

To: (10)(2e) | (10)(2e) @rivm.nl]; (10)(2e) | (10)(2e) @rivm.nl]
Cc: (10)(2e) | (10)(2e) @rivm.nl]; (10)(2e) | (10)(2e) @rivm.nl]
From: (10)(2e)
Sent: Fri 11/6/2020 2:54:47 PM
Subject: FW: Covid-19 analyse-methoden
Received: Fri 11/6/2020 2:54:49 PM
[Direct-zol™ RNA Miniprep \(Zymo Research\).pdf](#)
[RNeasy MinElute Cleanup Kit \(Qiagen\).pdf](#)
[EUA-CDC-Panel-ifu.pdf](#)

Hi (10)(2e)

I have been made aware that there is a database where questions to RIVM and responses are collected for reference.

Below is a request and response to a question that came to (10)(2e) in October, that I have answered with a reply used previously to a similar request from Iraq about methodologies used for SARS-CoV-19 testing in wastewater samples.

Kind regards,
 (10)(2e)

From: (10)(2e)
Sent: donderdag 5 november 2020 20:58
To: (10)(2e) @hhnk.nl' <(10)(2e) @hhnk.nl>
Cc: (10)(2e) <(10)(2e) @rivm.nl>
Subject: RE: Covid-19 analyse-methoden

Dear (10)(2e)

Many thanks for your email. And firstly, I am sorry that I write to you in English. I hope it is ok.

It is nice to hear about your work and I hope we can help and contribute to your international network. My name is (10)(2e) and I am a colleague of (10)(2e) supporting non-technical aspects of wastewater surveillance at the RIVM. We are in the process of writing a national protocol as we have received many requests internationally for our methods. We think it will be available later this month depending on how long it takes to validate and can share this with you when it is ready.

At the moment, our labs follow the protocols of suppliers with some changes added.

Please find attached the protocols that need to be used in the following order:

1. Direct-Zol RNA Miniprep. This protocol works well to remove inhibitors that are by nature present in wastewater. To make sure that all inhibitors are removed and to improve detection, the extract of the Direct-Zol RNA Miniprep is further cleaned with the protocol below.
2. RNeasy MinElute Cleanup kit
3. EUA-CDC Panel. This is the CDC protocol for SARS-CoV-2 detection by qPCR. We order the reagents, including the primers and probes, from different suppliers and not through the CDC. The sequences of the primers and probes can be find here: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/rt-pcr-panel-primer-probes.html>. Please note that we do not use the N3 primers and probes. These target a generic sequence in corona viruses and is not specific for SARS-CoV-2.

Below are the changes that we have performed on the different protocols.

Direct-Zol RNA Miniprep improvements:

- All centrifuge steps at 13.000xg
- Pre-treatment sample: 2x250 ul wastewater + 2x750 ul TRI reagent lysis. Transfer 500 ul of this mix to 1.5ml Eppendorf tubes to obtain 4 tubes with 500 ul.
- Step 1: Add 500 ul EtOH 95-100% to each Eppendorf tube to obtain a total volume of 1 ml sample mix in

each Eppendorf tube. You will now have 4 Eppendorf tubes with a total volume of 4 ml.

- Step 2: Load 650 ul of this 4 ml on ONE column from the Zymo kit. Centrifuge and load again. Repeat this SIX times until all 4 ml has been loaded on the column.
- Step 3: Prewash 2x 350 ul
- Step 4: Centrifuge 30 seconds. Remove passed through liquid. Centrifuge again for 90 second.
- Step 5: Elute in 100 ul and continue with RNeasy cleanup kit
- Dispose Trizol reagents according to your regulations

RNeasy MinElute Cleanup kit:

- Follow the protocol for a starting volume of 100 ul.
- Step 6: Centrifuge for 2 min
- Step 7 Elute in 55 ul.
- Dispose TRL buffer as guanidine waste according to your regulations.

EUA-CDC Panel

- No changes

Please inform me if you have any questions.

Kind regards,

(10)(2e)

(10)(2e) *Infectious Diseases & Global Health*
Center for Zoonoses & Environmental Microbiology (Z&O)

National Institute for Public Health and the Environment (RIVM)



Rijksinstituut voor Volksgezondheid
en Milieu
Ministerie van Volksgezondheid,
Welzijn en Sport

Visiting address: Antonie van Leeuwenhoeklaan 9, 3721 MA, Bilthoven
Correspondence address: RIVM, P.O. Box 1, 3720 BA, Bilthoven, The Netherlands
T +31 (10)(2e)
E (10)(2e) @rivm.nl

From: (10)(2e) <(10)(2e)@rivm.nl>
Sent: donderdag 29 oktober 2020 14:57
To: (10)(2e) <(10)(2e)@rivm.nl>
Subject: FW: Covid-19 analyse-methoden

FYI

From: Elias Maxil, Jorge <(10)(2e)@hhnk.nl>
Sent: woensdag 28 oktober 2020 17:09
To: (10)(2e) <(10)(2e)@rivm.nl>
Subject: [Spam] Covid-19 analyse-methoden

Geachte (10)(2e),

Ik ben (10)(2e) bij de Hoogheemraadschap Hollands Noorderkwartier en ik kreeg uw e-mail doo (10)(2e) uit Waterproef.

Onder andere taken neemt ik deel aan internationale samenwerkingsprojecten die onder de naam van Dutch Water

Authorities, verschillende waterschappen voeren in andere landen uit. Door enkele contacten in Latijnsamerika weten we dat enkele mensen in Mexico bezig zijn met de opzetten van de methodologie om SARS-CoV-2 zijn. Ze hebben een methode van KWR gevolgd maar als ze niet hetzelfde instrumentatie van KWR hebben, moeten ze de methoden aanpassen aan zijn situatie. We ook weten dat ook in andere landen enkele groepen bezig zijn in het implementatie van de SARS-CoV-2 analyses.

Ik heb een voorstel aan mijn waterschap en de groep van de Dutch Water Authorities ingediend dat als we de officiële methoden die in Nederland gebruiken kunnen krijgen, kan ik deze methoden vertellen en ze naar onderzoeksgroepen die bezig zijn in de implementatie van de techniek delen. Ik heb bijvoorbeeld met de groep uit Mexico gepraat en ze denken dat een "second opinion" zou nuttig zijn om te hebben als ze een instrument of chemicaal moeten door andere vervangen. Daaron is de kennis van RIVM op waarde.

Mijn vraag is: Wie zal ik contacteren om over de mogelijkheid om de methoden die jullie volgen te spreken?

Mag ik misschien u bellen om verder dit verzoek uit te leggen?

Alvast bedankt en ik zie graag uw reactie tegemoet.

Met vriendelijke groet,

(10)(2e)

Cluster Kennis & Ontwikkeling
Afdeling Waterketen
Hoogheemraadschap Hollands Noorderkwartier
Stationsplein 136
1703 WC HEERHUGOWAARD
Postbus 250
1700 AG HEERHUGOWAARD

Telefoon: 072 (10)(2e)

Mobiel: 06 (10)(2e)

(10)(2e) @hknk.nl

www.hknk.nl