

Real-time RT-PCR protocollen voor SARS-CoV-2 detectie

Voor detectie van SARS-CoV-2 wordt door de centrale labs RIVM en EMC de **primers en probes** zoals die gepubliceerd zijn door Corman et al. 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	GTGARATGGTCATGTGGCGG	
	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-ACTAGCCATCCTTACTGCGCTTCG-BBQ	Pan Sarbeco-Probe zal 2019-nCoV, SARS-CoV and bat-SARS-related CoVs detecteren
	E_Sarbeco_R	ATATTGCAGCAGTACGCACACA	

Een **runcontrol** om de PCR helpen op te zetten kan verkregen worden bij het RIVM (email naar [rivm.nl](mailto:(10)(2e)@rivm.nl)). Geleverd wordt 1 ampul van 1 ml SARS-CoV HKU39849 RNA in TE buffer met yeast tRNA (0.1 mg/ml). Dit bevat 40 TCID₅₀ virus/μl en 10-100 keer meer RNA. Op basis van de RdRP-gen en E-gen RT-PCR Ct waarden 24.86 en 25.75 respectievelijk bij 5 μl per reactie na ontdooien. Na ontdooien, invriezen en invriezen. Kan eventueel naar behoeven verder verdund worden.

Om bij het opzetten van de RT-PCR te assisteren hieronder de gegevens van de test geïmplementeerd bij het RIVM en het Erasmus MC.

RIVM implementatie

Externe lysis in klasse 2 BHK. Extractie met MagNA Pure96 DNA and Viral NA Small Volume kit op MagNA Pure96 van 200 μl monster, elutie in 50 μl.

Primer probe mix

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

Voor elke target worden primers en probe(s) in de juiste verhouding gemengd zodat met 3 μl primer probe mix de gewenste hoeveelheid pmol primer en probe in de reagens mix wordt bereikt.

Reagens mix

	Volume (µl)
4x Taqman Fast Virus MM	5
Primer probe Mix	3
PCR Grade Water	7
Total nucleic acid	5
Eind volume	20

Temperatuur protocol

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	1	95	10	4.4	None
(cycles:50)	2	58	30	2.2	Single
Cooling	1	40	30	4.4	None

LC 480 1 of 11

De cDNA stap wordt op het RIVM om PCR logistieke redenen op een andere thermal cycler uitgevoerd zodat platen langer kunnen wachten om in het PCR apparaat geplaatst te worden, zonder verlies van gevoeligheid. Deze stap kan ook gewoon in de LC480 uitgevoerd worden direct gevolgd door de amplificatie.

Interne controle EAV wordt vanaf extractie meegenomen en in aparte RT-PCR getest.

Erasmus MC implementatie

MagNA PureLC: Total nucleic acid kit

200 µl input sample

100 µl elutie

Externe lysis protocol

of

MagNA Ppure96: Total nucleic acid kit large volume

500 µl input sample

100 µl elutie

Externe lysis protocol

Primer probe mix

Target	Oligonucleotide	pmol per reactie	Eindconc in primer probe mix pmol/µl
RdRP gene	RdRp_SARSr-F	12	30
	RdRp_SARSr-P2	2	5
	RdRp_SARSr-P1	2	5
	RdRp_SARSr-R	16	40
E gene	E_Sarbeco_F	8	20
	E_Sarbeco_P1	4	10
	E_Sarbeco_R	8	20

Voor elke target worden primers en probe(s) in de juiste verhouding gemengd zodat met 0.4 µl primer probe mix de gewenste hoeveelheid pmol primer en probe in de reagens mix wordt bereikt.

Reagens mix

	Volume (µl)
4x Taqman Fast Virus MM	5
Primer probe Mix*	0.4
PCR Grade Water	6.6
Total nucleic acid	8
Eind volume	20

* Eindconcentratie in PCR als beschreven in Corman et al.

Temperatuur protocol

Detection Format: Multi Color Hydrolysis Probe		Temp Target (°C)	Hold Time (sec.)	Slope (°C/sec.)	Acquisition mode	LC 480-II
PCR Program	Segment number					
Reverse Transcription	1	55	600	-	None	
Denaturation/Inactivation	1	95	180	-	None	
Amplification (cycles:45)	1	95	15	2.5	None	
	2	58	30	2.2	Single	

Interne controle PDV wordt vanaf extractie meegenomen en in aparte RT-PCR getest.

Resultaten rapporteren

Maakt u gebruik van de aangeboden runcontrole dan vragen we u die te testen voor beide targets in een 10-voudige verdunningsreeks van onverdund tot 10⁻⁶ en de resultaten daarvan te sturen naar [\[redacted\]@rivm.nl](mailto:(10)(2e)@rivm.nl) voor evaluatie.

Vragen

Voor acute vragen over bovenstaande kunt u bellen met [\(10\)\(2e\) +31-\[redacted\]](tel:(10)(2e)+31-(10)(2e)) of buiten kantooruren +31-[\(10\)\(2e\)](tel:(10)(2e)).