verklaarbaar door zeer lage load o.b.v. in house PCR.
2. De probability-of-detection (berekend als N positieve PCR reacties / N totaal aantal PCR reacties) moet >80% zijn om als positief beoordeeld (N=5)

V. Materiaal en methode

A. Uitvoering

De verificatie is uitgevoerd door middel van een sensitiviteits panel van het RIVM (loads: 8.3×10^{-2} tot 8.3×10^4 dPCR kopieën per mL. Alle eluaten zijn afkomstig van ANDi S350 extractie. Hierbij zijn twee run-controles (bekend positieve materialen met Ct~25) meegenomen voor herhaalbaarheid.

Klinische validatie is verricht t.o.v. alle bekende Ct waardes zoals gevonden met de PCR op 58°C, onder aanname dat deze gevalideerde protocol als gouden standaard fungeert.

VI. Anonimiseren materiaal

N.v.t.

VERIFICATIERAPPORT
COVID-19 PCR's
Bijlage 1 – alternatieve annealing-temperatuur

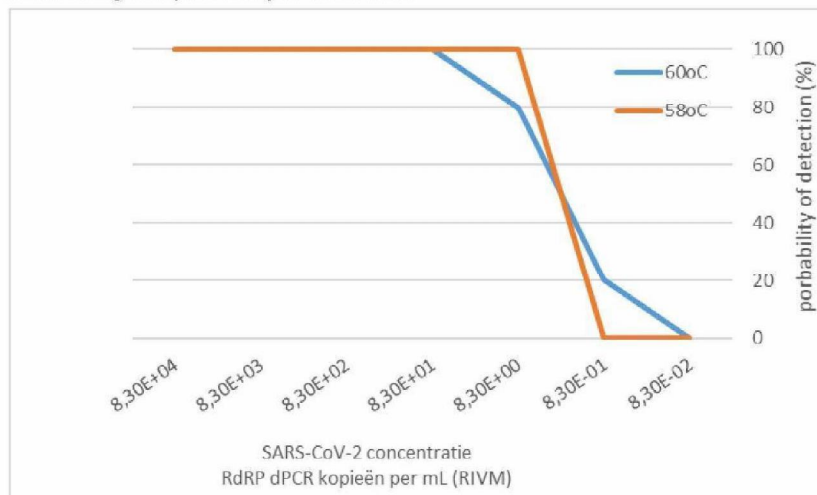
VII. Resultaten

1. Werklijsten:
 - a. 200604 CoVE panel RIVM 58 vs 60
2. SDS files:
 - a. 200604 CoVE 58
 - b. 200604 CoVE 60.

Load (RIVM)	58°C annealing			60°C annealing					
8,30E-02	Undet	Undet	Undet	Undet	Undet	Undet	Undet	Undet	Undet
8,30E-01	Undet	Undet	Undet	Undet	Undet	Undet	Undet	Undet	37,46
8,30E+00	38,33	36,26	35,25	36,23	38,18	36,15	35,88	Undet	Undet
8,30E+01	34,23	33,68	33,56	34,09	33,72	33,45	33,67	33,97	33,97
8,30E+02	30,05	29,67	29,43	30,02	30,08	29,8	29,87	29,9	29,9
8,30E+03	26,78	26,29	26,48	26,69	26,96	27,07	27,11	26,83	26,83
8,30E+04	23,92	23,02	23,12	23,99	23,83	24,02	23,76	24,06	24,06
blanco	Undet	Undet	Undet	Undet	Undet	Undet	Undet	Undet	Undet
Run contr	25,20	24,98	25,49	25,35	25,27	25,11	25,90	25,13	25,13
Run contr	25,43	25,14	25,09	25,31	25,53	25,32	25,14	25,32	25,32

Tabel 1: Ct waardes gevonden m.b.v. de in house PCR met gebruik van 60°C als annealings-temperatuur t.o.v. 58°C als annealings-temperatuur.

3. Berekening van probability-of-detection:

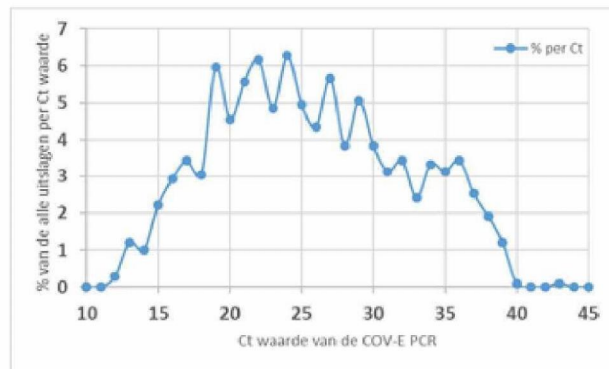


VERIFICATIERAPPORT
COVID-19 PCR's
Bijlage 1 – alternatieve annealing-temperatuur

VIII. Discussie

Bij vergelijking van de PCR programma's (58°C en 60°C) is te zien dat een hogere annealingstemperatuur kan leiden tot verminderde sensitiviteit indien de hoeveelheid virusdeeltjes in het afnamemateriaal rond de detectielimiet ligt (Ct>35; ~8 RdRP dPCR kopieën/mL o.b.v. RIVM sensitiviteitspaneel).

In de sensitiviteitspaneel is te zien dat de discrepanties vanaf Ct-waarde 37 ontstaan. Retrospectief onderzoek laat zien dat slechts 3,3% van alle samples een Ct-waarde >37 hadden (periode: 27-2-2020 t/m 27-6-2020).



Veel van deze samples met Ct waarde >37 betroffen ook herhaal-diagnostiek na een eerder positieve bevinding. Derhalve is het aantal individuele casussen met Ct >37 minder dan 5% van alle bevindingen. Op grond hiervan is een mogelijk sensitiviteit van 80% bij <5% van de materialen acceptabel. De theoretische sensitiviteit wordt 99% t.o.v. de gouden standaard (58°C annealing-temperatuur); 95% van de materialen met 100% sensitiviteit en 5% van de materialen met 80% sensitiviteit.

IX. Conclusie/aanbevelingen

Conclusie: gebruik van 60°C annealing geeft gelijkwaardige sensitiviteit t.o.v. 58°C.

De CoV-E PCR kan worden verricht op 60°C per 13 juni 2020. De 58°C optie blijft bestaan.

X. Risicoanalyse

N.v.t.

XI. Informeren aanvragers

N.v.t.

VERIFICATIERAPPORT
COVID-19 PCR's
Bijlage 1 – alternatieve annealing-temperatuur

XII. Bijlagen

N.v.t.

XIII. Referenties

N.v.t.

XIV. Literatuur

- 1) Corman et al. (2020) "Detection of 2019 novel Coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR". *Euro Surveill.* 25(3): 2000045

Naam uitvoerenden verificatie: 5.1.2e

Periode verificatie: start datum: 04/06/2020 **eind datum: 12/06/2020**

Vrijgifte voor gebruik door (initialen-datum AM/MMM): 05/06/20 5.1.2e

In gebruik genomen op: 05/06/2020

VERIFICATIERAPPORT
COVID-19 PCR's
Bijlage 2 – speeksel als uitgangsmateriaal

I. Inleiding

Sputa en (gecombineerde) nasofarynx/keeluitstrijken zijn momenteel het voorkeursmateriaal voor COVID-19 diagnostiek. Echter deze afnamemethoden zijn niet geschikt/mogelijk bij specifieke doelgroepen, bijvoorbeeld kleine kinderen. Voor deze groepen willen het RIVM en de GGD'en graag speeksel kunnen afnemen voor COVID-19 screening. Voor een technische verificatie is gebruik gemaakt van een speeksel-rondzending van het RIVM. Hier wordt beschreven wat de resultaten waren.

II. Doel

Verifiëren van de technische mogelijkheid om COVID-19 screening/diagnostiek te verrichten in speeksel met behulp van in house CoV-E PCR na extractie middels de ANDi S350 of easyMag.

III. Definities / afkortingen

CMA	-	Coördinerend moleculair analist
COVE	-	Severe Acute Respiratory Syndrome-Coronavirus-2 (PCR), gericht tegen het E gen
COVID-19	-	Coronavirus disease 2019 (ziekte veroorzaakt door Severe Acute Respiratory Syndrome-Coronavirus -2)
eM	-	easyMag
FluA	-	Influenza A virus (PCR)
FluB	-	Influenza B virus (PCR)
KT	-	Kamertemperatuur
LCDK	-	Landelijke coördinatie diagnostische keten
MMM	-	Medisch moleculair microbioloog
PCR	-	Polymerase Chain Reaction
RNA	-	Ribonucleïnezuur
RSV	-	Respiratoir Syncytieel virus
SARS-CoV-2	-	Severe Acute Respiratory Syndrome-Coronavirus -2, de veroorzaker van COVID-19

IV. Vooraf gestelde prestatiecriteria

Deelname aan de speeksel rondzending van het RIVM (gespiked speeksel samples).
Alle core materialen moeten gedetecteerd worden.
Educational materialen worden bij voorkeur wel gedetecteerd.

VERIFICATIERAPPORT
COVID-19 PCR's
Bijlage 2 – speeksel als uitgangsmateriaal

V. Materiaal en methode

Uitvoering zoals beschreven in apparaatvoorschrift 'ANDi S350', ([Doc 160411](#)) en apparaatvoorschrift 'Nuclisens easyMag' (Doc [126513](#)).

VI. Anonimiseren materiaal

N.v.t.

VII. Resultaten

Een rondzending van 6 rondzending samples is ingezet volgens voorschrift. De materialen zijn geëxtraheerd m.b.v. de ANDi S350 en de easyMAG.

De eluaten zijn getest m.b.v. de Corman E PCR (reguliere COVID PCR, gedraaid op 58°C). De resultaten zijn weergegeven in de tabel hieronder;

Panellid nummer	Ct waarden		Uitslag RIVM
	ANDi S350	easyMAG	dPCR/mL
Sen.SALIVA_CoV20-01	24.97	29.22	8.3x10 ⁴ (core)
Sen.SALIVA_CoV20-02	35.21	37.02	8.3x10 ¹ (core)
Sen.SALIVA_CoV20-03	28.42	33.06	8.3x10 ³ (core)
Sen.SALIVA_CoV20-04	-	-	<i>Negatief</i> (core)
Sen.SALIVA_CoV20-05	31.85	35,31	8.3x10 ² (core)
Sen.SALIVA_CoV20-06	-	-	8.3 (educational) [†]

Tabel 1. beschrijving van de gevonden resultaten voor de speeksel rondzending van het RIVM.

† Dit monster is in triplo getest door het referentielaboratorium met twee PCR's (Corman E; 1/3 positief, RdRP PCR negatief). Op basis hiervan is het materiaal door het RIVM beoordeeld als zijnde educational.

VIII. Discussie

Dit betreft een technische verificatie m.b.t. de vraag of SARS-CoV-2 RNA uit speeksel geëxtraheerd kan worden. Dit is het geval. Met behulp van de ANDi S350 / easyMAG en in-house PCR CoV-E PCR kan vanaf 8.3x10¹ RdRP dPCR kopieën per mL gedetecteerd worden.

De klinische verificatie moet nog verricht worden. Op basis van beschikbare literatuur^{1 2 3} lijkt speeksel een alternatief te zijn voor COVID diagnostiek, echter lijkt de load in speeksel lager t.o.v. diepe uitstrijken^{1,2,4}, en dus ook lagere sensitiviteit. Hoewel er ook een report bekend is waar speeksel juist beter scoort dan uitstrijken³.

VERIFICATIERAPPORT
COVID-19 PCR's
Bijlage 2 – speeksel als uitgangsmateriaal

De lagere load aan SARS-CoV-2 in speeksel t.o.v. diepe uitstrijken betekent dat positieve gevallen gemist kunnen worden. Dit risico kan acceptabel worden geacht voor screening van kleine kinderen waarvoor geen diepe uitstrijken mogelijk zijn.

IX. Conclusie/aanbevelingen

Speeksel kan geaccepteerd worden voor COVID-19 screening na extractie op de ANDi S350 of de eM. In geval van een negatieve uitslag bij hoge verdenking op COVID-19 moet de lagere (klinische) sensitiviteit van het materiaal 'speeksel' t.o.v. andere klinische materialen (i.e. uitstrijken of sputa) in overweging worden genomen.

X. Risicoanalyse

N.v.t.

XI. Informeren aanvragers

N.v.t.

XII. Bijlagen

N.v.t.

XIII. Referenties

Doc [160411](#) - Apparatenvoorschrift ANDi S350
Doc [126513](#) - Apparatenvoorschrift Nuclisens easyMag

VERIFICATIERAPPORT
COVID-19 PCR's
Bijlage 2 – speeksel als uitgangsmateriaal

XIV. Literatuur

1. Williams, E. et al (2020) 'Saliva as a non-invasive specimen for detection of SARS-CoV-2' *J. clin. Microbiol.* Doi: 10.1128/JCM.00776-20
2. Becker, D. et al. (2020) 'Saliva is less sensitive than nasopharyngeal swabs for COVID-19 detection in the community setting'. *medRxiv* doi.org/10.1101/2020.05.11.20092338
3. Wyllie A.L. et al. (2020) 'Saliva is more sensitive for SARS-CoV-2 detection in COVID-19 patients than nasopharyngeal swabs' *medRxiv* doi.org/10.1101/2020.04.16.20067835
4. Skolimowska, K. et al. (2020) 'Non-invasive saliva specimens for the diagnosis of COVID-19: caution in mild outpatient cohorts with low prevalence' *CMI* doi.org/10.1016/j.cmi.2020.07.015

Naam uitvoerende(n) verificatie: 5.1.2e

Periode verificatie: start datum: 10/07/2020

eind datum: 10/07/2020

Vrijgifte voor gebruik door (initialen-datum AM/MMM): 22/07/2020 5.1.2e

In gebruik genomen op: 22/07/2020