

To: [5.1.2e] [5.1.2e] [5.1.2e] [5.1.2e]@rivm.nl]
From: [5.1.2e] [5.1.2e]
Sent: Thur 1/9/2020 12:32:56 PM
Subject: FW: Pan CoV zoals besproken
Received: Thur 1/9/2020 12:32:57 PM

Ter info

⚡ zie.. is puntje van discussie resp vs emerging vandaar mijn voorzichtige voorbereiding van deze acties.

From: [5.1.2e] [5.1.2e] <[5.1.2e]@rivm.nl>
Sent: donderdag 9 januari 2020 13:30
To: [5.1.2e] [5.1.2e] <[5.1.2e]@rivm.nl>; [5.1.2e] [5.1.2e] [5.1.2e] [5.1.2e] <[5.1.2e]@rivm.nl>
Cc: [5.1.2e] [5.1.2e] <[5.1.2e]@rivm.nl>; [5.1.2e] [5.1.2e] <[5.1.2e]@rivm.nl>; [5.1.2e] [5.1.2e] <[5.1.2e]@rivm.nl>; [5.1.2e] [5.1.2e] <[5.1.2e]@rivm.nl>
Subject: RE: Pan CoV zoals besproken

Okay, mooi [5.1.2e]

Omdat we MERS-CoV binnen de resp groep up to date houden en we QCMD panelmonsters die negatief zijn voor MERS-CoV tot 2015 getest hebben met oude pan corona en sequenzen voor species lijkt het mij handig om de nieuwe pan corona toe te voegen aan het arsenaal om MERS-CoV verdenkingen te testen. Door steeds mee te nemen bij MERS-CoV QCMD panel inclusief sequenzen product blijft het protocol (of de protocollen) ook steeds gecontroleerd. En blijven we prepared voor nieuwe coronavirussen.

Ik cc [5.1.2e] daarom even mee in de email trail.

MERS-CoV panel komt meestal in juni.

Met vriendelijke groeten,

[5.1.2e]

From: [5.1.2e] [5.1.2e]
Sent: donderdag 9 januari 2020 12:56
To: [5.1.2e] [5.1.2e] [5.1.2e] [5.1.2e]
Cc: [5.1.2e] [5.1.2e]; [5.1.2e] [5.1.2e]; [5.1.2e] [5.1.2e]
Subject: Pan CoV zoals besproken

Hoi [5.1.2e]

Hieronder de gegevens. Het zijn in de coronawereld nog steeds conventionele, nested tests die in deze situatie gebruikt worden. De souza luna deed het het beste (zwarte hier beneden). Goed alt is de groene.. Ik denk goed om beiden in huis te halen. [5.1.2e] heeft met beide testen gewerkt.

Gr [5.1.2e]

gebaseerd op ORF1b gen (de Souza Luna et al 2012 JCM), RdRp gen, nested protocol (da Silva Filho et al 2012, JID)

| | | | | |
|-------|-----------|------------|--|--|
| PCS1 | CoV ORF1b | DNA Oligos | | TTA-TGG-GTT-GGG-ATT-ATC |
| PCS2 | CoV ORF1b | DNA Oligos | | TGA-TGG-GAT-GGG-ACT-ATC |
| PCS3 | CoV ORF1b | DNA Oligos | | CTT-ATG-GGT-TGG-GAT-TAT-CCT-AAG-TGT-GA |
| PCS4 | CoV ORF1b | DNA Oligos | | CTT-ATG-GGT-TGG-GAT-TAT-CCC-AAA-TGT-GA |
| PCAs1 | CoV ORF1b | DNA Oligos | | TCA-TCA-CTC-AGA-ATC-ATC-A |

| | | | | |
|--------------|-----------|------------|--|---|
| PCAS2 | CoV ORF1b | DNA Oligos | | TCA-TCA-GAA-AGA-ATC-ATC-A |
| PCAs3 | CoV ORF1b | DNA Oligos | | TCG-TCG-GAC-AAG-ATC-ATC-A |
| PCAs4 | CoV ORF1b | DNA Oligos | | CAC-ACA-ACA-CCT-TCA-TCA-GAT-AGA-ATC-ATC-A |
| CoV2A-R | CoV RdRp | DNA Oligos | | TAA-TAA-CAG-ACA-ACG-CCA-TCA-TC |
| CoV2A-Rnesta | CoV RdRp | DNA Oligos | | CCA-TCA-TCA-CTC-AGA-ATC-ATC-A |
| CoV2A-Rnestb | CoV RdRp | DNA Oligos | | CCA-TCA-TCA-GAA-AGA-ATC-ATC-A |
| CoV2A-F | CoV RdRp | DNA Oligos | | CTT-ATG-GGT-TGG-GAT-TAT-CC |

ref: [da Silva Filho et al 2012, JID](#)

target RNA polymerase gene

size 404 bp

PCR: 1 st round 5' 95C, 39X:[30" 95C, 60" 48C, 2.30' 72C], 10' 72C, 4C

PCR: 2 nd round 5' 95C, 39X:[30" 95C, 60" 48C, 2.30' 72C], 10' 72C, 4C

rxn 1 st round AmpliTaq Gold:H2O 16,6 / Buffer 2.5 / MgCl2 1.5/ dNTP's 0.5 / Primer F 0.5 / Primer R 0.5 / Taq 0.4

rxn 2 nd round AmpliTaq Gold:H2O 18,4 / Buffer 2.5 / MgCl2 1.5/ dNTP's 0.5 / Primer F 0.5 / Primer R 0.5 / Taq 0.1

[Mg] mM totaal 1.5

forward (pmol/rxn) 5

reverse (pmol/rxn) 5

Generic Detection of Coronaviruses and Differentiation at the

Prototype Strain Level by Reverse Transcription-PCR and

Nonfluorescent Low-Density Microarray

[Luciano Kleber de Souza Luna](#),¹ Volker Heiser,² Nicolas Regamey,³ Marcus Panning,¹

Jan Felix Drexler,¹ Sabue Mulangu,⁴ Leo Poon,⁵ Sigrid Baumgarte,⁶ [5.1.2a](#) [5.1.2a](#) Hajjema,⁷

Laurent Kaiser,⁸ and Christian Drosten¹

JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, Mar. 2007, p. 1049–1052

target: ORF1b gen CoV

nested Protocol

pan corona

| PCR reaction 1st round (Qiagen) | | |
|---------------------------------------|------------|------------|
| H2O | | |
| PCR Buffer (15 mM MgCl ₂) | Qiagen | 10x |
| dNTP's | Roche | 10mM |
| Primer mix PC2S2 | Eurogentec | 5 uM each |
| Primer mix PC2As1 | Eurogentec | 15 uM each |
| HotStar Taq DNA Polymerase | Qiagen | 5U/ul |
| cDNA | | |

PCR reaction; 15' 95C, 40 X:[1' 94C, 1' 48 C, 1' 72C], 10' 72C, forever 4 C

| PCR reaction 2nd round (Qiagen) | | |
|---------------------------------------|------------|-----------|
| H2O | | |
| PCR Buffer (15 mM MgCl ₂) | Qiagen | 10x |
| dNTP's | Roche | 10mM |
| Primer mix PCS | Eurogentec | 5 uM each |
| Primer PCAs4 | Eurogentec | 20 uM |
| HotStar Taq DNA Polymerase | Qiagen | 5U/ul |
| PCR product | | |

PCR reaction; 15' 95C, 30 X:[1' 94 C, 1' 48 C, 1' 72C], 10' 72C, forever 4 C

Gelanalyse 2% MP

verwacht nested PCR product

474 bp

