

Inclusief Addendum.

Afdeling Medische Microbiologie



Verificatie rapport

Titel	GeneFinder COVID-19 PLUS InGenius
Aanvrager	5.1.2e
Uitvoerder	
Datum	

Validatie*	
Verificatie*	Ja

Apparaat*	InGenius
Methode*	Real-time PCR
Koppeling	N.v.t.

*Invullen wat van toepassing is

Doel

Het verifiëren van de GeneFinder COVID-19 PLUS assay op de InGenius.

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 bekend¹ en er werd een in-house assay ontwikkeld mede door Nederlandse onderzoekers². De test op de E en RdRp genen draaien in verschillende laboratoria.

De GeneFinder COVID-19 PLUS assay³ is een multiplex realtime PCR (RT-PCR) voor de kwalitatieve detectie van SARS-CoV-2. De primers en probes zijn min of meer dezelfde als in Corman et al². De test detecteert de genen E, RdRp en N. De assay kan gebruikt worden in combinatie met verschillende extractie/PCR platforms, o.a. de ELITE InGenius platform. De test omvat de volgende stappen: monster lysis, zuivering van nucleïnezuur en elutie, en multiplex RT-PCR waarbij gelijktijdig wordt geamplificeerd en gedetecteerd. Het eluaat kan worden opgeslagen en opnieuw gebruikt voor PCR. De volgende kanalen worden gebruikt in de test:

RdRp gen	FAM
E gen	Texas Red
N gen	VIC
Interne controle	Cy5

De interne controle is een PCR op een humaan gen. Dit controleert voor aanwezigheid van humane cellen, en dus het correct afnemen van het materiaal. Er zijn geen studies gepubliceerd over de assay. Volgens de fabrikant is de gevoeligheid 10 kopieën/test.

Eisen

Omdat we weinig klinische materialen hebben om te testen gaan we vooral kijken wat de performance is met de volgende materialen van het RIVM: een verdunningsreeks van RNA van SARS-CoV-1 en SARS-CoV-2, en een proficiency panel. De PCR's op het N-gen en het Rd/Rp-gen zijn specifiek voor SARS-CoV-2. De E-gen PCR zal zowel SARS-CoV-1 als SARS-CoV-2 detecteren. Het advies vanuit het RIVM is dat beide runcontroles tot de verdunning van 10⁻⁴ meetbaar zijn. Voor SARS-CoV-1 geldt dat de E-gen PCR deze verdunning moet detecteren. Voor SARS-CoV-2 moet een van de PCR's de verdunning 10⁻⁴ detecteren. In principe moeten we alle materialen van de proficiency panel goed hebben.



Afdeling Medische Microbiologie

De klinische monsters worden gebruikt voor de volgende testen:

Bepalen precisie = Interrun variatie: Een sterk positief en een zwak positief monster wordt getest in 3 verschillende runs. De gevonden Ct-waarden moeten alle binnen 2 Ct-waarden vallen.

Bepalen meetnauwkeurigheid: 3 sterk positieve, 3 zwak positieve en 3 negatieve monsters worden getest en de resultaten worden vergeleken met de in-house test van het LUMC. De negatieve monster moeten negatief zijn. Hier kunnen we geen verdere eisen stellen omdat het LUMC een andere swab van dezelfde patiënt heeft getest. LUMC heeft een keel/neus swab getest en wij testen een keel swab. Het is bekend dat de keel swabs minder gevoelig zijn in de test dan keel/neus swabs. We nemen de resultaten ter kennis.

Wij hanteren een Ct-grenswaarde van 25 voor sterk resp zwak positief. Echter, dit is gebaseerd op wat het LUMC heeft getest op een andere swab van dezelfde patiënt. De test van het LUMC heeft 2 targets: Het E-gen en het RdRp-gen.

Plan van aanpak/ methode

- 1) Opzoeken van klinische materialen (eSwabs)
- 2) Materialen uit de vriezer halen
- 3) Testen verdunningsreeksen van SARS-CoV-1 en SARS-CoV-2 RNA
- 4) Testen van klinische materialen
- 5) Resultaten bespreken met MMM/AMa

Testmateriaal, benodigheden, reagentia

Reagentia nodig:
GeneFinder COVID-19 PLUS RealAmp kit
ELITE InGenius extractie

Proficiency panel met nagebootste patiënten materialen met verschillende virussen (RIVM)

RNA van SARS CoV-1 en SARS CoV-2 (RIVM), verdunningsreeksen

Patiëntenmaterialen, keel swabs:

Zwak positieven

20V_612340 (Ct-waarden 28.8 en 30.7) Ook voor precisie
20V_612497 (Ct-waarden 30.1 en 32.3)
20V_612397 (Ct-waarden 31.0 en 0)
20V_612219 (Ct-waarden 28.0 en 29.9)

Sterk positieven

20V_612305 (Ct-waarden 12.6 en 15.1) Ook voor precisie
20V_612373 (Ct-waarden 18.9 en 21.5)
20V_612435 (Ct-waarden 24.5 en 26.2)
20V_611949 (Ct-waarden 21.0 en 23.4)

Negatieven

20V_612332
20V_612354
20V_612333

Rapportage van resultaten

Wij hebben de inactivatie van het virus op 2 verschillende manieren uitgevoerd.

- 1) 200 µl plus 150 µl lysis buffer (Nuclisens lysis buffer BioMerieux)
- 2) 200 µl hitte inactivatie 60°C 15 min.

Resultaten van de RIVM proficiency panel:

Afdeling Medische Microbiologie

	200 µl + 150 µl lysisbuffer					200 µl hitteinactivatie				
	RdRp	N	E	IC	Interpretatie	RdRp	N	E	IC	Interpretatie
RIVM 1 CoV 229E	0	0	0	0	Invalid	0	0	0	0	Invalid
RIVM 2 InfA (A3N2)	0	0	0	30.52	Negatief	0	0	0	30.29	Negatief
RIVM 3 SARS-CoV-2	28.03	25.85	25.13	0	Positief	28.30	25.62	25.10	0	Positief
RIVM 4 CoV NL63	0	0	0	0	Invalid	0	0	0	0	Invalid
RIVM 5 Rhino A16	0	0	0	30.28	Negatief	0	0	0	30.10	Negatief
RIVM 6 SARS CoV-1	0	0	36.50	0	Beta-Corona	0	0	0*	0	Invalid
RIVM 7 geen virus	0	0	0	0	Invalid	0	0	0	0	Invalid
RIVM 8 CoV-OC43	0	0	0	0	Invalid	0	0	0	0	Invalid
RIVM 9 InfB/Victoria	0	0	0	30.25	Negatief	0	0	0	30.29	Negatief
RIVM 10 SARS CoV-1	0	0	31.15	0	Beta-Corona	0	36.83	31.39	0	Positief/H

* E gen positief, zwak signaal

Er is weinig verschil tussen inactivatie met lysis buffer en hitte inactivatie. De E en de N PCR's zijn gevoeliger dan de RdRp PCR. Het monster met SARS-CoV-2 wordt keurig gedetecteerd. Het sterk positieve SARS-CoV-1 monster ook. In de reeks met hitte inactivatie is er een fout positieve N PCR. Volgens de test algoritme van de kit zouden we dit monster moeten herhalen. Dit is ook gedaan, maar het materiaal was toen helemaal negatief. Mogelijk door slechte isolatie (geen cellen in het materiaal), of door het effect van een extra vries-dooi stap. Het zwak positieve SARS-CoV-1 monster wordt ook gedetecteerd, ook is de signaal in de E PCR zwak in de reeks met hitte inactivatie, waardoor de InGenius de curve niet callt. De curve is wel duidelijk te zien. De negatieve materialen zonder interne controle (dus zonder humane cellen) worden door de InGenius als Invalid geïnterpreteerd, maar kunnen hier als Negatief worden beschouwd.

Resultaten proficiency panel, door het RIVM getest:

Tabel 1. Panelsamenstelling en Ct waarden in real-time RT-PCR met Fast-Virus Mastermix na extractie van 200 µl op MagNAPure 96 met total nucleic acid kit small volume, elutie in 50 µl en 5 µl extract per reactie.

Panel codering	Virus	Target specifieke Ct ¹	E-gen	RdRP-gen
EQA_CoV20-01	CoV-229E	30.20	Neg	Neg
EQA_CoV20-02	Inf A(H3N2)	20.89	Neg	Neg
EQA_CoV20-03	SARS-CoV-2	nvt	23.30	25.59 (28.86) ²
EQA_CoV20-04	CoV-NL63	28.08	Neg	Neg
EQA_CoV20-05	Rhinovirus A16	19.85	Neg	Neg
EQA_CoV20-06	SARS-CoV-1 (d2)	nvt	32.28	33.86 ³
EQA_CoV20-07	Geen virus	Neg	Neg	Neg
EQA_CoV20-08	CoV-OC43	29.88	Neg	Neg
EQA_CoV20-09	Inf B/Victoria	25.72	Neg	Neg
EQA_CoV20-10	SARS-CoV-1 (d1)	nvt	28.89	31.04 ³

¹Voor influenzavirus A(H3N2) matrix gen en voor influenzavirus B/Victoria hemagglutinine gen; nvt = niet van toepassing.

²Eerste Ct waarde is voor SARS-CoV-2 specifieke probe; Ct waarde tussen haakjes is voor Sarbeco brede probe.

³SARS-CoV-2 specifieke probe en Sarbeco brede probe gecombineerd.

RIVM haalt lagere Ct-waarden. Dit kan mede worden verklaard door het feit dat zij in 50 µl elueren, en wij in 100 µl. Rekening houdend hiermee is het verschil bij het SARS-CoV-2 1-1.5 Ct-waarden. Bij de SARS-CoV-1 is het verschil in Ct-waarden 1.5-2 rekening houdend met het verschil in elutie volume. Wij scoren alle monsters in deze proficiency panel, met wat hogere Ct-waarden dan het RIVM.

Afdeling Medische Microbiologie

Resultaten van de RNA verdunningsreeksen:

SARS-CoV-1, 2 keer getest:

	25-3-20 run 1				25-3-20 run 2			
	RdRp	N	E	IC	RdRp	N	E	IC
10 ⁻¹ SARS-CoV-1	nvt	nvt	28.14	nvt	nvt	nvt	28.19	nvt
10 ⁻² SARS-CoV-1	nvt	nvt	32.18	nvt	nvt	nvt	31.58	nvt
10 ⁻³ SARS-CoV-1	nvt	nvt	37.13	nvt	nvt	nvt	41.55	nvt
10 ⁻⁴ SARS-CoV-1	nvt	nvt	0	nvt	nvt	nvt	0	nvt
10 ⁻⁵ SARS-CoV-1	nvt	nvt	0	nvt	nvt	nvt	0	nvt
10 ⁻⁶ SARS-CoV-1	nvt	nvt	0	nvt	nvt	nvt	0	nvt
10 ⁻⁷ SARS-CoV-1	nvt	nvt	0	nvt	nvt	nvt	0	nvt

De eerste 2 verdunningen zien er goed uit. Daarna is er een te groot verschil tussen de Ct-waarden, 5 resp. 10 Ct-waarden. Theoretisch zou het ongeveer 3,2 Ct-waarden verschil moeten zijn. Het lijkt erop dat het RNA afbreekt, of dat de test het niet goed doet op zwak positieve materialen.

SARS-CoV-2:

	RdRp	N	E	IC
10 ⁻¹ SARS-CoV-2	26.26	25.20	24.49	nvt
10 ⁻² SARS-CoV-2	31.3	29.75	29.24	nvt
10 ⁻³ SARS-CoV-2	0	34.36	37.60	nvt
10 ⁻⁴ SARS-CoV-2	0	0	0	nvt
10 ⁻⁵ SARS-CoV-2	0	0	0	nvt
10 ⁻⁶ SARS-CoV-2	0	0	0	nvt
10 ⁻⁷ SARS-CoV-2	0	0	0	nvt

Ook hier gaat het niet helemaal goed. Zelfs de eerst en tweede verdunning heeft een te grote verschil in Ct-waarden. De verdunning 10-4 wordt niet gedetecteerd.

Testen klinische monsters

Een aantal klinische monsters werden getest. Dit waren monster die sterk- of zwak positief of negatief waren op het LUMC. LUMC heeft keel-neus combinaties getest, en wij keelmonsters van dezelfde patiënt. 100 µl monster is vopbehandels met 100 µl lysis buffer.

	LUMC (aparte swab)							
	RdRp	N	E	IC	Interpretatie	RdRp	E	
20V_612305 sterk pos	32.47	30.95	30.73	27.42	Positief	15.1	12.6	
20V_612373 sterk pos	0	37.58	0	27.11	Positief/H	21.5	18.9	
20V_612435 sterk pos	0	0	0	27.69	Negatief	26.2	24.5	
20V_612497 zwak pos	0	0	0	29.21	Negatief	32.3	30.1	Onze swab 6 dagen later afgenomen!
20V_612397 zwak pos	0	0	0	28.07	Negatief	0	31.0	
20V_612340 zwak pos	35.50	32.54	32.77	28.25	Positief	30.7	28.8	
20V_612332 neg	0	0	0	29.24	Negatief	0	0	
20V_612354 neg	0	0	0	23.44	Negatief	0	0	
20V_612333 neg	0	0	0	28.87	Negatief	0	0	
20V_611949 sterk pos	0*	33.13*	35.61*	34.41*	Positief/H	23.4	21.0	
20V_612219 zwak pos	0	36.41	0	28.17	Positief/H	29.9	28.0	

*Failed to aspirate specified volume of eluate

Bijna alles is negatief. Bij de positieven zijn de Ct-waarden op het HMC veel hoger dan op het LUMC. Dit komt mogelijk door een vries-dooi stap en/of het feit dat het keel swabs zijn i.p.v. keel/neus combinaties. Verder hadden wij 200 µl monster moeten gebruiken i.p.v. 100 µl. De negatieven zijn negatief, dus het zit goed qua specificiteit.



Afdeling Medische Microbiologie

Testen precisie

Een sterk en een zwak positief monster worden getest in 3 runs, zonder vries-dooi stap. Helaas was het zwak-positieve monster meteen al negatief. Deze hebben we verder niet getest. Het sterk positief monster werd 3 keer getest met 200 µl input + 150 µl lysis buffer en 2 keer met 200 µl input en hitte inactivatie. Dit was om te onderzoeken of hitte inactivatie net zo goed werkt als lysis met buffer.

Precisie	200 µl + 150 µl lysis buffer				200 µl hitte inactivatie			
	RdRp	N	E	IC	RdRp	N	E	IC
20V_612305 26-3	0	32.41	34.64	27.03				
20V_612305 27-3 run 1	0	33.22	34.65	28.11	37.62	33.10	38.19	27.89
20V_612305 27-3 run 2	0	34.58	37.71	27.75	0	35.50	0	27.40

Ook hier zien we dat de RdRp PCR het minst gevoelig is. Het materiaal gaat verder ook achteruit, en het verschil in Ct-waarden is > dan 2 Ct-waarden in de laatste run.

Geen enkele van de eisen werd gehaald in deze validatie. De test voldoet dus niet aan onze eisen.

Dubbeldraaien

Om te onderzoeken hoe we het doen op klinische monsters real-time werd er een weekend dubbelgedraaid met het LUMC. De monsters werden gesplitst en meteen getest op het HMC. De rest werd opgestuurd naar het LUMC:

Monsternummer HMC	Datum test HMC	RdRp	E	N	IC	Conclusie	Datum test LUMC	E	Conclusie	Overeenkomst HMC-LUMC
20V_612898	28-3-2020	N.A.	N.A.	N.A.	25,11	Negatief	28-3-2020		Negatief	Ja
20V_612899	28-3-2020	N.A.	N.A.	N.A.	26,09	Negatief	28-3-2020		Negatief	Ja
20V_612900	28-3-2020	N.A.	N.A.	N.A.	24,17	Negatief	28-3-2020		Negatief	Ja
20V_612901	28-3-2020	19,35	19,79	20,55	22,94	POSITIEF	28-3-2020	11,87	Positief	Vershil ~8 Ct-waarden
20V_612902	28-3-2020	23,06	23,52	24,56	24,74	POSITIEF	28-3-2020	18,47	Positief	Vershil ~5 Ct-waarden
20V_612905	28-3-2020	N.A.	N.A.	37,11	23,93	POSITIEF	29-3-2020	28,68	Positief	Vershil ~9 Ct-waarden
20V_612906	28-3-2020	N.A.	N.A.	N.A.	24,81	Negatief	29-3-2020		Negatief	Ja
20V_612909	28-3-2020	N.A.	N.A.	N.A.	23,68	Negatief	29-3-2020		Negatief	Ja
20V_612911	28-3-2020	N.A.	N.A.	N.A.	23,71	Negatief	29-3-2020		Negatief	Ja
20V_612913	29-3-2020	N.A.	N.A.	N.A.	24,64	Negatief	29-3-2020		Negatief	Ja
20V_612916	29-3-2020	N.A.	N.A.	N.A.	23,47	Negatief	29-3-2020		Negatief	Ja
20V_612917	29-3-2020	N.A.	N.A.	N.A.	22,49	Negatief	29-3-2020		Negatief	Ja
20V_612919	29-3-2020	N.A.	N.A.	N.A.	25,48	Negatief	29-3-2020		Negatief	Ja
20V_612929	29-3-2020	N.A.	N.A.	N.A.	25,07	Negatief	29-3-2020		Negatief	Ja
20V_612930	29-3-2020	N.A.	N.A.	N.A.	23,88	Negatief	29-3-2020		Negatief	Ja
20V_612931	29-3-2020	N.A.	N.A.	N.A.	25,25	Negatief	29-3-2020		Negatief	Ja
20V_612932	29-3-2020	N.A.	N.A.	N.A.	25,38	Negatief	29-3-2020		Negatief	Ja
20V_612933	29-3-2020	28,94	30,45	29,21	22,22	POSITIEF	29-3-2020	23,72	Positief	Vershil ~7 Ct-waarden
20V_612934	29-3-2020	N.A.	N.A.	N.A.	23,49	Negatief	29-3-2020		Negatief	Ja
20V_612935	29-3-2020	N.A.	N.A.	N.A.	27,06	Negatief	29-3-2020		Negatief	Ja
20V_612936	29-3-2020	N.A.	N.A.	N.A.	23,52	Negatief	29-3-2020		Negatief	Ja
20V_612937	29-3-2020	N.A.	N.A.	N.A.	25,33	Negatief	29-3-2020		Negatief	Ja
20V_612938	29-3-2020	N.A.	N.A.	N.A.	25,98	Negatief	30-3-2020		Negatief	Ja
20V_612939	29-3-2020	N.A.	N.A.	N.A.	24,19	Negatief	29-3-2020		Negatief	Ja
20V_612940	29-3-2020	N.A.	N.A.	N.A.	24,11	Negatief	29-3-2020		Negatief	Ja
20V_612908 Sputum	29-3-2020	N.A.	N.A.	N.A.	16,84	Negatief	29-3-2020		Negatief	Ja
20V_612907 Sputum	29-3-2020	N.A.	N.A.	N.A.	22,7	Negatief	29-3-2020		Negatief	Ja
20B_118661 Sputum*	29-3-2020	19,68	17,57	19,16	16,7	POSITIEF			nvt	
20V_612918 Sputum	29-3-2020	N.A.	N.A.	N.A.	25,61	Negatief	29-3-2020		Negatief	Ja
20V_612942	29-3-2020	N.A.	N.A.	N.A.	24,59	Negatief	31-3-2020		Negatief	
20V_612943	29-3-2020	N.A.	N.A.	N.A.	25,68	Negatief	31-3-2020		Negatief	
20V_612944	29-3-2020	N.A.	N.A.	N.A.	24,39	Negatief	30-3-2020		Negatief	Ja

*Bekend positief op sputum 20V_612815

Wij detecteren alle positieve monsters. Echter, het verschil in Ct-waarden is dramatisch, 5-9 Ct-waarden. Een monster die we niet detecteren (alleen N positief met Ct-waarde 37,11) heeft op het LUMC een Ct-waarde van 28,68. Mogelijk missen we alle monsters met een Ct-waarde van >29. Query naar positieve monsters: van 29 positieven hebben 10 materialen een Ct-waarde van >29. Dat is 34,5%. Dat is niet acceptabel.

Afdeling Medische Microbiologie

Dubbel draaien met het Fransiscus Gasthuis & Vlietland (FGV)

Om te onderzoeken of de slechte prestatie van de test aan onze apparaat ligt, of aan de test zelf hebben we alle materialen van één dag verzameld. De materialen zijn in 3en gesplitst en werden allemaal getest op het LUMC. De volgende dag werden de positieve materialen opgestuurd naar het FGV, en ongeveer tegelijk getest daar en bij ons. Wij hebben voor gekozen om ze te testen zowel met of zonder hitte inactivatie (ook zonder lysis buffer).

Monsternummer	Datum test HMC-SFV	Resultaat HMC hitte inactivatie				Resultaat HMC				Resultaat FGV			Resultaat LUMC	
		RdRp	E	N	IC	RdRp	E	N	IC	RdRp	E	N	Datum test LUMC	E
20V_613000	1-4-2020	29,71	31,87	30,13	22,08	25,65	25,17	25,39	20,44	25,6	25,85	25,73	31-3-2020	25,1
20V_613028*	1-4-2020	27,45	28,03	27,26	24,49	24,33	24,2	24,65	24,53	23,87	24,11	24,4	31-3-2020	24,21
20V_613034	1-4-2020	26,05	25,21	26,39	23,3	20,64	20,89	21,51	24,83	21,23	21,38	22,18	31-3-2020	19,36
20V_613035*	1-4-2020	22,56	23,13	24,01	23,36	21,88	22,48	24,01	24,67	21,26	21,59	22,79	31-3-2020	20,71
20V_613038*	1-4-2020	N.A.	N.A.	N.A.	22,55	29,48	30,49	30,58	22,96	29,33	29,83	29,84	31-3-2020	28,86

* < 200 µl beschikbaar op het HMC

Het lijkt erop dat de inactivatie zorgt voor de slechte resultaten. Zonder inactivatie hebben we dezelfde resultaten als het FGV en LUMC. Bij een paar materialen waren de Ct-waarden ietsje hoger, maar dat komt omdat we minder dan 200 µl hadden om te testen.

Dubbel draaien met het RIVM (en gedeeltelijk LUMC)

RIVM geeft toestemming om te starten. Er moet wel een keer een verdunningsreeks getest worden. Die sturen ze opnieuw naar ons. Voor nu: 10 negatieve en 5 positieve monsters opsturen naar het RIVM. We beginnen met een overnachtrun met monsters die ook naar het LUMC gaan (12 monsters). Daarna resterende monsters verzamelen.

In de overnachtrun zijn er 11 negatieve en 1 positief monster. De Ct-waarden van het LUMC werd genoteerd. De eerste run de volgende dag bevat 4 positieve monsters. 10 negatieve en 5 positieve monsters werden opgestuurd naar het RIVM.

Monsternummer	Materiaal	Resultaat HMC			Resultaat LUMC		Resultaat RIVM			
		Datum test HMC	RdRp	E	N	Datum test LUMC	E	RdRp SARS CoV-2	E Sarbeco	RdRp Sarbeco
20V_613087	keel/neus	1-4-2020	N.A.	N.A.	N.A.	1-4-2020	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
20V_613089	keel/neus	1-4-2020	N.A.	N.A.	N.A.	1-4-2020	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
20V_613090	keel/neus	1-4-2020	N.A.	N.A.	N.A.	1-4-2020	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
20V_613092	keel/neus	1-4-2020	N.A.	N.A.	N.A.	1-4-2020	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
20V_613094	keel/neus	1-4-2020	30,31	31,15	29,59	1-4-2020	30,02	31,9	29,5	
20V_613096	keel/neus	1-4-2020	N.A.	N.A.	N.A.	1-4-2020	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
20V_613097	keel/neus	1-4-2020	N.A.	N.A.	N.A.	1-4-2020	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
20V_613098	keel/neus	1-4-2020	N.A.	N.A.	N.A.	1-4-2020	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
20V_613099	keel/neus	1-4-2020	N.A.	N.A.	N.A.	1-4-2020	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
20V_613100	keel/neus	1-4-2020	N.A.	N.A.	N.A.	1-4-2020	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
20V_613103	keel/neus	1-4-2020	N.A.	N.A.	N.A.	1-4-2020	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
20V_613177	keel/neus	2-4-2020	31,76	N.A.	33,44			31,7	30,7	
20V_613181	keel/neus	2-4-2020	24,01	25	25,52			24,5	22,6	
20V_613183	keel/neus	2-4-2020	29,11	31,17	30,22			28,4	26,9	
20V_613184	sputum	2-4-2020	N.A.	N.A.	37,01			N.A.	33,3	

De resultaten komen overeen, ook zijn de Ct-waarden van het RIVM soms ietsje lager. Onze test voldoet aan de eisen van het RIVM.

Evaluatie resultaten en vervolgstappen

1. De test voldeed niet aan onze oorspronkelijke eisen. Wij detecteren niet de 10-4 verdunningen van de SARS CoV-1 en 2 RNA reeksen. Dit komt waarschijnlijk door het feit dat we geen ervaring hebben met RNA werk. Verder voldoet de test niet aan de eisen voor precisie. De test werd echter uitgevoerd met lysis. Later zijn we gestopt met externe lysis omdat dat de resultaten negatief beïnvloedde.
2. Het testen op klinische monsters gaat goed, als we de externe lysis overslaan. Er is geen verschil met het LUMC, FGV of RIVM. Het RIVM geeft ons groen licht om te testen.
3. Wij draaien nu 4 volle runs per dag. Als er tijd is tussendoor zullen we de volgende testen uitvoeren: Verdunningsreeks van SARS-CoV-2 (van het RIVM) en precisie op een sterk- en zwak positief monster. Dit zal worden opgenomen in een addendum.

Afdeling Medische Microbiologie


Conclusie

De test voldoet voorlopig aan de huidige eisen. Later kan er meer getest worden op precisie en gevoeligheid.

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) GeneFinder™ COVID-19 PLUS RealAmp Kit, Instructions for use.

Bijlagen

Onderdeel	Datum	(Senior) analist	Arts-microbioloog/MMM
Verificatierapport	24-4-20		5.1.2e
Akkoord rapport:			

Addendum: verificatie GeneFinder COVID-19 PLUS InGenius

Doel

De GeneFinder COVID-19 PLUS-test op de InGenius wordt gebruikt voor SARS-CoV-2 diagnostiek. De test voldeed niet aan al onze oorspronkelijke eisen. Wij detecteerden niet de 10⁻⁴ verdunningen van de SARS CoV-1 en 2 RNA reeksen. Dit komt waarschijnlijk door het feit dat we geen ervaring hebben met RNA werk. Verder voldeed de test niet aan de eisen voor precisie. De test werd echter uitgevoerd met lysis. Later zijn we gestopt met externe lysis omdat dat de resultaten negatief beïnvloedde. Er was grote behoefte om de test snel in te voeren en daarom hebben we toen voor gekozen om later de testen alsnog uit te voeren en toevoegen als een addendum.

Plan en eisen:

1. Sensitiviteits- en specificiteitspanelen van het RIVM. In dit geval gaat het niet om RNA maar om geïnactiveerd virus.
2. Precisie-test: testen van een sterk en een zwak positief monster in 3 runs. De Ct-waarden moeten alle binnen 2 Ct-waarden vallen

De te testen materialen zijn

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

Eerder geteste klinische materialen (met Ct-waarden RdRp, N en :

Sterk positief eSwab

20V_615771 (19.72, 19.90 en 20.02)

Zwak positief eSwab

20V_615871 (32.06, 31.14 en 29.70)

Resultaten

Sensitiviteitspanel RIVM

Monster	Sensitiviteit				Interpretatie
	RdRp	N	E	IC	
1. 10 ⁻⁶	34,84	32,62	31,59	29,32	Positief
2. 10 ⁻¹⁰	0	0	0	31,06	Negatief
3. 10 ⁻⁴	26,68	25,87	24,06	37,93	Positief
4. 10 ⁻⁸ ¹	0	40,23	0	30,57	Positief
5. 10 ⁻⁷	0	36,56	0*	30,31	Positief
6. 10 ⁻⁹	0	0	0	30,92	Negatief
7. 10 ⁻⁵	28,98	28,36	26,75	30,9	Positief

* Zwak signaal te zien

¹ Voorlopige indicatie: educatief monster.

Wij detecteren alle verdunningen t/m 10⁻⁸. Bij de verdunning 10⁻⁷ is de N PCR positief, en is er ook een signaal te zien in de E PCR, maar dit wordt niet gecalled door het apparaat. De 10⁻⁸ verdunning (educatief monster) is alleen positief in de N PCR.

Specificiteitspanel RIVM

Specificiteit					
Monster	RdRp	N	E	IC	Interpretatie
1. InfA (H3N2)	0	0	0	29,59	Negatief
2. SARS-CoV-2 (d2) ¹	0	38,67	0	29,6	Positief
3. CoV-OC43	0	0	0	31,28	Negatief
4. SARS-CoV-2 (d3) ²	0	0	0	30,09	Negatief
5. Rhinovirus A16	0	0	0	29,44	Negatief
6. CoV-229E	0	0	0	31,42	Negatief
7. Geen virus	0	0	0	31,53	Negatief
8. CoV-NL63	0	0	0	31,54	Negatief
9. InfB-Victoria	0	0	0	26,96	Negatief
10. SARS-CoV-2 (d1)	32,39	30,55	28,92	31,6	Positief

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

² Voorlopige indicatie: educatief monster.

We detecteren alle monsters goed, behalve een educatief monster.

Testen precisie (interrun variatie)

Monster	Run	RdRp	N	E	IC
20V_615771	Run 1	22,13	21,59	19,3	32,3
	Run 2	21,88	21,76	20,16	28,49
	Run 3	22,71	21,98	19,45	N.A.
20V_615871	Run 1	N.A.	32,02	31,09	24,12
	Run 2	36,66	32,1	31,94	24,12
	Run 3	N.A.	34,54	36,12	24,3

De pdf's van de runs 2020-06-24 RUN1, 2 en 3 zijn te vinden onder

5.1.2h

5.1.2h

Niet alle uitslagen vallen binnen de range van 2 Ct. Bij het monster 20V_615871 waren de Ct waarden hoger dan verwacht, vooral in de laatste run. Mogelijk lopen zwak positieve monsters snel achteruit als je ze ontdooit. Het hoog positieve monster voldoet aan de eisen.

Conclusie:

De test voldoet grotendeels aan onze oorspronkelijke eisen. Wij scoren goed bij de sensitiviteits- en specificiteitspanels. De interrun variatie is klein voor het sterk positief monster. Het zwak positief monster voldoet niet aan de eisen. Wel is de test goed, vooral op verse monsters die meteen worden getest en geen vries-dooi stap hebben ondergaan, zoals ook gebeurt in de praktijk. Wij zullen deze test niet meer gebruiken in de diagnostiek omdat we een test nodig hebben die meer monsters aan kan.