

Interpretatie qPCR data SARS-CoV-2 afvalwater surveillance

EAV wordt gebruikt als interne proces controle en wordt gebruikt om vals negatieve uitslagen te voorkomen. Het is een controle voor het hele proces van RNA extractie tot en met amplificatie en detectie. Met deze controle is dus niet te achterhalen welke van deze stappen (extractie of RT-PCR) gefaald heeft mocht EAV niet gedetecteerd worden.

Positieve Controles:

- Positieve Controle N1: Ct tussen 34 – 37 controlekaart
- Positieve Controle N2: Ct tussen 34 – 37 controlekaart
 - o Indien niet binnen de gestelde grenzen, dan qPCR herhalen voor alle samples in de betreffende PCR-plaat

Negatieve Controles:

- Negatieve Controle N1: Mag geen N1 signaal geven
- Negatieve Controle N2: Mag geen N2 signaal geven
 - o Gebeurt dit wel dan kun je bij een positief signaal in je monster **niet** zeggen dat SARS-CoV-2 echt **aanwezig** is.
 - o Indien positief, dan de qPCR herhalen voor alle samples in de betreffende PCR-plaat

Monsters:

- Monsters worden in duplo geëxtraheerd, extracten worden in enkelvoud ingezet, alleen onverdund
- De extractie controle EAV wordt toegevoegd aan **alle** monster vóór extractie:
 - o EAV PCR wordt ingezet met **onverdund** RNA: Ct moet liggen tussen 25 – 29
 - o Indien niet binnen de gestelde grenzen, dan extractie en qPCR voor N1, N2 en EAV herhalen
 - o 10x verdunning wordt dus **niet** ingezet

Kwantificeren qPCR data in afvalwater op basis van SARS-CoV-2 RNA

Kwantificeren op basis van SARS-CoV-2 RNA

- *In vitro* getranscribeerd RNA van xxx nt in lengte
- 10^{-8} verdunning = 4 kopieën / 5 µl
- Correctiefactor op basis van digital-PCR geschatte concentratie
 - o Correctiefactor apart berekenen voor N1, N2 en N3
- IJklijn wordt meegenomen op elke plaat (vooralsnog)
 - o Op termijn wellicht gemiddelde ijklijn gebruiken op basis van alle eerder uitgevoerde ijklijnen

- Vereiste dat dan alle PCR controles binnen de gestelde grenzen liggen
- *Kwaliteitseisen ijklijn*
 - $r^2 > 0,98$
 - slope tussen -3,1 en -3,6
 - op basis van ≥ 3 punten
- Indien de R^2 en/of de slope niet OK is (op minimaal 3 punten) qRT-PCR opnieuw uitvoeren/ kwantificeren op basis van gemiddelde ijklijn
- *Kwaliteitseisen Ct-waarde*
 - Ct-waarde wordt meegenomen bij fluorescentie > 2
 - En bij een vloeiende stijgende lijn
 - Bij fluorescentie ≤ 2 , alleen 'SARS-CoV-2 RNA gedetecteerd', geen kwantificering
- *Berekening concentratie per sample*
 - Bij een positieve reactie, Ct-waarde per reactie omrekenen naar RNA kopieën/reactie op basis van de betreffende ijklijn/gemiddelde ijklijn
 - Onderzocht volume rioolwater per reactie berekenen
 - Aantal RNA kopieën van alle 4 de analyses van een monster ($2 \times N1$, $2 \times N2$) bij elkaar optellen, en delen door het totale onderzochte volume van alle reacties
 - RNA kopieën/onderzocht volume omrekenen naar RNA kopieën/ml rioolwater
 - Indien fluorescentie ≤ 2 dan deze RT-PCR reactie niet meenemen in de kwantificering