

te gebruiken tot 24 uur na 14-07-2021

Titel:	2021-004A Rapport validatie ViRSNiP SARS-CoV2 N501Y varianten
Versie:	2

Algemeen

Publicatiedatum: 18-05-2021

Controledatum: 17-05-2041

Wijzigingen ten opzichte van vorige versie:

Rapport gewijzigd van verificatie naar een validatie.

Algemene gegevens

Nummer: 2021-004A	Titel: Rapport validatie ViRSNiP SARS-CoV2 N501Y
--------------------------	---

	Naam	Functie
Opgesteld door	5.1.2e	5.1.2e
Geverifieerd door	5.1.2e	5.1.2e
	5.1.2e	
	5.1.2e	5.1.2e
Besproken in overleg: VGO en corona overleg		

Samenvatting

In de regio Wuhan in China startte in december 2019 een uitbraak van een nieuw coronavirus, ook wel SARS-CoV-2 genoemd. Het virus kan de ziekte COVID-19 veroorzaken. De meeste patiënten met dit virus hebben koorts en luchtwegklachten. Na verloop van tijd zijn er mutaties ontstaan in het virus. Met behulp van een qPCR met smeltcurve analyse kan onderzocht worden of SARS-CoV2 virussen een variant uit Engeland of Zuid-Afrika zijn met de N501Y mutatie in het spike-proteïne. Deze verificatie toont aan dat deze ViRSNiP SARS-CoV2 N501Y mutatie analyse van TibMolbiol de N501Y mutatie aantoonde in SARS-CoV2 monsters met deze mutatie.

Inleiding

In de regio Wuhan in China startte in december 2019 een uitbraak van een nieuw coronavirus, ook wel SARS-CoV-2 genoemd. Het virus kan de ziekte COVID-19 veroorzaken. De meeste patiënten met dit virus hebben koorts en luchtwegklachten. Na verloop van tijd zijn er mutaties ontstaan in het virus. Deze qPCR met smeltcurve analyse wordt gebruikt om te onderzoeken of een SARS-CoV2 monster een variant uit Engeland of Zuid-Afrika is met de N501Y mutatie in het spike-proteïne.

Uitvoering

1. Targets: Deze zijn overgenomen van de firma.
2. Primers en probes: Deze zijn overgenomen van de firma.
3. Monsters: DNA wordt geïsoleerd uit bekend positieve monsters/stammen en negatieve monsters met de Roche MagNa Pure 96.
4. qPCR: RT qPCR met smeltcurveanalyse wordt ingezet op de LC480 zoals omschreven in de bijsluiters.

te gebruiken tot 24 uur na 14-07-2021

5. Sensitiviteit/specificiteit: Het gehele panels aan monsters/rondzendingen wordt getest en de resultaten van de deze tast wordt vergeleken met de gouden standaard (WGS).
6. Reproduceerbaarheid: Eenzelfde monster wordt op verschillende LC480-II apparaten getest.
7. Detectielimiet (limit of detection/analytische sensitiviteit): Niet van toepassing.
8. Klinische toepasbaarheid: Materialen waarop deze qPCR uitgevoerd kan worden uitgevoerd wordt vastgesteld door testen op verschillende types klinische monsters of door middel van literatuuronderzoek.

Resultaten

1. Targets: Niet van toepassing.
2. Primers en probes: Niet van toepassing.
3. qPCR: In alle SARS-CoV2 monsters die voorheen zijn getest met Ct < 30 is een afleesbare smeltcurve zichtbaar (zie bijlages).
4. Sensitiviteit/specificiteit: SARS-CoV2 N501Y: Vanuit het RIVM en het ErasmusMC hebben we beide een referentie monster gekregen met de N501Y mutatie. Deze komen beide als N501Y uit de analyse (smeltcurveanalyse zie bijlage). SARS-CoV2 klassieke variant: We hebben van 6 klassieke SARS-CoV2 varianten (vastgesteld door whole genome sequencing ErasmusMC) gevonden dat ze niet de N501Y mutatie hebben, maar 501N, de standaard variant (smeltcurveanalyse en WGS rapport zie bijlages). De sensitiviteit was 100% en de specificiteit was 100%.
5. Reproduceerbaarheid: De resultaten van een zelfde DNA isolaat, uitgevoerd op verschillende LC480-II apparaten, gaf dezelfde uitslag (zie N501Y mutaties in tabel onder).

LC: 1	Del 69/70		E484K		N501Y		K417N		V1176F	
monsters	Tm	resultaat	Tm	resultaat	Tm	resultaat	Tm	resultaat	Tm	resultaat
10159	57,35	WT	56,33	484K	61,29	501Y	60,52	417N	54,67	1176V
20300	57,31	WT	52,92	484E	56,05	501N	57,35	417K	54,7	1176V
10706	57,27	WT	56,12	484K	55,98	501N	57,36	417K	57,36	1176F
20637	64,05	del 69/70	52,77	484E	61,22	501Y	57,42	417K	54,77	1176V
10915	57,2	WT	56,06	484K	61,28	501Y	50,81	417T	57,49	1176F
20949	57,34	WT	52,97	484E	52,72	-	57,4	417K	54,73	1176V
20274	64,08	del 69/70	52,96	484E	56,11	501N	57,38	417K	54,72	1176V
11401	57,29	WT	52,97	484E	56,07	501N	57,4	417K	54,72	1176V

LC: KCL	Del 69/70		E484K		N501Y		K417N		V1176F	
monsters	Tm	resultaat	Tm	resultaat	Tm	resultaat	Tm	resultaat	Tm	resultaat
10159	59,07	WT	57,8	484K	62,88	501Y	62,03	417N	56,3	1176V
20300	59,04	WT	54,8	484E	57,71	501N	59,06	417K	56,38	1176V
10706	59,07	WT	57,8	484K	57,76	501N	59,02	417K	59,12	1175F
20637	65,69	del 69/70	54,68	484E	62,79	501Y	59,14	417K	56,36	1176V
10915	58,98	WT	57,94	484K	63,02	501Y	52,82	417T	59,09	1175F
20949	59,07	WT	54,58	484E	54,48	-	58,98	417K	56,26	1176V
20274	65,8	del 69/70	54,7	484E	57,72	501N	58,97	417K	56,23	1176V
11401	59,07	WT	54,68	484E	57,78	501N	58,88	417K	56,19	1176V

6. Detectielimiet (limit of detection/analytische sensitiviteit): Niet van toepassing.
 7. Klinische toepasbaarheid: Materialen waarop deze qPCR uitgevoerd kan worden zijn feces (aangetoond voor deze RNA Master voor Parechovirus) en respiratoire uitstrijken zoals aangetoond in deze validatie.
- Interne controle: Er is geen interne controle getest, aangezien het reeds bekend is dat het monster positief is voor SARS-CoV2. De uitkomst van deze test is in principe positief voor 501Y of positief voor 501N. Indien de test

te gebruiken tot 24 uur na 14-07-2021

negatief is, is het verkeerde monster toegevoegd of is de load te laag om een succesvolle smeltcurve analyse uit te voeren.

Conclusies en aanbevelingen

De conclusie van deze validatie is dat deze RT-qPCR voldoet aan de acceptatiecriteria.

De aanbeveling is dan ook om de ViR SNIP SARS-CoV2 N501Y mutatie analyse in te gaan invoeren.

Risicoanalyse

- 1) Monsterverwisseling. Risicoscore: 4 (accepteren).
- 2) Foutief uitlezen smeltcurve. Risicoscore: 4 (accepteren).

Literatuur

Bijsluiter TibMolbiol ViRSNiP SARS-CoV2 Spike N501Y

Bijlagen

Smeltcurveanalyse SARS-CoV2 monsters 501Y
Smeltcurveanalyse SARS-CoV2 monsters 501N