


Titel: SARS-CoV-2 Sarbeco in house Real time PCR Validatierapport

Vrijgave door kwaliteitsfunctionaris:	
--	--


Wijzigingen ten opzichte van vorige versie:

 <small>MEDISCHE MICROBIOLOGIE BRABANT & ZEELAND</small>	validatierapport Sarbeco / SARS-CoV-2 real time PCR
	Locatie Bravis

Validatierapport

Sarbeco / SARS-CoV-2 real time PCR

	Naam	Functie
Opgesteld door:	5.1.2e	5.1.2e
Verificatie:	5.1.2e	5.1.2e
Verificatie:	5.1.2e - 1.2e	5.1.2e
Autorisator:	5.1.2e	5.1.2e

 <small>MEDISCHE MICROBIOLOGIE BRABANT & ZEELAND</small>	validatierapport Sarbeco / SARS-CoV-2 real time PCR
	Locatie Bravis

1. Inleiding

Sinds dec 2019 is er een nieuw coronavirus, met oorsprong Wuhan China, dat respiratoire klachten (pneumonie, koorts) kan veroorzaken. In het kader van opschalingslaboratorium activiteiten en eigen diagnostiek gaan we twee PCRs opzetten die het E-gen en RdRp gen van Sarbeco virussen (dus SARS CoV én SARS-CoV-2) kunnen detecteren. Voor het RdRp gen is ook een probe beschikbaar in de PCR, dat wel SARS-CoV-2 specifiek kan aantonen. Deze PCRs zijn inmiddels gepubliceerd (*Corman et al. <https://www.eurosurveillance.org/content/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045>*), en aangezien wij dezelfde apparatuur, mastermix en thermocycler profielen gebruiken, is een verificatie in principe voldoende. Daar waar we andere keuzes zullen maken dan de literatuur, zullen we aanvullende testen gaan doen.

Aangezien op dit moment SARS-CoV-2 nog als BSL3 virus ingeschaald is, zullen we alvorens aan onze huidige BSL1 procedures (pre-piro/MP96) te beginnen een extra stap moeten toevoegen. Om het materiaal geschikt te maken voor de diagnostische routine zal een externe (manuele) lysis stap toegevoegd worden. (zie validatie externe lysis respiratoire monsters).

Beoogde afnamematerialen voor deze PCR zijn respiratoire materialen, zoals E-swabs van keel, sputa, neusspoelsels, broncho-alveolaire spoelsels. Beoogde apparatuur is een combinatie van de MagNA Pure96 (large volume protocol met extern gelyeerde samples), PIRO en ABI7500/QS6/LC480.

1.1. Verantwoordelijkheden


Uitvoeren validatie	[redacted]	5.1.2e
Opstellen validatierapport	[redacted]	5.1.2e

1.2. Tijdsplanning

Periode waarin validatie plaatsvindt : Q1 2020

1.3. Definities en afkortingen

(H)CoV	(Humaan) coronavirus
Sarbeco	SARS beta coronavirus
qRT-PCR	Real time reverse transcriptase polymerase chain reaction
IC	Interne controle (PDV)
PDV	Phocine distemper virus
FVMM	Fast virus master mix
QS6	QuantStudio 6
PPC	Positieve PCR controle
PPM	Primer-Probe Mix
MP96	MagNA Pure 96 TNA extractierobot (Roche)
NOC	Negatieve opwerk controle
NPC	Negatieve PCR controle
PIRO	Pipetting Robot

 <small>MEDISCHE MICROBIOLOGIE BRABANT & ZEELAND</small>	validatierapport Sarbeco / SARS-CoV-2 real time PCR
	Locatie Bravis

1.4. Onderzoeksmateriaal

Tabel 1 Overzicht van gebruikte reagentia/kalibratoren/controles

Reagens	Art.nr	Lotnummer	opmerkingen
Fast Virus 1-Step Master Mix	4444434	00729375 (00729375 op ep)	
PPM	nvt (in-house)		
SARS CoV RNA (via RIVM)			
Lysis buffer (Roche)			
Primers/probes (via RIVM)		Batch 1	

Monsters: zie Verificatierapport paragraaf 1.4 en Bijlage 1.

Tabel 2. Overzicht primer/probes

naam ppm	naam (artikel)	Sequence ('5-3')	conc (pmol/rx)*	conc (nM)	specificiteit
ppm RdRp 2019nCoV	RdRp_SARsR-F	GTGARATGGTCATGTGTGGCGG	15	600	pan-Sarbeco
	RdRp_SARsR-P2	FAM-CAGGTGGAACCTCATCAGGAGATGC-BBQ	2,5	100	SARS-CoV-2
	RdRp_SARsR-P1	FAM-CCAGGTGGWACRTCATCMGGTGATGC-BBQ	2,5	100	pan-Sarbeco
	RdRp_SARsR-R	CARATGTTAAASACACTATTAGCATA	20	800	pan-Sarbeco
ppm_E- Sarbeco	E_Sarbeco_F	ACAGGTACGTTAATAGTTAATAGCGT	10	400	pan-Sarbeco
	E_Sarbeco_P1	FAM-ACACTAGCCATCCTTACTGCGCTTCG-BBQ	5	200	pan-Sarbeco
	E_Sarbeco_R	ATATTGCAGCAGTACGCACACA	10	400	pan-Sarbeco

* In een 25ul reactie.

2. Prestatiekenmerken

2.1. Detectie limiet / kwantificatie limiet (aantoonbaarheidsgrens)

Uitvoering:

Er is geen full-virus SARS-CoV-2 referentiemateriaal met bekende virale load voor dit coronavirus beschikbaar. Daarom zal de aantoonbaarheidsgrens gemeten worden met SARS CoV RNA, dat beschikbaar is gesteld door RIVM/EMC. Er zal in duplo een 1log verdunningsreeks tot negatief worden gemaakt, die in de Egen en RdRp PCR op de LC480, ABI7500 én QS6 zal worden gemeten.

Acceptatie criterium:


Er mag niet meer dan 1 verdunning/ 1 log verschil zijn tussen de verschillende real-time apparaten en tussen de twee Sarbeco assays.

Resultaat:

Zie ook logboek, tabblad 2.1 sensitiviteit_detlimit.

De SARS positieve controle is 1 log verdund en kwam bij alle apparaten voor beide targets tot verdunning 10^{-4} , echter alleen bij de LC480 in duplo, bij de 7500 en de QS6 in enkelvoud.

De detectielimiet van 10^{-4} bij beide targets komt overeen met de detectielimiet die wordt gehaald door 7 van de 14 aan de EQA deelnemende opschalings- en centrale labs (de andere 7 labs detecteerden de 10^{-4} verdunning niet (in één of in beide targets). Zie bijlage "RIVM samenvatting resultaten runcontrole en panel met E-gen en RdRp-gen PCR v3 20200224".

	validatierapport Sarbeco / SARS-CoV-2 real time PCR
	Locatie Bravis

Tabel 3 Overzicht trendlijnen

Target	Apparaat	vergelijking	correlatie
RdRp	ABI7500	$y = -3,3305x + 25,777$	$R^2 = 0,9878$
	LC480	$y = -2,767x + 26,601$	$R^2 = 0,9622$
	QS6	$y = -3,0394x + 26,901$	$R^2 = 0,9781$
Egen	ABI7500	$y = -3,273x + 23,392$	$R^2 = 0,9856$
	LC480	$y = -3,268x + 23,06$	$R^2 = 0,9909$
	QS6	$y = -3,6446x + 23,731$	$R^2 = 0,9873$

De gevoeligheid van beide PCRs (RdRp en E gen) gaf geen verschil in te detecteren verdunning op de verschillende apparaten. Echter, de E gen PCR kwam gemiddeld 2.5 Ct eerder op dan de RdRp PCR en had ook een (veel) betere ΔRn (gemiddeld 2.33 t.o.v. 0.93 op de ABI7500) dan RdRp.

Conclusie:

Acceptatiecriteria zijn gehaald. Alle apparatuur is gelijkwaardig om de Egen en RdRp PCR te draaien. E gen als screenings-assay en RdRp als confirmatie-assay.

2.2. **Sensitiviteit, analytisch (incl. interfererende substanties) en diagnostisch**Uitvoering:

1. Analytische sensitiviteit: gezien er geen referentiematerialen beschikbaar zijn om te garanderen dat wel de juiste sensitiviteit gehaald wordt, is er besloten door RIVM om een panel (10 samples, die klinisch respiratoire samples representeren) uit te wisselen binnen de opschalingslabs. Zie Juistheid.
2. Voor de diagnostische sensitiviteit is geen gouden standaard aanwezig (zoals bij bv. serologie/immunofluorescentie/kweek). Er zijn op dit moment ook geen SARS-CoV-2 positieve samples beschikbaar voor deze validatie. Dit kan dus op dit moment niet uitgevoerd worden.
3. Mogelijke interfererende substanties zullen d.m.v. een interne controle (ICcombi) in een losse (externe) interne controle PCR gemonitord worden, gezien we op dit moment geen wijzigingen aan de gepubliceerde PCRs willen maken.

Acceptatie criterium:


1. N.v.t.
2. N.v.t.
3. Zoals bij alle real time PCRs mag de PDV Ct-waarde niet meer dan +/-3SD van de gemiddelde Ct afwijken. Is dit in meer dan 10% van de monsters wel het geval, dan moet er verder onderzoek naar de oorzaak plaatsvinden.

Resultaat:

1. N.v.t.
2. N.v.t.
3. Voorlopig draaien we de PDV met de HMPV PCR mee. Aangezien we verder geen positieve samples hebben, kunnen we dit alleen van het RIVM panel (zie juistheid) meten, waarbij de PDV Ct waarden van alle samples binnen de grenzen vielen.

Conclusie:

Acceptatiecriterium gehaald.

	validatierapport Sarbeco / SARS-CoV-2 real time PCR
	Locatie Bravis

2.3. Specificiteit, analytisch en diagnostisch

Uitvoering:

1. Er zal een *in silico* analyse worden gedaan van alle potentiële primer/probe sets door nucleotide blast uit te voeren op de primers en probes (m.b.v. PrimeReport), en er zullen zo nodig aanpassingen aan de oligosequenties worden gedaan.
2. Analytische specificiteit: er zullen hoog positieve stocks van andere respiratoire microbiologische pathogenen getest worden om aspecificiteit uit te sluiten.
3. Voor de diagnostische specificiteit is geen gouden standaard aanwezig (zoals een bv serologie/immunofluorescentie/kweek), en daarom zal deze geëvalueerd worden door minimaal 50 eluaten van negatieve resp. materialen (geïsoleerd op de MP96) te testen.

Acceptatie criterium:

1. *In silico* analyse: er mogen geen andere pathogenen dan SARS-CoV-2 en SARS-CoV voorkomen in de blast-output, die meer dan 85% homologie hebben met één van de primers / probe. Is dit wel het geval, dan moet specificiteit met experimenten aangetoond worden.
2. Analytische specificiteit: Er mogen geen reacties zijn met andere targets met minder dan Ct15 verschil t.o.v. de targets waarvoor de assay bedoeld/ontworpen is.
3. Verwachting is dat in eluaten uit zomer/winter periode 2019/2020 (tm week 6) allen negatief zijn, gezien er nog geen positieve patiënten in NL zijn gediagnosticeerd en er nog geen transmissie in NL is waargenomen. Positieve eluaten (één van de twee PCRs positief) moeten worden bevestigd door herhaling van PCR op locatie Bravis, en indien bij herhaling positief, opgestuurd/geconfirmeerd door het RIVM/ErasmusMC, indien er genoeg (origineel/eluaat) materiaal beschikbaar is.

Resultaat:


1. *In silico* analyse confirmeert de specificiteit zoals in het artikel van Corman *et al* wordt beschreven, nl. sarbecovirussen worden gedetecteerd en geen andere virussen worden gevonden, die met de PCR worden gedetecteerd (ook niet common coronavirussen en MERS). SARS-CoV wordt wel gedetecteerd, tesamen met een aantal andere bat-SARS-like virussen (zoals verwacht).
2. Er zijn in totaal 22 respiratoire pathogenen getest in de E gen en RdRp PCR, waarbij we geen aspecifieke reacties hebben gevonden.
3. In de tabel hieronder staan de aantallen klinische respiratoire samples, die getest zijn in de E-gen en RdRp PCR. Hierbij zijn geen positieve reacties gevonden.

Tabel 4. Negatieve klinische materialen getest voor specificiteit van SARS-CoV-2 PCRs.

Materiaal type	Egen	RdRp
won	42	36
bal	1	1
bronchiaal	3	2
sputum	6	8
sputum/bronchiaal	1	1
totaal	53	48

Conclusie:

Acceptatie criteria zijn gehaald.

	validatierapport Sarbeco / SARS-CoV-2 real time PCR
	Locatie Bravis

2.4. **Robuustheid**

Uitvoering:

Bij real time PCR reacties zal de robuustheid normaliter geoptimaliseerd worden door primer-matrix (Ct-waarde) en probe-matrix (fluorescentie signaal) experimenten uit te voeren. Echter, gezien deze experimenten al uitgevoerd zijn in het Charité-Berlin laboratorium (zie publicatie), nemen wij deze geoptimaliseerde concentraties over. (zie tabel 2)

Acceptatie criterium:

nvt

Resultaat:

nvt

Conclusie:

Nvt

2.5. **Juistheid / accuraatheid**

Uitvoering:


1. Juistheid zal bepaald worden door (blind) een panel van een referentielab (RIVM) te testen. In dit panel zitten klinische materialen welke gespiked zijn met SARS RNA en andere respiratoire pathogenen. Er zijn verder nog geen andere EQA panels beschikbaar.

Panel van RIVM is m.b.v. twee extractie protocollen (manuele externe lysis+MP96 normale pathogen 500 → 100ul protocol (A), en manuele externe lysis+ MP96 externe lysis protocol 1000 → 100ul (B)) geëxtraheerd en daarna op de LC480 en de ABI7500 getest in de E gen en RdRp assay, om te zien of er verschillen zijn (evt in gevoeligheid oid).

2. Verder zullen er negatieve controles (NOCs/NPCs) mee genomen worden.

Acceptatie criterium:

1. Bij het RIVM panel moet minimaal 80% juist gescoord worden, gezien er nog geen core/educational onderscheid gemaakt wordt. Alle negatieven moeten negatief zijn.
2. Evaluatie van de NOCs/NPCs wordt gedaan, waarbij minimaal 98% negatief moet zijn. Wanneer vals-positieve NOCs worden gevonden, moet geëvalueerd worden wat de oorzaak is (geen primer-dimer).

 MEDISCHE MICROBIOLOGIE BRABANT & ZEELAND	validatierapport Sarbeco / SARS-CoV-2 real time PCR
	Locatie Bravis

Resultaat:

1. Zie bijlage "RIVM samenvatting resultaten runcontrole en panel met E-gen en RdRp-gen PCR v3 20200224".

Het RIVM EQA panel is 100% goed gescoord. Beide extractiemethoden en beide real-time cyclers gaven dezelfde resultaten, nl 3 positieve en 7 negatieve samples in beide SARS-CoV PCRs. Dit is geheel volgens verwachting. PDV lag binnen gestelde 3SD limieten. Tussen protocol A en B zat $Ct_{\text{mediaan (B-A)}}$ -0.6 (range -1.4-1.0) verschil bij de positieve samples.

2. Er zijn bij iedere test NPC/NOCs meegenomen, waarbij er 1x een NPC zw pos was (sensitiviteit experiment), daarna niet meer voorgekomen. Ook reagentia zijn extensief getest en blijken geen signalen te geven.

Conclusie:

1. Acceptatiecriterium (minimaal 80% score in RIVM panel) gehaald. Verschillen tussen de extractieprotocollen (A/B) en de thermocyclers (ABI/7500) zijn verwaarloosbaar klein.
2. Acceptatiecriterium gehaald wat betreft NPC's/NOC's.

2.6. **Precisie / herhaalbaarheid**Uitvoering:

Herhaling van eenzelfde sample (bv PPC) binnen 1 PCR run ≥ 8 datapunten, rond Ct30.

Acceptatie criterium:

%CV(Ct) bij een Ct van rond de 30 moet kleiner zijn dan 5%

Resultaat:

Zie labjournaal, tabblad herhaalbaarheid. Hieronder een overzicht in tabel 5 (n=10):

Tabel 5: Herhaalbaarheid van SARS pos controle (batch 0001)


	Ct-waarde		ΔRn	
	Egen	RdRp	Egen	RdRp
gemiddelde	29,68	31,73	2,62	0,95
SD	0,21	0,21	0,05	0,04
%CV	1%	1%	2%	4%

Conclusie:

Acceptatiecriterium gehaald.

2.7. **Precisie/ reproduceerbaarheid**Uitvoering:

min. 15 datapunten van eenzelfde sample van rond de Ct30 (bv PPC), die in minimaal 3 runs door minimaal drie analisten is gerund.


	validatierapport Sarbeco / SARS-CoV-2 real time PCR
	Locatie Bravis

Acceptatie criterium:

%CV(Ct) bij een Ct van rond de 30 moet kleiner zijn dan 5%

Resultaat:

Zie labjournaal, tabblad herhaalbaarheid. Hieronder een overzicht in tabel 5 (n=17):

 MEDISCHE MICROBIOLOGIE BRABANT & ZEELAND	validatierapport Sarbeco / SARS-CoV-2 real time PCR
	Locatie Bravis

Tabel 6: Reproduceerbaarheid van SARS pos controle (batch 0001).

	Ct-waarde		ΔRn	
	Egen	RdRp	Egen	RdRp
gemiddelde	29,62	31,26	2,47	0,95
SD	0,20	0,91	0,29	0,12
%CV	1%	3%	12%	13%

Conclusie:

Acceptatiecriterium gehaald.

2.8. **Precisie / meetonzekerheid (5.5.1.4) rondom medische besliswaarde**

n.v.t het gaat hier om een kwalitatieve test

2.9. **Meetinterval**

n.v.t het gaat hier om een kwalitatieve test

3. **Eindconclusie**

SARS-CoV-2 / Sarbeco PCR kan geïmplementeerd worden in de diagnostiek, zij het wel met externe lysis stap. Zolang er nog geen positieve klinische materialen getest zijn, blijft opmerking "Dit onderzoek valt niet onder ISO 15189" erbij staan.

4. **Implementatie**

27 februari 2020

5. **Bijlagen**

-	5.1.2h
-	
-	
-	