

## Afdeling Medische Microbiologie

Verificatie rapport

<b>Titel</b>	Aptima SARS CoV-2 Assay op de Panther
--------------	---------------------------------------

<b>Aanvrager</b>	5.1.2e
<b>Uitvoerder</b>	
<b>Datum</b>	

<b>Validatie*</b>	
<b>Verificatie*</b>	<b>x</b>

<b>Apparaat*</b>	Panther
<b>Methode*</b>	TMA
<b>Koppeling</b>	Ja

\*Invullen wat van toepassing is

### Doel

Het verifiëren van de Aptima SARS-CoV-2 Assay van Hologic op de Panther. Deze test wordt gebruikt naast de InGenius COVID-19 test en de GeneXpert SARS-CoV-2 test.

### Achtergrond

In de regio Wuhan in China startte in december 2019 een uitbraak van een nieuw Coronavirus, SARS-CoV-2. Het virus veroorzaakt koorts en (soms ernstige) luchtwegklachten. De ziekte wordt COVID-19 genoemd. Al snel werd de sequentie van het virus bekend<sup>1</sup> en er werd een in-house assay ontwikkeld mede door Nederlandse onderzoekers<sup>2</sup>. De test op de E en RdRp genen draaien in verschillende laboratoria. Sinds begin april 2020 hebben wij de GeneFinder COVID-19 PLUS assay op de InGenius van EliTech en sinds begin mei 2020 de SARS-CoV-2 test op de GeneXpert. Het is echter lastig om aan genoeg reagentia, consumables en cartridges te komen. Hierdoor is er behoefte aan een derde test.

De Aptima SARS-CoV-2 Assay detecteert SARS-CoV-2 in swabs<sup>3</sup>. 500 µl monster wordt gepipetteerd in een Panther Fusion Specimen Lysis buis. De test omvat drie stappen: target capture, transcriptie gemedieerde amplificatie (TMA) en hybridisatie ("dual kinetic assay"). Er wordt gebruikt gemaakt van een interne controle (IC). Deze toont een juiste isolatie en amplificatieprocedure aan. De Aptima SARS-CoV-2 assay amplificeert en detecteert twee geconserveerde gebieden van het ORF1ab-gen in dezelfde reactie. Detectie gebeurt middelst chemiluminescerende probes met een "glower"/langzame kinetiek (SARS-CoV-2) en een "flasher"/snelle kinetiek (IC). Resultaten zijn afhankelijk van de totale relatieve lichteenheden (RLU) en de kinetiek. Er zijn geen studies gepubliceerd over de assay. De analytische gevoeligheid is, volgens de fabrikant, 0.01 TCID<sub>50</sub>/ml /mL monster.

### Eisen

De Aptima SARS-CoV-2 Assay is gevalideerd op eSwabs en VTM. Wij gaan ook sputa en BAL testen en zullen een ook hierop een snelle verificatie doen. Verder is het de bedoeling dat we speeksel gaan testen voor de GGD, omdat dat materiaal makkelijker is om af te nemen bij kinderen. Voor deze verificatie wordt deels gewerkt volgens de Cepheid richtlijnen voor de verificatie van een kwalitatieve assay<sup>4</sup>. In de validatie wordt gekeken naar de Aptima test in vergelijking met de GeneFinder COVID-19 PLUS assay op de InGenius. Als er niet genoeg materialen zijn, dan wordt er vergeleken met de GeneXpert. Er worden 2 onderdelen getoetst in de validatie. De eisen voor de verschillende onderdelen:

## Afdeling Medische Microbiologie

Bepalen meetnauwkeurigheid: 3 sterk positieve, 3 zwak positieve en 3 negatieve eSwabs en sputa en 1 sterk en 1 zwak positieve BAL worden getest en de resultaten worden vergeleken met de GeneFinder COVID-19 PLUS assay. Verder wordt er hoog positief materiaal gespiked in VTM in 3 verschillende concentraties. Positieve materialen met een Ct-waarde van <35 moeten worden bevestigd. De negatieve materialen moeten negatief zijn. De monsters worden op allebei apparaten getest (Panther en Panther Fusion) en de resultaten moeten overeenkomen. Bij discrepanties wordt de GeneXpert (of InGenius) ingezet, als er nog genoeg materiaal is.

Verder werd er 3 proficiency panels door het RIVM rondgestuurd. De specificiteitspanel bevat 10 monsters en de sensitiviteitspanel 7 monsters. De speekselpanel bestaat uit 6 monsters. De monsters moeten gescoord worden volgens de criteria van het RIVM. De panels worden op een van de apparaten getest.

### Plan van aanpak/ methode

1. Opzoeken van klinische materialen (eSwabs)
2. Materialen uit de vriezer halen
3. Klinisch materiaal spiken in VTM
4. Materialen testen volgens de procedure van de leverancier
5. Resultaten verwerken en vergelijken met initiële resultaten
6. Proficiency panels RIVM testen
7. Resultaten bespreken met MMM/AMa

### Testmateriaal, benodigdheden, reagentia

Reagentia nodig:

Aptima SARS-CoV-2 Assay Kit  
Panther Fusion Specimen Lysis Buizen

Proficiency panels (RIVM): Specificiteitspanel (10 monsters) en sensitiviteitspanel (7 monsters)

Patiëntenmaterialen, met Ct-waarden in de InGenius voor RdRp, N en E (standaard) of in de GeneXpert voor N2 en E (apart genoemd)

Swabs (500 µl in sample lysis tube):

#### Zwak positieve eSwabs

20V\_614632 (27.17 28.48 30.23)  
20V\_614429 (24.50 25.08 25.39)  
20V\_613370 (31.67 30.65 35.89)

#### Sterk positieve eSwabs

20V\_614646 (18.48 19.20 18.63)  
20V\_614443 (20.44 22.45 22.25)  
20V\_614556 (22.50 23.65 23.97)

#### Negatieve eSwabs

20V\_614627  
20V\_614628  
20V\_614629

Sputa (1:5 verdunnen in PBS en beadbeaten. Daarna 500 µl in sample lysis tube). Er waren niet genoeg sterk positieve sputa. Daarom werden er extra zwak positieve sputa getest.

#### Zwak positieve sputa

20V\_614400 (29.09 28.85 33.71)  
20V\_614580 (0.00 35.48 0.00)  
20V\_614620 (0.00 31.53 36.05)  
20V\_614848 (N2 28.6 E 26.1)  
20V\_615272 (N2 30.7 E 30.1)



## Afdeling Medische Microbiologie

### Sterk positieve sputa

20V\_614663 (22.12 21.98 21.58)

### Negatieve Sputa

20V\_614625

20V\_614664

20V\_615939

20V\_615955

### Zwak positieve BAL

20V\_614176 (0.00 32.18 0.00)

### Sterk positieve BAL

20V\_614223 (24.83 24.44 25.47)

Spiken van sterk positief eSwab: 1:10, 1:100 en 1:1000 (in stappen van 1:10) verdunnen in VTM

### Sterk positief eSwab

20V\_616466 (N2 19,3 E 17,2)

## Rapportage van resultaten

Helaas waren er niet genoeg sputa beschikbaar tijdens de validatie. Er wordt vooral getest op keel/neus swabs in ons ziekenhuis. Wij zullen de materialen testen die we op dit moment hebben en later wat meer sputa verzamelen.

### Resultaten van het testen van klinische materialen, eerste set

De materialen werden zowel op de Panther als op de Panther Fusion getest. Dit om de uitwisselbaarheid van de apparaten te garanderen.

Monsternummer	Materiaal	InGenius			Panther		Panther Fusion	
		RdRp	N	E	RLU	Interpretatie	RLU	Interpretatie
20V_614632	Swab zwak pos	27,17	28,48	30,23	1151	Positief	1257	Positief
20V_614429	Swab zwak pos	24,5	25,08	25,39	1113	Positief	1245	Positief
20V_613370	Swab zwak pos	31,67	30,65	35,89	1122	Positief	1272	Positief
20V_614646	Swab sterk pos	18,48	19,2	18,63	1147	Positief	1288	Positief
20V_614443	Swab sterk pos	20,44	22,45	22,25	1100	Positief	1226	Positief
20V_614556	Swab sterk pos	22,5	23,65	23,97	1151	Positief	1296	Positief
20V_614627	Swab neg	0	0	0	319	Negatief	382	Negatief
20V_614628	Swab neg	0	0	0	310	Negatief	384	Negatief
20V_614629	Swab neg	0	0	0	318	Negatief	393	Negatief
20V_614400	Sputum zwak pos	29,09	28,85	33,71	1119	Positief	1240	Positief
20V_614580	Sputum zwak pos	0	35,48	0	381	<b>Negatief</b>	744	Positief
20V_614620	Sputum zwak pos	0	31,53	36,05	1092	Positief	1238	Positief
20V_614663	Sputum sterk pos	22,12	21,98	21,58	1110	Positief	1220	Positief
20V_614625	Sputum neg	0	0	0	324	Negatief	386	Negatief
20V_614664	Sputum neg	0	0	0	305	Negatief	381	Negatief
20V_614176	BAL zwak pos	0	32,18	0	1066	Positief	1252	Positief
20V_614223	BAL sterk pos	24,83	24,44	25,47	1168	Positief	1296	Positief

De Panther mist een zwak positief sputum. Deze is wel positief in de Panther Fusion. Het gaat om een monster met een hoge Ct-waarde in de InGenius (>35 in de N-PCR, E- en RdRp-PCR negatief)). Het monster bevindt zich waarschijnlijk op de detectiegrens van de test. De RLU-waarden zijn in het algemeen hoger in de Panther Fusion. Mogelijk komt dit door het feit dat er 2 verschillende kits werden gebruikt. Er zijn geen invalids. Sputa en BAL zijn niet gevalideerd door Hologic, maar geven in onze handen geen invalids.

## Afdeling Medische Microbiologie

### Resultaten van het testen van klinische materialen, tweede set

Er werden nog 4 sputa getest, 2 zwak positieven (er waren geen sterk positieven beschikbaar) en 2 negatieven. Die werden een dag eerder getest op de Panther Fusion dan op de Panther. 3 van de materialen waren eerder in de GeneXpert getest, en 1 materiaal in de InGenius.

Monsternummer	Materiaal	GeneXpert/InGenius			Panther		Panther Fusion	
		RdRp	N(2)	E	RLU	Interpretatie	RLU	Interpretatie
20V_614848	Sputum zwak pos	nvt	28,6	26,1	1092	Positief	1189	Positief
20V_615272	Sputum zwak pos	nvt	30,7	30,1	1033	Positief	1158	Positief
20V_615939	Sputum neg	0	0	0	261	Negatief	299	Negatief
20V_615956	Sputum neg	nvt	0	0	271	Negatief	299	Negatief

De resultaten met de Panthers komen overeen met de InGenius/GeneXpert.

### Resultaten van de sensitiviteitspanel van het RIVM

De panel bestaat uit een verdunningsreeks van geïnactiveerd SARS-CoV-2 virus in, op het moment van testen, onbekende volgorde. Het is de bedoeling dat laboratoria de verdunning  $10^{-7}$  detecteren. Dit komt overeen met 82,6 kopieën RdRP target vastgesteld met dPCR/ml monster (RIVM). De verdunning  $10^{-8}$  is educatief.

Sensitiviteit					
Monster	Panther	Interpretatie	Panther F	Interpretatie	Conclusie
1. 10-6	1147	Positief	1280	Positief	Positief
2. 10-10	336	Negatief	410	Negatief	Negatief
3. 10-4	1149	Positief	1306	Positief	Positief
4. 10-8 <sup>1</sup>	318	<b>Negatief</b>	787	Positief	Positief
5. 10-7	871	Positief	1276	Positief	Positief
6. 10-9	320	Negatief	414	Negatief	Negatief
7. 10-5	1204	Positief	1277	Positief	Positief

<sup>1</sup> Voorlopige indicatie: educatief monster

Wij detecteren alle verdunningen t/m  $10^{-7}$ . De Panther Fusion detecteert ook de educatieve verdunning  $10^{-8}$ . Ook hier zien we dat de RLU's hoger zijn op de Panther Fusion.

### Resultaten van de specificiteitspanel van het RIVM

De panel bestaat uit 10 gesimuleerde klinische monsters waarin levende humane respiratoire virussen, hitte geïnactiveerd SARS-CoV-2 virus of zonder virus.

Specificiteit					
Monster	Panther	Interpretatie	Panther F	Interpretatie	Conclusie
1. InfA (H3N2)	315	Negatief	419	Negatief	Negatief
2. SARS-CoV-2 (d2) <sup>1</sup>	994	Positief	1270	Positief	Positief
3. CoV-OC43	325	Negatief	403	Negatief	Negatief
4. SARS-CoV-2 (d3) <sup>2</sup>	571	Positief	420	<b>Negatief</b>	Positief
5. Rhinovirus A16	310	Negatief	403	Negatief	Negatief
6. CoV-229E	318	Negatief	413	Negatief	Negatief
7. Geen virus	314	Negatief	392	Negatief	Negatief
8. CoV-NL63	321	Negatief	409	Negatief	Negatief
9. InfB-Victoria	309	Negatief	398	Negatief	Negatief
10. SARS-CoV-2 (d1)	1171	Positief	1298	Positief	Positief

<sup>1</sup> d1, d2 en d3 geven aan dat d2 een 1:100 doorverdunding is van d1 en d3 een 1:10 doorverdunding van d2

<sup>2</sup> Voorlopige indicatie: educatief monster



## Afdeling Medische Microbiologie

De Panther Fusion mist een educatief monster. De Panther detecteert hem wel. De RLU's verschillen niet veel van elkaar, dus dit monster bevindt zich op de detectiegrens van de test. Verder zijn de RLU's wederom ietsje hoger in de Panther Fusion.

### Testen van VTM medium en speeksels

Wij gaan testen voor de GGD. Hiervoor wordt er geen eSwabs gebruikt, maar virus transport medium (VTM). Het Erasmus MC test VTM op de Panther. De test is ook hierop gevalideerd. Daarom zullen we een snelle test uitvoeren om dit medium te verifiëren. We hebben geen patiënten materialen en zullen patiënten materiaal spiken in VTM. Het materiaal werd 1:10, 1:100 en 1:1000 verdund in VTM.

Monsternummer	Verdunning	GeneXpert*		Panther		Panther Fusion	
		N2	E	RLU	Interpretatie	RLU	Interpretatie
20V_616466	1:10	22,6	20,5	1038	Positief	1152	Positief
20V_616466	1:100	25,9	23,8	1048	Positief	1167	Positief
20V_616466	1:1000	29,2	27,1	1064	Positief	1175	Positief
VTM	nvt	nvt	nvt	225	Negatief	290	Negatief

\*Theoretisch Ct-waarde na verdunning

Er was geen remming en de Panthers detecteren alle positieve verdunningen.

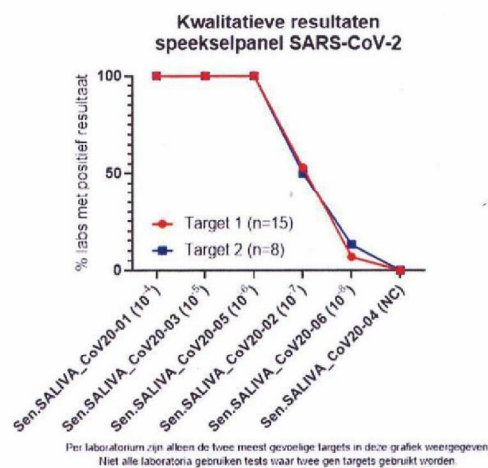
### Resultaten van het testen van de speekselpanel van het RIVM

De panel bestaat uit een verdunningsreeks van geïnactiveerd SARS-CoV-2 virus in, op het moment van testen, onbekende volgorde.

Monster	Panther		Panther Fusion		Hertest Panther Fusion	
	Uitslag	RLU	Uitslag	RLU	Uitslag	RLU
1. 10-4	Positief	1027	Positief	1095		
2. 10-7	Positief	580	Negatief	320	Positief	984
3. 10-5	Positief	996	Positief	1131		
4. Geen virus	Negatief	219	Negatief	283		
5. 10-6	Positief	806	Positief	1111		
6. 10-8 <sup>1</sup>	Negatief	224	Negatief	282		

<sup>1</sup> Educatief monster

De Panthers missen het educatieve monster. Verder mist de Panther Fusion 1x de verdunning 10-7. 50% van de laboratoria missen dit monster (zie beneden). In het algemeen zijn de RLU's hoger in de Panther Fusion.



## Afdeling Medische Microbiologie

### Addendum:

Het VTM-medium die we in gedachten hadden voor het testen van GGD-monsters blijkt toch niet leverbaar. De buizen zijn gevuld met 3 ml Gly-medium. Dit medium wordt getest op dezelfde manier als het VTM-medium, door een hoog positief monster 1:10, 1:100 en 1:1000 te verdunnen in medium, en testen zowel op de Panther als de Panther Fusion. Ook medium zonder patiëntenmateriaal wordt getest. Het volgende monster wordt getest:

20V\_616664 (N2 20,1 E 18,1)

Monsternummer	Verdunning	GeneXpert*		Panther		Panther Fusion	
		N2	E	RLU	Interpretatie	RLU	Interpretatie
20V_616664	1:10	23,4	21,4	1198	Positief	1222	Positief
20V_616664	1:100	26,7	24,7	1193	Positief	1205	Positief
20V_616664	1:1000	30	28	1149	Positief	1199	Positief
GLY	nvt	nvt	nvt	312	Negatief	312	Negatief

\*Theoretisch Ct-waarde na verdunning

De Panthers detecteren alle positieve verdunningen. Ook dit medium is geschikt.

### Evaluatie resultaten en vervolgstappen

1. De Aptima-test is even gevoelig als de InGenius of GeneXpert. De test is geschikt voor eSwabs, VTM, GLY, sputa, BAL en speeksel.
2. Wij scoren goed in alle RIVM-panelen.

### Conclusie

De test voldoet aan alle eisen.

### Referenties

- 1) Tan et al. 2020. A Novel Coronavirus Genome Identified in a Cluster of Pneumonia Cases — Wuhan, China 2019–2020. China CDC Weekly 2: 61-62.
- 2) Corman et al. 2020. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. Eurosurveillance 22 Jan.
- 3) Package insert Aptima SARS-CoV-2 Assay.
- 4) Verification guide "How should I implement a new GeneXpert assay", Cepheid

### Bijlagen

Onderdeel	Datum	(Senior) analist	MMM'er
Verificatierapport	27-7-2020		5.1.2e

### Akkoord rapport:

## Afdeling Medische Microbiologie



Addendum 1: verificatie UTM-medium voor Aptima SARS-CoV-2 assay op de Panther

### Doel:

Sinds juni 2020 wordt er Covid-diagnostiek uitgevoerd op de Panthers met de Aptima SARS-CoV-2 assay. De test is door ons geverifieerd op verschillende materialen. Het doel van dit addendum is om de test te verifiëren op een nieuw UTM-medium.

### Plan en eisen:

Het Gly-medium die we gebruiken het testen van GGD-monsters blijkt niet meer leverbaar. De buizen zijn nu gevuld met 3 ml UTM-medium, te bestellen via het Landelijk Consortium Hulpmiddelen. Dit medium wordt getest door een hoog positief monster 1:10, 1:100 en 1:1000 te verdunnen in medium, en testen. Ook medium zonder patiënten materiaal wordt getest. Het volgende monster wordt getest:

21V\_611298, Ct-waarde 20,8 in de GeneXpert

### Resultaten (theoretische Ct-waarden GeneXpert en RLU's Panther):

De monsters werden getest op de Panther+

COVID uit UTM medium

Monsternummer	Verdunning	GeneXpert	Panther	
		Ct-waarde*	RLU	Interpretatie
21V_611298	1:10	24,0	1251	Positief
21V_611298	1:100	27,3	1258	Positief
21V_611298	1:1000	30,6	1263	Positief
UTM	nvt	nvt	302	Negatief

\* Theoretisch na verdunning

Alle verdunningen werden gedetecteerd. De blanco was negatief.

### Conclusie:

Het UTM-medium kan gebruikt worden op de Panthers.

5.1.2e

16-3-21

16-5-21



## Addendum 2: correctie sensitiviteit Aptima SARS-CoV-2 assay op de Panther

### Achtergrond:

Sinds juni 2020 wordt er Covid-diagnostiek uitgevoerd op de Panthers met de Aptima SARS-CoV-2 assay. De test is door ons geverifieerd op verschillende materialen. Toen werd de sensitiviteit berekend met behulp van een sensitiviteitspanel van het RIVM. In mei 2021 heeft het RIVM een correctie rondgestuurd met aangepaste concentraties na aanleiding van een fout die ze hadden gemaakt in het berekenen van de concentraties SARS-CoV-2 in hun panels. Als gevolg hiervan hebben we opnieuw de sensitiviteit van de test berekend.

### Acties:

Voor de verificatie van de Panther-test hebben wij gebruik gemaakt van de sensitiviteits- en specificiteitspanels ronde 4b. De conclusie van ons was toen dat de detectielimiet van onze test 82,6 kopieën/ml RdRP target was. Dit klopt echter niet. In het rapport dat het RIVM heeft rondgestuurd staat niet welke controle voor de panel 4b was gebruikt. Daarom is er contact geweest met het RIVM en wij hebben per mail de volgende concentraties doorgekregen:

Panel coding	Dilution runcontrol	Number of dPCR copies RdRP target per ml panel specimen	Ct. average (amount of positive tests of 3 replicates)		
			E-gene Ct	RdRP gene Sarbeco probe Ct	RdRP-gene SARS-CoV-2 probe Ct
Sen. Serie-03	10-4	1.40*10 <sup>6</sup>	23.12 (3)	29.61 (3)	25.53 (3)
Sen. Serie-07	10-5	1.40*10 <sup>5</sup>	28.01 (3)	33.76 (3)	30.33 (3)
Sen. Serie-01	10-6	1.40*10 <sup>4</sup>	30.72 (3)	37.09 (3)	32.76 (3)
Sen. Serie-05	10-7	1.40*10 <sup>3</sup>	33.47 (3)	38.00 (2)	35.19 (3)
Sen. Serie-04	10-8	1.40*10 <sup>2</sup>	33.95 (2)	40.95 (1)	35.15 (2)
Sen. Serie-06	10-9	1.40*10 <sup>1</sup>	Neg	Neg	Neg
Sen. Serie-02	10-10	1.40	Neg	Neg	Neg

Wij detecteren de verdunning 10<sup>-7</sup> met allebei Panthers, zowel in de sensitiviteits- als de specificiteitspanel. De concentratie van de verdunning is 1,4 x 10<sup>3</sup> kopieën/ml.

### Conclusie

De detectielimiet van onze test is 1,4 x 10<sup>3</sup> c/ml.



## Afdeling Medische Microbiologie



### Addendum 3: LOD Aptima SARS-CoV-2 assay op de Panther

#### Achtergrond:

Sinds juni 2020 wordt er Covid-diagnostiek uitgevoerd op de Panthers met de Aptima SARS-CoV-2 assay. De test is door ons geverifieerd op verschillende materialen. Toen werd de sensitiviteit berekend met behulp van een sensitiviteitspaneel van het RIVM. In mei 2021 heeft het RIVM een correctie rondgestuurd met aangepaste concentraties naar aanleiding van een fout die ze hadden gemaakt in het berekenen van de concentraties SARS-CoV-2 in hun panels. Als gevolg hiervan hebben we opnieuw de sensitiviteit van de test berekend en vonden wij een sensitiviteit van  $1,4 \times 10^3$  kopieën/ml (Addendum 2). Echter, dit hebben we gevonden nadat wij een beperkte reeks van 1:10 verdunningen die we 2 keer hebben getest, en hadden wij als criterium 100% detectie. Dit is niet helemaal correct. De definitie van LOD (limit of detection) is de concentratie die wordt gedetecteerd in 95% van de replica's<sup>1</sup>. Hiervoor dient men in meervoud te testen.

#### Opzet

Wij hebben voor de berekening van LOD gebruik gemaakt van een getelde virus stock van het RIVM. Het monster hCoV-19/Netherlands/UT-RIVM-12844/2021 (Pangolineage B.1.1.7) van de SARS-CoV-2 variant Panel 2 werd in stappen van 1:2 verdund in Gly-medium tot verschillende concentraties RdRp-gen. De concentraties zaten dicht bij de eerder bepaalde detectiegrens. Alle concentraties werden in 10- of 20-voud getest op dezelfde dag.

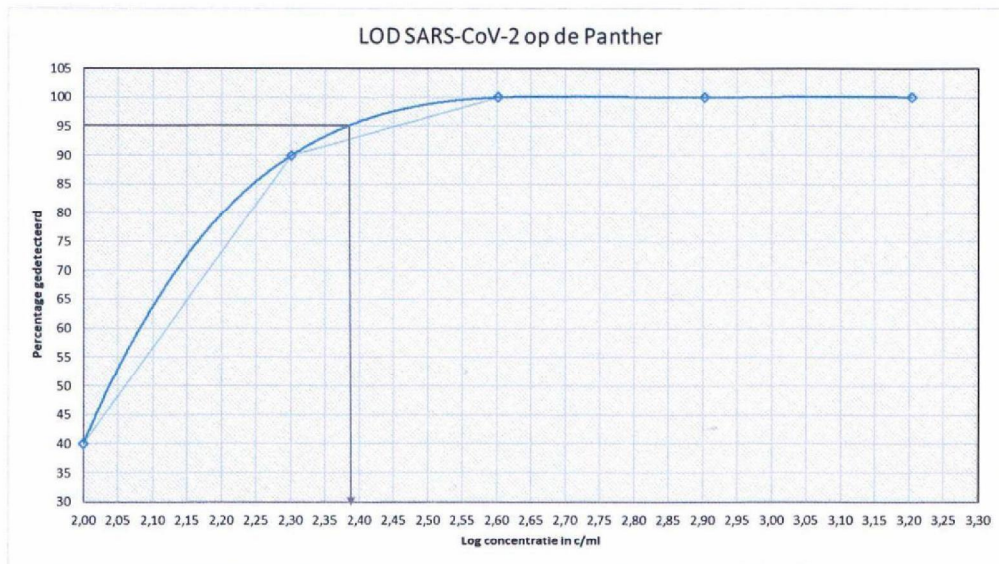
#### Resultaten

De resultaten waren als volgt:

Log conc	Signaal ratio	Percentage
3,20	10/10	100
2,90	10/10	100
2,60	10/10	100
2,30	18/20	90
2,00	4/10	40

Vervolgens werd de LOD uitgerekend als concentratie die in 95% van de replica's werd gedetecteerd met behulp van een trendlijn in Excel. Aflezend van de trendlijn is de log concentratie van 95% detectie = 2,38 =  $2 \times 10^2$  c/ml.

## Afdeling Medische Microbiologie

**Conclusie**

De detectielimiet van onze test is  $2 \times 10^2$  c/ml.

**Literatuur**

1. P. Kralik, and M. Ricchi. 2017. A Basic Guide to Real Time PCR in Microbial Diagnostics: Definitions, Parameters, and Everything. *Frontiers in Microbiology*.  
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00108>

30-8-2021

5.1.2e