



Rijksinstituut voor Volksgezondheid  
en Milieu  
Ministerie van Volksgezondheid,  
Welzijn en Sport

## Toelichting op vraag van Haga aan

5.1.2e

Naar aanleiding van de update van de webpagina 'Aanvullende informatie diagnostiek COVID-19 Bijlage bij de LCI-richtlijn COVID-19 | Versie 25 september 2020' (<https://lci.rivm.nl/covid-19/bijlage/aanvullend>) zijn een aantal vragen gesteld. Updates van deze bijlage naar de huidige stand van ontwikkelingen en inzichten vinden regelmatig plaats.

RIVM

A. van Leeuwenhoeklaan 9  
3721 MA Bilthoven  
Postbus 1  
3720 BA Bilthoven  
[www.rivm.nl](http://www.rivm.nl)

T 5.1.2e  
[info@rivm.nl](mailto:info@rivm.nl)

### Vraag: waarom is de afkapwaarde voor de Ct-waarde bij de PCR aangepast? RIVM 15 oktober 2020

Deze vraag refereert naar de volgende zinsnede in het document:

RdRP-gen-PCR SARS-CoV-2 door diverse laboratoria specifiek en vergelijkbaar gevoelig als de E-gen-PCR gemaakt. De amplificatiecurve dient goed te worden beoordeeld bij de hogere Ct-waarden (zeker bij een Ct van >35). Is de curve afwijkend, onbetrouwbaar of moeilijk te interpreteren, dan is zeker bij een epidemiologisch onverwachte positieve uitslag confirmatie nodig. Afhankelijk van de lokale implementatie met dit gen kan dat met de RdRP-PCR of andere eigen PCR op het RNA, of door her-testen van hetzelfde monster door het eigen of samenwerkingslab, of door de patiënt opnieuw te bemonsteren.

Daar stond in de voorgaande versie van het document de Ct-waarde >30. De onderliggende vraag bij de vraag naar aanpassing van deze waarde suggereert dat het hier gaat om een afkapwaarde die onderscheid maakt tussen positief en negatief. Dat is niet zo. Het gaat hier om een waarschuingswaarde. Ct-waarden van COVID-19 patiënten kunnen typisch variëren van circa 15 tot 40, met de meerderheid tussen 20 en 35 (grenzen afhankelijk van gebruikte apparatuur en chemie voor de PCR-test). Tegen de limiet van detectie van de PCR-test die zich typisch tussen Ct 35 en 40 bevindt, moeten de amplificatiecurves extra goed bekeken worden of ze aan de S-curve eis voldoen. De tekst gaat over de Ct-waarde waarboven men extra alert moet zijn bij beoordelen van de amplificatiecurves. Het betreft een aanwijzing die kan helpen bij de beoordeling van de diagnostiek.

Sommige laboratoria gebruiken om te bepalen of de PCR-test positief of negatief is een Ct afkapwaarde of andere afkapwaarde voor methoden waarbij geen Ct-waarde wordt gegenereerd. Andere laboratoria gebruiken geen afkapwaarde, maar beoordelen amplificatiecurves van het genetisch materiaal van het virus of een combinatie van beiden gebruiken. De keuze voor methode van beoordelen van een PCR-test wordt per laboratorium onderbouwd in de eigen validatie en gebruikte testalgoritmen of vastgelegd in de 'Instructions for use' (IFU) van de gebruikte commerciële kit. Daarom verschillen de beoordelingsmethoden tussen laboratoria en gebruikte testen en kan er geen generiek specifieke richtlijn voor gegeven worden. Voor "laag-positieve" resultaten waarbij getwijfeld wordt aan de juistheid, meestal een amplificatie signaal in de buurt van de detectiegrens van de PCR-test, geldt dat elk laboratorium een eigen algoritme heeft hoe hiermee om te gaan. Dit staat ook in de IFU van commerciële testen. Het vervolg op zo'n signaal kan inhouden dat er een bevestigingstest gedaan wordt op hetzelfde materiaal of dat nieuw materiaal gevraagd wordt van enkele dagen later.

### **Toelichting op wijzigingen**

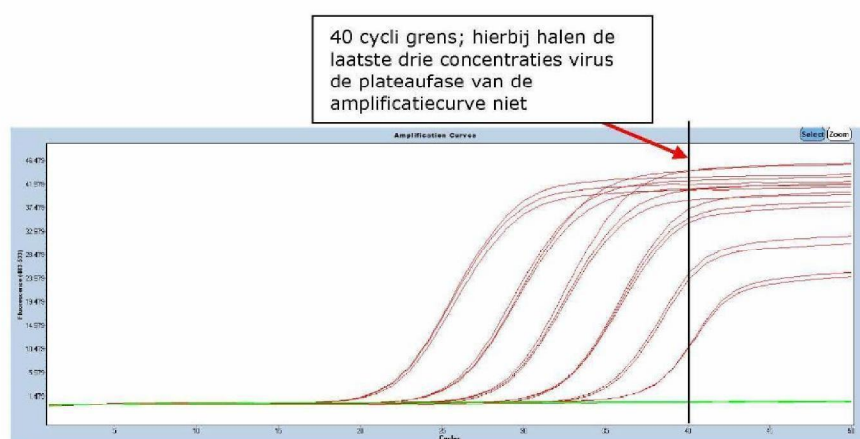
Het landschap van PCR testen voor SARS-CoV-2 heeft zich van het begin met twee in-house protocollen met één set primers en probes met twee target genen (E-gen en RdRP-gen) uitgebreid naar een scala aan protocollen gebaseerd op in-house ontwikkeling en in gebruik nemen van commerciële PCR testen en testen gebaseerd op andere amplificatietechnieken. Die hebben allemaal hun eigen optimale temperatuur waarbij de amplificatie plaatsvindt en eigen optimale aantal amplificatiecycli. Het optimum aantal cycli ligt voor het overgrote aantal testen tussen de 40 en 45 en is niet in de tijd verandert. De WHO COVID-19 referentielaboratoria ErasmusMC en RIVM gebruiken voor het originele protocol respectievelijk 45 en 50 cycli.

Het verschil in aantal cycli voor waarschuwings Ct-waarde van eerst 30 naar nu 35 in het document maakt niet dat er meer monsters positief worden of dat er meer foutief positieven bij zouden komen. Meer cycli draaien kan helpen om monsters die laat in het aantal cycli positief worden een nog duidelijkere S-vormige amplificatiecurve te geven. Maar daar gaat het niet om bij de wijziging van 30 naar 35 zoals hiervoor beschreven. Door kwaliteitscontrole weten we dat alle PCR testen en andere amplificatietesten die nu in Nederland gebruikt worden een vergelijkbare limiet van detectie hebben.

We moesten met eerst weinig positieven in het begin van de epidemie in Nederland nog ervaren hoe de ontwikkelde en uitgerolde PCR-test voor SARS-CoV-2 zich gedroegen en wat de dynamiek van de virale load tijdens het ziektebeloop van patiënten was. Daarom was in de voorgaande versie van het document in de concluderende paragraaf over de beoordeling van resultaten van de originele PCR-test aan de veilige kant geschreven om amplificatiecurves boven Ct 30 die er niet typisch uitzien (geen duidelijke S curve hebben die op exponentiële vermeerdering wijst) nader te bekijken en te confirmeren. Confirmeren kan dan met een andere test op hetzelfde monster als er een andere test beschikbaar is in het lab, of door de patiënt opnieuw enkele dagen later te laten bemonsteren. De verandering van Ct 30 naar Ct 35 als waarschuwingswaarde is ingegeven omdat gebleken is dat beneden Ct 35 de curves altijd wel typisch waren en dat er boven Ct 35 tegen de limiet van detectie van de PCR-test er pas niet typische curves konden ontstaan. Dit is eigenlijk niet anders dan bij PCR testen voor andere pathogenen. Maar nu door ervaring ook voor SARS-CoV-2 bevestigd.

Omdat veel labs niet meer de eerste uitgerolde PCR opzet gebruiken is die Ct 35 ook weer 'vloeibaar' geworden. Commerciële kits definiëren in hun IFU eigen Ct waarschuwingswaarden, als ze dat al doen. Elke implementatie zou volledig gekarakteriseerd moeten worden om een waarschuwingswaarde te definiëren. Met een algemene Ct 35 als waarschuwingswaarde om daarboven nauwkeuriger naar amplificatiesignalen te kijken zit je nog steeds aan een veilige kant.

Hoe zit het dan met de veelbesproken afkapwaarde voor positief of negatief? Die is er eigenlijk niet voor een goed ontwikkelde PCR-test. Minder dan 1 molecuul kan niet gedetecteerd worden en 1 molecuul in een PCR-test heeft na pakweg 35-36 amplificatiecycli voldoende kopieën gegenereerd om boven de fluorescentie achtergrond waarde uit te komen. Typisch voorbeeld van SARS-CoV-2 detectie met protocol wat gebruikt wordt op het RIVM hieronder. Dit is een efficiënt verlopende PCR reactie. Zoals te zien is verlengd meer dan 40 cycli draaien de laatste curve in de grafiek verder naar rechts waardoor de S-vorm zichtbaar wordt, maar de Ct waarde verschuift daardoor niet.



*Figuur. Amplificatiecurves van RdRP-gen van 10-voudige verdunningsreeks SARS-CoV-2 gesimuleerde klinische monsters in drievoud getest (rood) in de achtergrond van negatieve klinische monsters (groen). De laatste curves rechts zijn bij een concentratie virus op de detectiegrens van de PCR-test waarbij de PCR-test in 2 van de 3 herhalingen een amplificatiecurve geeft. Zou 40 cycli gedraaid zijn ipv 50 cycli dan zouden de laatste curves voordat ze de S-vorm krijgen afgekapt zijn. Dat geldt ook voor de 10-voudig en 100-voudig hogere concentraties daarvoor. 50 cycli draaien maakt het beoordelen van de curves een stuk gemakkelijker. Bij minder dan 40 cycli draaien zou er sensitiviteit verlies optreden.*

Voorbij de absolute limiet van detectie van 1 molecuul per PCR reactie komen er geen specifieke curves bij. Zou je meer dan 50 cycli draaien dan krijg je artefacten van primerdimeren en andere troep. Daarom wordt regulier bijna nooit meer dan 40-45 cycli gedraaid. Maar, zoals getoond voor het RIVM protocol levert 50 cycli draaien geen problemen op en het vergemakkelijkt het beoordelen van de amplificatiecurves.

Bijgevoegd de Standard Operating Procedure (SOP) en het validatierapport van de PCR-test die we bij het RIVM gebruiken. Deze, of de ErasmusMC variant van de originele PCR-test, wordt nog steeds door labs in Nederland gebruikt. Bijgevoegd ook de IFU van drie commerciële kits die door labs in Nederland worden gebruikt. In de Ridagene kit IFU staat een Ct waarde genoemd waarboven er extra naar curves

gekeken moet worden of herhaling aangevraagd om meer zekerheid te krijgen. In de Seegene kit IFU gaat het om welke targets positief zijn wanneer er extra aandacht aan de uitslag gegeven moet worden. Idem voor de PCR sneltest van Cepheid die veel gebruikt wordt in Nederland. Dit geeft ongeveer de variatie aan waarmee we nu in Nederland te maken hebben.

Een andere aanpassing in het document is de aandacht die gevraagd wordt voor het gebruik van testen met één of met meer dan één target gen. Het landschap aan op het moment van schrijven beschikbare testen is in de update weergegeven. In de voorgaande versie was dit vooral uitgebreid gericht op gebruik van de originele E-gen en RdRP-gen PCR-testen. In de huidige versie is de aandacht voor het originele protocol teruggebracht naar één alinea en meer aandacht gegeven aan de ontwikkelingen over de laatste maanden op het gebied van PCR testen. Waar eerst vanwege materiaal en reagentia tekorten van twee targets (E-gen en RdRP-gen) overgaan kon worden naar één target (E-gen) zijn door introductie van commerciële kits (zoals hiervoor genoemd en voorbeeld IFU bijgesloten) en betere beschikbaarheid van materialen en reagentia steeds meer tests met meerdere targets in gebruik genomen. Ook hierdoor zijn er niet meer of minder foutief positieve resultaten. Omdat verschillende targets niet 100% vergelijkbaar in sensitiviteit zijn kan het aantal zwak positieven toenemen, omdat bij zwak positieven niet altijd alle targets positief zijn. Dit is normaal en het gevolg van een statistisch proces om een lage concentratie virus in een monster rond de detectielimiet van de test op te kunnen pikken. Voor het beoordelen van niet alle targets positieve resultaten hebben laboratoria een algoritme of dit ligt vast in de IFU van de commerciële PCR-test kit (zie bijgevoegde voorbeelden).

Kortom, het aantal amplificatiecycli wat in PCR testen of andere amplificatietechnieken gebruikt wordt is optimaal voor een sensitieve test en het aantal amplificatiecycli is sinds de start van SARS-CoV-2 circulatie in Nederland niet verhoogd om meer monsters positief te vinden. Daarnaast is het gebruik van meer dan één target ingegeven om minder patiënten met een erg lage hoeveelheid virus te missen en het risico te spreiden dat ondanks zorgvuldige ontwikkeling van de testen door mutaties in het virus genoom een test op één deel van het virus genoom opeens minder gevoelig zou kunnen worden en er patiënten gemist zouden kunnen worden. Dit is tot nu toe niet opgetreden met de veel gebruikt E-gen PCR omdat die gebruik maakt van een zeer stabiel deel van het erfelijk materiaal van het virus.

#### **Wanneer is de aanpassing gemaakt en waarom?**

De tekst op de website is 25 september 2020 aangepast. De aanpassing is gemaakt om de laatste stand van zaken in ontwikkelingen van PCR-testen, andere type testen en ontwikkelingen op diagnostiek gebied te communiceren. De aanpassing van de waarschuwings Ct-waarde is gemaakt omdat de opgedane ervaring leert dat onder Ct 35 er geen twijfelcurves zijn. De aanpassing aan aantal target genen in PCR-testen en andere typen testen is gemaakt om het veranderde landschap aan

beschikbare en gebruikte testen in Nederland te beschrijven.

#### **Wie schrijft en beoordeelt aanpassingen en hoe wordt het gecommuniceerd?**

Een team van artsen-microbiologen, virologen, medisch moleculair biologen, artsen openbare gezondheidszorg, en epidemiologen van binnen en buiten het RIVM schrijven updates van het document. Communicatie hierover is gedaan via (Lab)Inf@ct: COVID-19 (nieuw coronavirusinfectie) (68), 29 september 2020. De vaststellingsprocedure via de subcommissie Diagnostiek LCI-richtlijnen in samenwerking met de Nederlandse Vereniging voor Medische Microbiologie loopt.

#### **Eén target of meerdere targets en andere Ct waarde: wat is het effect op het aantal en percentage positieven?**

In het begin van de epidemie werd in Nederland getest op het E-gen en het RdRP-gen. Omdat het E-gen het gevoeligst was van deze twee is er vanwege schaarste en efficiënt gebruik van middelen en reagentia ervoor gekozen om het testen tot één gen, het E-gen, te beperken. Dit heeft geen invloed gehad op het aantal en het percentage positieven omdat de E-gen PCR-test de gevoeligste test was. De Ct waarde waarboven bij beoordeling extra aandacht gegeven moet worden heeft geen invloed op het aantal PCR positieven, niet absoluut en niet relatief. Onterecht wordt de suggestie gewekt dat de genoemde waarschuwwaarde samenhangt met daaronder positief en daarboven negatief. Het gaat slechts om een waarde waarboven bij de beoordeling van de amplificatiecurves extra aandacht wordt gegeven. Het gebruik van één of meerdere target genen voor de PCR-test heeft zich vloeiend voltrokken en kan daarom een plotselinge stijging in het percentage positieven niet verklaren. Daarnaast geeft het kwaliteitsprogramma aan dat de gebruikte PCR-testen tussen laboratoria en in laboratoria een vergelijkbare gevoeligheid hebben. Zoals hierboven beschreven heeft het verhogen van de waarschuwwaarde van 30 naar 35 geen invloed op het aantal positieven en fout-positieven en kan daarom een plotselinge stijging in het percentage positieven niet verklaren.

1) Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu, COVID-19 Richtlijn (<https://lci.rivm.nl/richtlijnen/covid-19>).

#### **Bijlagen:**

1. V040 Validatierapport Coronavirus 2019 n-CoV detectie PCR\_met\_ref
2. SOP deel 1\_M900 Het isoleren en zuiveren van nucleïnezuur uit klinische monsters mbv MagNA Pure 96 versie 7
3. SOP deel 2\_M012\_Lightcycler-qPCR\_versie\_9
4. SOP deel 3\_F927 coronavirus detectie PCR
5. EUA-Seegene-allplex2-ifu
6. pg6815\_ridagene\_sars-cov-2\_2020-07-27\_en\_final
7. Xpert Xpress SARS-CoV-2 Assay ENGLISH Package Insert 302-3750 Rev. C

## Bijlage 1. V040 Validatierapport Coronavirus 2019 n-CoV detectie PCR\_met\_ref

**Verification of qRT-PCR assay for detection of SARS-CoV-2**

*Version 2; 20-05-2021: concentration dPCR copies SARS-CoV-2 updated and some additional information added on quantitation limit. This only affects the description of the absolute minimum amount that can be detected. The test remains having the highest sensitivity possible in national and international comparisons.*

**Method:** qPCR – One step RT-PCR with Fast Virus Master Mix

**Manufacturer/Origin:** Biolegio

**Type of validation:** verification of improved primers/probe set specific for detection of SARS-CoV-2

**Application test:** patient diagnostics, detection of SARS-CoV-2 in clinical material

**Conclusion:** Based on the results, we conclude that using the improved primers/probe set the RT-PCR meets the predefined criteria of the following parameters: measurement trueness, measurement accuracy, quantitation limit, analytical sensitivity and detection limit. The RT-PCR is more sensitive than with the original primers/probe set and now has similar sensitivity as the E-gene RT-PCR. Therefore the improved primers/probe set has been accepted for implementation in routine diagnostics of SARS-CoV-2.

**Author:** 5.1.2e

**Date:** 6-7-2020

**Introduction & purpose**

At this moment when a request is made for corona diagnostics the sample is tested on 2 genes of SARS-CoV-2. The E-gene and RdRp-gene are detected in 2 separate PCRs. The E-gene PCR is more sensitive than the RdRp-gene PCR. With an adjustment of the primers and probe set for the RdRp-gene, the idea is that the sensitivity of RdRp-gene PCR improves, so that it provides additional confirmation whether a sample is SARS-CoV-2 positive. Especially when the viral load is low.

**Material & method**

Wobbles are removed from the original primers to match the target sites in SARS-CoV-2 exactly, the reverse primer is extended to better match the T<sub>m</sub> of the forward primer and the probe has been extended by 1 nt for increased T<sub>m</sub> and better binding compared to the original one for an annealing/extension temperature of 60°C (adjustment based on work from 5.1.2e JBZ, personal communication). The adjusted primers and probe were analysed against a representative (geographic origin and distributed over time in the pandemic) set of sequences for match; no mismatched nucleotides were found. Samples for testing were extracted on the MagNa Pure 96 instrument (Roche) using the MagNa Pure 96 DNA and Viral NA Small volume kit (Roche) and eluted in a volume of 50 µl. RdRp-assay primers and probes as described in the provided protocol by Corman et al.[1] (Table 1) were used to compare the performance of the new specific SARS-CoV2 RdRp gene primers and probe (Table 2). Reagents and temperature protocol are described in Tables 3 and 4 respectively.

**Table 1:** Original RdRp-gene primers and probes Corman et al.[1]

| Oligonucleotide | Sequence                           | Label    | Target     |
|-----------------|------------------------------------|----------|------------|
| RdRp_SARSr-F    | GTG ARA TGG TCA TGT GTG GCG G      |          | Sarbeco    |
| RdRp_SARSr-R    | CAR ATG TTA AAS ACA CTA TTA GCA TA |          | Sarbeco    |
| RdRp_SARSr-P1   | CCA GGT GGW ACR TCA TCM GGT GAT GC | TXR-BHQ2 | Sarbeco    |
| RdRp_SARSr-P2   | CAG GTG GAA CCT CAT CAG GAG ATG C  | FAM-BHQ1 | SARS-CoV-2 |

**Table 2:** Adjusted primers and probe specific for SARS-CoV2 RdRp gene

| Oligonucleotide | Sequence                                                     | Label    |
|-----------------|--------------------------------------------------------------|----------|
| RdRp_SARS-F2    | GTG <b>AAA</b> TGG TCA TGT GTG GCG G                         |          |
| RdRp_SARS-R2    | <b>CAA</b> ATG TTA <b>AAA</b> ACA CTA TTA GCA TAA <b>GCA</b> |          |
| RdRp_SARS-P2.2  | <b>CCA</b> GGT GGA ACC TCA TCA GGA GAT GC                    | FAM-BHQ1 |

**Table 3:** Composition reagents mixture for RdRp-gene SARS-CoV-2 RT-PCR. The primers and probes obtained from Biolegio were premixed at a final concentration of 10 µM primers and 5 µM probe.

|                           |       |
|---------------------------|-------|
| RdRp qRT PCR              | µl    |
| 4x Taqman Fast Virus MM   | 5     |
| Primers/probe Mix (10 µM) | 3     |
| PCR grade water           | 7     |
| Specimen nucleic acid     | 5     |
| Total volume              | 20 µl |

**Table 4:** Amplification temperature protocol.

| PCR Program               | Segment number | Temp Target (°C) | Hold Time (sec.) | Slope (°C/sec.) | Acquisition mode |        |
|---------------------------|----------------|------------------|------------------|-----------------|------------------|--------|
| Reverse Transcription     | 1              | 50               | 900              | EXTERNAL        |                  |        |
| Denaturation/Inactivation | 1              | 95               | 120              | EXTERNAL        |                  |        |
| Denaturation              | 1              | 95               | 60               | 4.4             | None             | LC 480 |
| Amplification             | 1              | 95               | 10               | 4.4             | None             |        |
| (cycles:50)               | 2              | 60               | 30               | 2.2             | Single           |        |
| Cooling                   | 1              | 40               | 30               | 4.4             | None             |        |

**Analytic parameters:**

The detection qPCR is not used as a pure quantitative method. Results are scored positive/negative to confirm if a patient is infected with SARS-CoV-2. Ct values are used as semi-quantitative information when useful for interpretation of the result. Only those parameters are tested that need verification compared to the original validation

|                                                                                                                                           |                                                           |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|
| <u>Measurement uncertainty</u> (Meetonzekerheid):                                                                                         | – not tested                                              |
| <u>Measurement trueness</u> (Juistheid):                                                                                                  | – tested: Saliva panel (page 5)                           |
| <u>Measurement accuracy</u> (Accuraatheid):                                                                                               | – tested: Saliva panel (page 5)                           |
| <u>Measurement precision</u> including measurement repeatability (Precisie inclusief herhaalbaarheid):                                    | – not tested                                              |
| <u>Analytical sensitivity</u> (Analytische sensitiviteit):                                                                                | – tested: LOD95 determination (page 4)                    |
| <u>Analytical specificity</u> , including interfering substances (Analytische specificiteit met inbegrip van interfererende substanties): | – not tested                                              |
| <u>Detection limit</u> (Detectielimiet, bij kwantitatieve methoden):                                                                      | – tested: LOD95 determination (page 4)                    |
| <u>Quantitation limit</u> (Kwantificatielimiet, bij kwantitatieve methoden):                                                              | – tested: 10-fold dilution of quantified control (page 3) |
| <u>Measuring interval</u> (Meetinterval, kwantitatieve methoden):                                                                         | – not tested                                              |

**Clinical parameters:**

|                                                              |              |
|--------------------------------------------------------------|--------------|
| <u>Diagnostic sensitivity</u> (Diagnostische Sensitiviteit): | – not tested |
| <u>Diagnostic specificity</u> (Diagnostische Specificiteit): | – not tested |

## Results

### Quantitation limit

The SARS-CoV-2 RNA used for this verification is an 1:100 dilution of the hCoV-19/Netherlands/NoordBrabant\_10003/2020 (4732000117 P2) stock obtained from cell culture. To establish PCR efficiency we first ran a triplicate 10-fold dilution series of viral RNA for each assay. Viral RNA was isolated by using the MagNA Pure LC Total Nucleic Acid Isolation Kit (Roche). After Nucleic Acid extraction the concentration is  $5.58 \times 10^5$  digital copies RdRp-gene SARS-CoV-2 positive strand RNA/ $\mu$ l extract.

**Table 5:** 10-fold dilution series both primers and probe sets

| Dilution         | Current nCoV detection |          |          | New nCoV detection |          |          |
|------------------|------------------------|----------|----------|--------------------|----------|----------|
|                  | I                      | II       | III      | I                  | II       | III      |
| SARS-CoV-2 10-1* | 23.81                  | 24.31    | 24.55    | 22.07              | 22.17    | 22.04    |
| SARS-CoV-2 10-2  | 27.93                  | 28.16    | 28.27    | 25.77              | 26.04    | 25.94    |
| SARS-CoV-2 10-3  | 30.63                  | 31.17    | 30.9     | 28.97              | 28.95    | 28.89    |
| SARS-CoV-2 10-4  | 33.23                  | 33.27    | 32.9     | 32.41              | 32.45    | 32.5     |
| SARS-CoV-2 10-5  | 34.91                  | 34.92    | 34.55    | 34.92              | 36.2     | 34.97    |
| SARS-CoV-2 10-6  | Negative               | Negative | Negative | Negative           | 37.52    | Negative |
| SARS-CoV-2 10-7  | Negative               | Negative | Negative | 37.25              | 37.19    | Negative |
| SARS-CoV-2 10-8  | Negative               | Negative | Negative | Negative           | Negative | Negative |

\* Starting concentration is  $5.58 \times 10^4$  RNA copies/ $\mu$ l extract.

We determined the slope in Excel and defined the required levels for PCR efficiency (E) and R<sup>2</sup> as >95% and >0.95, respectively. The new specific SARS-CoV-2 RdRp gene primers and probe meet the requirements (Figure 1, Table 6).

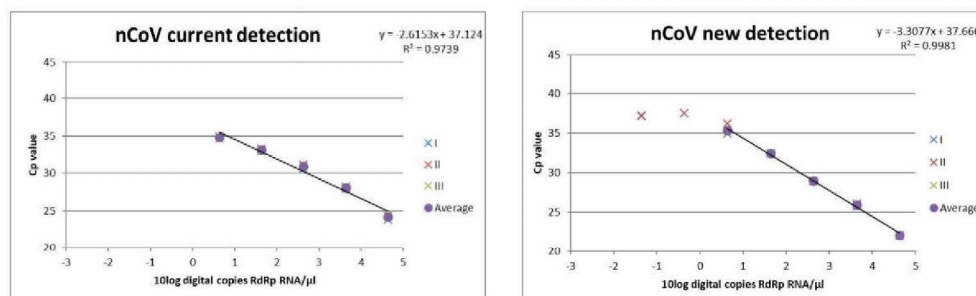


**Figure 1:** Linearity and amplification efficiency both primers and probes sets.

**Table 6:** The amplification efficiency and linearity calculated using the slope of the targets in figure 1 (calculated in Excel)

|              | Slope  | $E = 10^{-1/\text{slope}}$ | $E(\%) = 100 \times [10^{-1/\text{slope} - 1}]$ | R <sup>2</sup> |
|--------------|--------|----------------------------|-------------------------------------------------|----------------|
| Theorie      | -3.322 | 2.00                       | 100                                             | 0.9500         |
| Current nCoV | -2.615 | 2.41                       | 141.19                                          | 0.9739         |
| New nCov     | -3.308 | 2.01                       | 100.60                                          | 0.9981         |

### Analytical sensitivity and Detection Limit

Next, we ran four replicates of a 2-fold dilution series (diluted in yeast carrier RNA in water) to determine the LOD95% by Probit analysis using SPSS Statistics (IBM, version 24) (Figures 2 and 3).

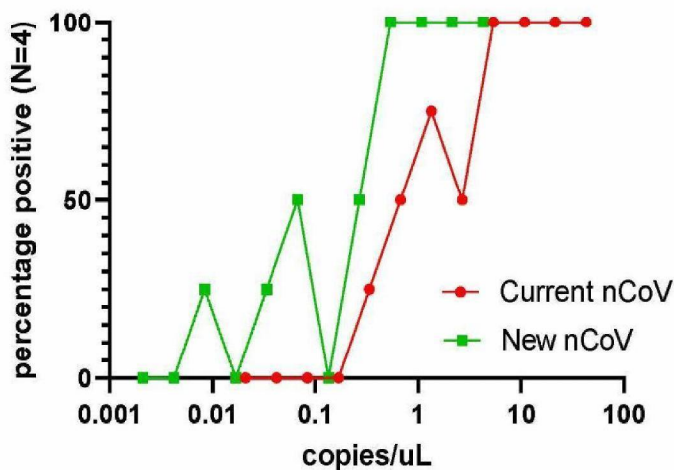


**Figure 2:** The results in percentages from the four replicates of the 2-fold dilution series against copies RdRp RNA/μl extract.

### LOD95% with upper and lower bound

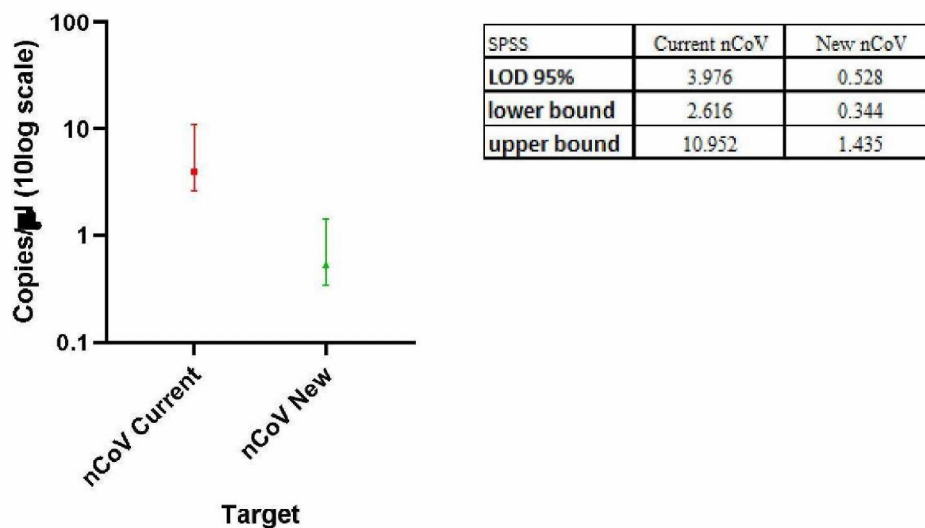


**Figure 3:** The LOD95% in RdRp RNA copies/μl extract of the current nCoV-RdRp-gene and the new nCoV-RdRp-gene RT-qPCR.

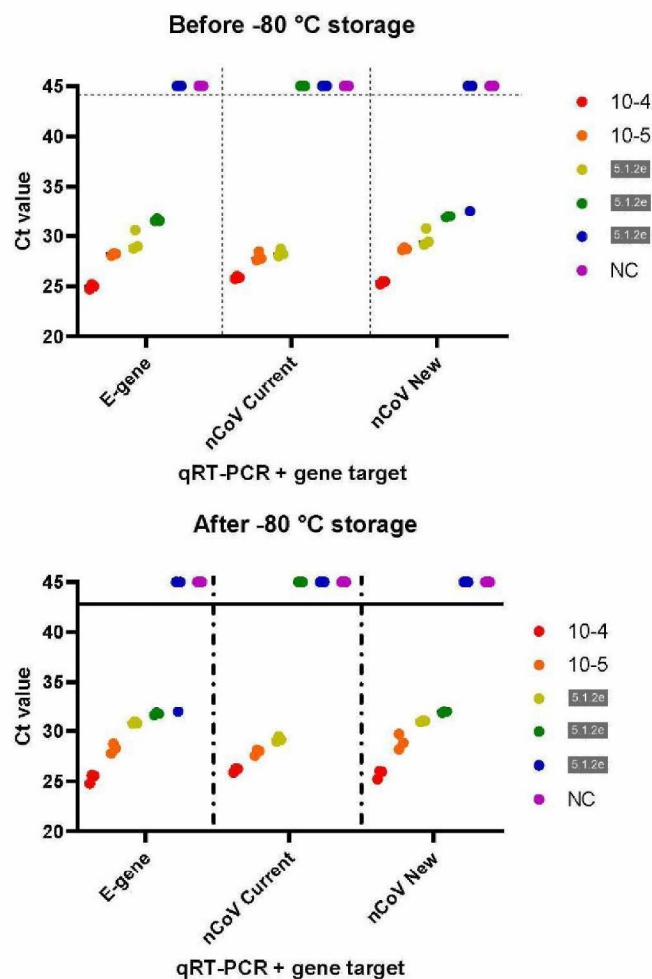
### Measurement trueness and Measurement accuracy

The measurement trueness and accuracy has been tested using the saliva EQA panel. The panel specimens were extracted in triplicate before and after storage at -80 °C. The sensitivity of the new nCoV PCR is better than the current test. In the current test the 10<sup>-7</sup> dilution, virus particles equivalent to 1395 RdRp-gene digital PCR copies/ml saliva, is negative. In the new nCoV test the 10<sup>-7</sup> dilution is positive (Table 7 and Figure 4). A freeze/thaw cycle did not result in reduction of detectable RNA.

**Table 7:** Saliva panel with cp-value\*

| Name                 | Dilution Stockvirus<br>4732000117 P2 | Cp nCoV new |       |       | Cp nCoV current |       |       | Comment               |
|----------------------|--------------------------------------|-------------|-------|-------|-----------------|-------|-------|-----------------------|
| Sen.Saliva CoV20-1   | 10-4                                 | 25.46       | 25.48 | 25.21 | 25.86           | 26.02 | 25.75 | Before -80 °C storage |
| Sen.Saliva CoV20-2   | 10-7                                 | 32.01       | 31.91 | 32.04 |                 |       |       | Before -80 °C storage |
| Sen.Saliva CoV20-3   | 10-5                                 | 28.84       | 28.7  | 28.62 | 27.76           | 27.62 | 28.44 | Before -80 °C storage |
| Sen.Saliva CoV20-4   | negative                             |             |       |       |                 |       |       | Before -80 °C storage |
| Sen.Saliva CoV20-5   | 10-6                                 | 29.42       | 29.15 | 30.75 | 28.19           | 28.02 | 28.72 | Before -80 °C storage |
| Sen.Saliva CoV20-6   | 10-8                                 |             |       | 32.55 |                 |       |       | Before -80 °C storage |
| Sen.Saliva CoV20-1.1 | 10-4                                 | 25.2        | 25.94 | 26    | 25.86           | 26.21 | 26.23 | After -80 °C storage  |
| Sen.Saliva CoV20-2.1 | 10-7                                 | 31.82       | 31.98 | 31.95 |                 |       |       | After -80 °C storage  |
| Sen.Saliva CoV20-3.1 | 10-5                                 | 29.7        | 28.18 | 28.82 | 28.11           | 27.56 | 28    | After -80 °C storage  |
| Sen.Saliva CoV20-4.1 | negative                             |             |       |       |                 |       |       | After -80 °C storage  |
| Sen.Saliva CoV20-5.1 | 10-6                                 | 30.98       | 30.88 | 31    | 29.46           | 29.12 | 28.94 | After -80 °C storage  |
| Sen.Saliva CoV20-6.1 | 10-8                                 |             |       |       |                 |       |       | After -80 °C storage  |

\* Concentration of the dilution series starts at a virus concentration equivalent to  $1.40 \times 10^6$  (10-4 dilution) dPCR RdRp-gene copies/ml in specimen.

**Figure 4:** E-gene and RdRp-gene qRT-PCR results of saliva panel before and after -80 °C storage

### Conclusion

Based on the results of the measurement trueness, measurement accuracy, quantitation limit, analytical sensitivity and detection limit the test can be implemented to detect SARS-CoV-2 in clinical specimens.

### Literature

1. Corman VM, Landt O, Kaiser M, et al. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. Euro Surveill. 2020;25(3):2000045. doi:10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045

### Archive raw data

5.1.2h

### Linked documents:

IDS\_PRO\_0701 'Validatie van methoden en apparatuur – versie 13  
 Leidraad parameters en criteria validatie (IDS\_PRO\_0701\_bijlage 1) – versie 2  
 IDS/VIR/P014 Uitpakprotocol diagnostieaanvraag BSL-2plus en BSL-3 respiratoire virussen – versie 6  
 IDS/VIR/M900 Het isoleren en zuiveren van nucleinezuur uit klinische monsters m.b.v. de MagNA Pure 96 – versie 7  
 IDS/VIR/M012 Lightcycler- qPCR – versie 9  
 IDS/VIR/F927 Coronavirus detectie PCR – versie 3  
 V040 Validatierapport Coronavirus 2019 n-CoV detectie PCR (Versie 2)

**Bijlage 1:****Validatierapport Coronavirus 2019 n-CoV detectie PCR**

NB Het validatierapport is in het engels vanwege internationale samenwerking bij het ontwikkelen van deze test

**Validation of qRT-PCR assays for detection of novel coronavirus 2019-nCoV**

*Version 2; 20-05-2021: number of copies SARS-CoV-1/μl harmonized and some additional information added on quantitation limit. This only affects the description of the absolute minimum amount that can be detected. The test remains having the highest sensitivity possible in national and international comparisons.*

**Methode:** qPCR – Onestep RT-PCR met behulp van Fast Virus Master Mix

**Fabrikant/herkomst:** Eurogentec, Thermofisher

**Soort validatie:** validatie van test specifiek voor het aantonen van coronavirus 2019 n-CoV

**Toepassing test:** patiëntendiagnostiek, detecteren van coronavirus 2019 n-CoV in klinisch materiaal

**Conclusie:** Op basis van de resultaten is gebleken dat de resultaten voldoen aan de vooraf gestelde criteria van de volgende parameters: juistheid, analytische sensitiviteit en detectielimiet en (analytische) specificiteit.

**Auteur:** 5.1.2e

**Datum:** 22-1-2020

**Introduction & goal****Background surveillance acute respiratory infections**

The clinical specimens for the clinical validation of the E-assay and GdRp-assay were selected from the biobank containing combined nose swab and throat swab specimens in virus transport medium from the national surveillance of influenza-like illness (ILI) and acute respiratory infections (ARI) in the Netherlands. General practitioners from the Nivel Netherlands institute for health services research Primary Care Database report the incidence of ILI on a weekly basis and take nasopharyngeal and oropharyngeal swabs from patients consulting with ILI or ARI. These specimens are submitted to the National Institute for Public Health and the Environment (RIVM) for in house developed qRT-PCR diagnosis of influenza virus, respiratory syncytial virus, rhinovirus and enterovirus. When questions arise on unsuspected increases in ILI incidence accompanied by a low detection rate of pathogens the FTD Respiratory pathogens 21 assay (Fast Track Diagnostics) is used.

**Material & methods****Selection of specimens**

One-hundred specimens have been selected from the surveillance biobank (Table 1). For influenza viruses, RSV and rhinovirus about ten specimens with Ct values below 30 and representative for the range of Ct values in clinical practice. For enterovirus the range of types detected in respiratory surveillance; for most a low and higher Ct value per type. For the other pathogens those detected with a Ct value below 30 during increased ILI incidence at the start of the 2018/2019 respiratory season that could not be fully explained by routinely detected viruses.

Additional were tested, CoV-HKU1 RNA from highly positive specimen, CoV-NL63 virus isolate, CoV-229E virus isolate, *Chlamydia psittaci* culture, *Chlamydia pneumoniae* culture, *Mycoplasma*

*pneumoniae* culture and the 2019 MERS-CoV QCMD EQA panel containing different dilutions of MERS-CoV in 5 specimens, CoV-OC43 (n=1) and CoV-NL63 (n=1) virus and 1 negative specimen. Except for CoV-HKU1 RNA all specimens were freshly extracted.

**Table 1.** Tests of known respiratory viruses and bacteria in clinical specimens

| Clinical specimens with known viruses/bacteria       | Number of samples tested in both assays | Ct range        |
|------------------------------------------------------|-----------------------------------------|-----------------|
| CoV-HKU1                                             | 1                                       | NA              |
| CoV-OC43                                             | 5                                       | 22.7 – 29.9     |
| CoV-229E                                             | 3                                       | 25.1 – 28.5     |
| Influenza virus A(H1N1)pdm09                         | 10                                      | 18.9 – 28.1     |
| Influenza virus A(H3N2)                              | 10                                      | 17.4 – 27.7     |
| Influenza virus B/Victoria                           | 7                                       | 19.8 – 29.9     |
| Influenza virus B/Yamagata                           | 10                                      | 23.5 – 29.1     |
| Rhinovirus                                           | 13                                      | 13.4 – 28.0     |
| Enterovirus (for types see supplementary excel file) | 18                                      | 19.6 – 28.9     |
| Respiratory syncytial virus A                        | 10                                      | 18.0 – 29.8     |
| Respiratory syncytial virus B                        | 11                                      | 21.0 – 29.4     |
| Parainfluenza virus 3                                | 1                                       | 26              |
| Human metapneumovirus                                | 3                                       | 26.7 – 27.6     |
| Adenovirus                                           | 2                                       | 21.0 – 27.3     |
| Human Bocavirus                                      | 1                                       | 35 (borderline) |
| Mycoplasma spp.                                      | 1                                       | 26.8            |
| <b>Total</b>                                         | <b>106</b>                              |                 |

#### qRT-PCR

Per clinical specimen 200 µl was extracted on a MagNA Pure 96 Instrument (Roche) using the MagNA Pure 96 DNA and Viral NA Small Volume Kit (Roche) and eluted in a volume of 50 µl. E-assay and RdRP-assay primers and probes as described in the provided protocol by Corman et al. were kindly provided by Corman and ordered from Eurogentec (Belgium). As control material SARS-CoV-1 full virus RNA (Strain Frankfurt 1, concentration 1000 copies RNA/µl) (Ct value 29-30 at 5 µl/rx) was also kindly provided by Corman.

Reaction conditions were as shown in Tables 2-4.

**Table 2.** For primers and probes provided by Corman.

|                         |       |                         |       |
|-------------------------|-------|-------------------------|-------|
| E-gene qRT PCR          | μl    | RdRP-gene qRT-PCR       | μl    |
| 4x Taqman Fast Virus MM | 5     | 4x Taqman Fast Virus MM | 5     |
| SJVE-F (10 μM)          | 1     | SJVR-F (10 μM)          | 1.5   |
| SJVE-R (10 μM)          | 1     | SJVR-R (10 μM)          | 2.0   |
| SJVE-P (10 μM)          | 0.5   | SJVR-P1/SJVR-P2 (10 μM) | 0.5   |
| PCR grade water         | 7.5   | PCR grade water         | 6     |
| Specimen nucleic acid   | 5     | Specimen nucleic acid   | 5     |
| Total volume            | 20 μl | Total volume            | 20 μl |

**Table 3.** For primers and probes obtained from Eurogentec primers and probes were premixed at a final concentration of 10 μM each except for the SJVR probes for 5 μM each.

|                         |       |                         |       |
|-------------------------|-------|-------------------------|-------|
| E-gene qRT PCR          | μl    | RdRP-gene qRT-PCR       | μl    |
| 4x Taqman Fast Virus MM | 5     | 4x Taqman Fast Virus MM | 5     |
| SJVE Mix (10 μM)        | 3     | SJVR Mix (10 μM)        | 3     |
| PCR grade water         | 7     | PCR grade water         | 7     |
| Specimen nucleic acid   | 5     | Specimen nucleic acid   | 5     |
| Total volume            | 20 μl | Total volume            | 20 μl |

**Table 4.** Amplification temperature protocol.

| PCR Program               | Segment number | Temp Target (°C) | Hold Time (sec.) | Slope (°C/sec.) | Acquisition mode | LC 480 |
|---------------------------|----------------|------------------|------------------|-----------------|------------------|--------|
| Reverse Transcription     | 1              | 50               | 900              | EXTERNAL        |                  |        |
| Denaturation/Inactivation | 1              | 95               | 120              | EXTERNAL        |                  |        |
| Denaturation              | 1              | 95               | 60               | 4.4             | None             |        |
| Amplification             | 1              | 95               | 10               | 4.4             | None             |        |
| (cycles:50)               | 2              | 58               | 30               | 2.2             | Single           |        |
| Cooling                   | 1              | 40               | 30               | 4.4             | None             |        |

Standard EAV external control qRT-PCR was performed to control for inhibitors. (IDS/VIR/F351)

**Analytic parameters:**

The detection qPCR is not used as a quantitative method. Results are scored positive/negative to confirm if a patient is infected with the novel coronavirus 2019-nCoV. Therefore all analytic parameters, used for validation of quantitative methods, are not tested.

Measurement uncertainty (Meetonzekerheid):

– not tested

Measurement trueness (Juistheid):

– tested: MERS-CoV panel and Frankfurt-1 SARS-CoV-1 control RNA (page 13)

Measurement accuracy (Accuraatheid):

– not tested, no golden standard available

Measurement precision including measurement repeatability (Precisie inclusief herhaalbaarheid):

– not tested

Analytical sensitivity (Analytische sensitiviteit):

– tested: LOD95 determination (page 12)

Analytical specificity, including interfering substances (Analytische Specificiteit met inbegrip van interfererende substanties):

– tested: clinical validation including negative controls (page 13)

Detection limit (Detectielimiet, bij kwantitatieve methoden):

– not tested

Quantitation limit (Kwantificatielimiet, bij kwantitatieve methoden):

– not tested

Measuring interval (Meetinterval, kwantitatieve methoden):

– not tested

***Clinical parameters:***

Diagnostic sensitivity (Diagnostische Sensitiviteit):

– not tested, no clinical specimens of SARS-CoV-2 positive patients available

Diagnostic specificity (Diagnostische Specificiteit):

– not tested, no clinical specimens of SARS-CoV-2 positive patients available

**Results**

**LOD95 determination**

10-fold dilution series of SARS-CoV-1 control material were amplified using the reference primers and probes and the Eurogentec ordered primers and probes. Based on this dilution series a starting point for 2-fold dilution series in 4-fold was chosen, prepared and subjected to amplification to determine the LOD95.

**Table 5.** RT-qPCR results of 10-fold dilution series of SARS-CoV-1 RNA with both primer and probe sets

| Name                        | E-gene                |                      | RdRP-gene             |                      |
|-----------------------------|-----------------------|----------------------|-----------------------|----------------------|
|                             | Eurogentec (EuroE) Ct | Duitsland (DuitE) Ct | Eurogentec (EuroR) Ct | Duitsland (DuitR) Ct |
| SARS-CoV-1 undiluted        | 26.09                 | 25.15                | 27.08                 | 28.77                |
| SARS-CoV-1 10 <sup>-1</sup> | 29.18                 | 28.32                | 30.49                 | 31.48                |
| SARS-CoV-1 10 <sup>-2</sup> | 31.84                 | 30.85                | 33.23                 | 32.98                |
| SARS-CoV-1 10 <sup>-3</sup> | 33.99                 | 34.01                | 35.68                 | 34.5                 |
| SARS-CoV-1 10 <sup>-4</sup> | neg                   | 35.92                | 35.75                 | 34.97                |
| SARS-CoV-1 10 <sup>-5</sup> | neg                   | 36.12                | neg                   | neg                  |
| SARS-CoV-1 10 <sup>-6</sup> | neg                   | 35.18                | neg                   | neg                  |
| SARS-CoV-1 10 <sup>-7</sup> | neg                   | 35.26                | neg                   | neg                  |
| Neg extraction control 1    | neg                   | 34.44                | neg                   | neg                  |
| Neg extraction control 2    | neg                   | ND                   | neg                   | neg                  |

nd = not done

Eurogentec E-gene primers and probe give a cleaner picture (Figure 1). German E-gene primers and probe generate 'ghost' curves in high dilutions and negative control (Figure 1). For the RdRP-gene qRT-PCR primers and probes of both sources the qRT-PCRs generated similar results. For both qRT-PCR assays the Eurogentec primers and probes generated higher fluorescence values than the German primers and probes.

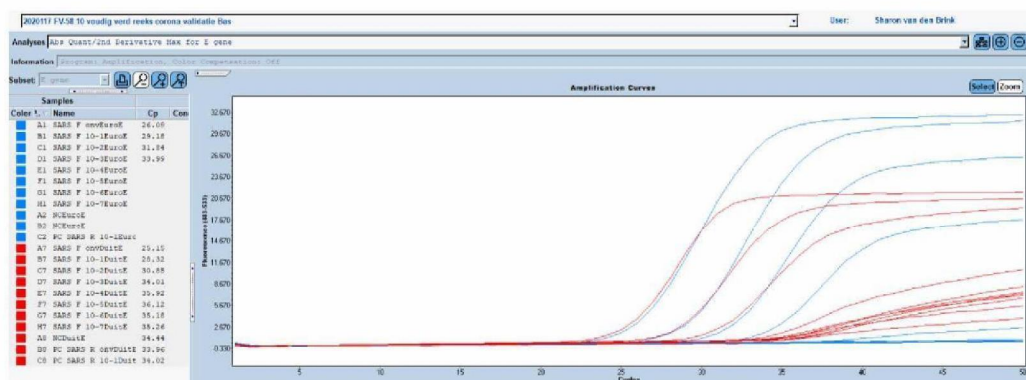


**Figure 1.** Amplification curve E-gene qRT-PCR. Blue Eurogentec primers and probe; red German primers and probe.

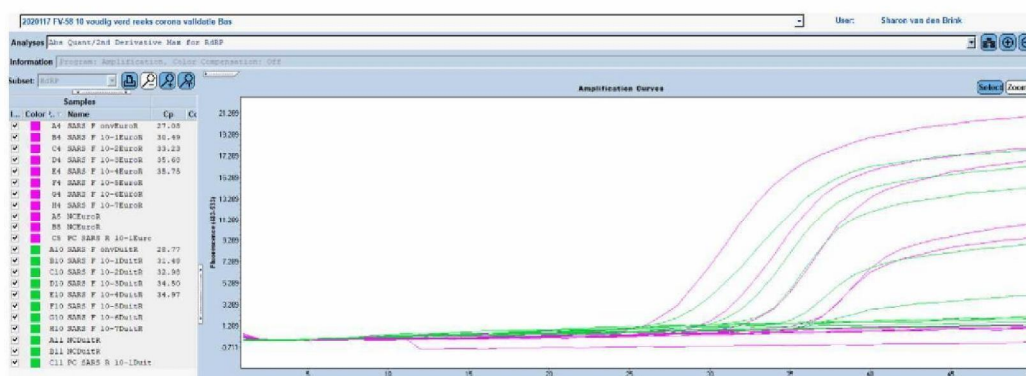
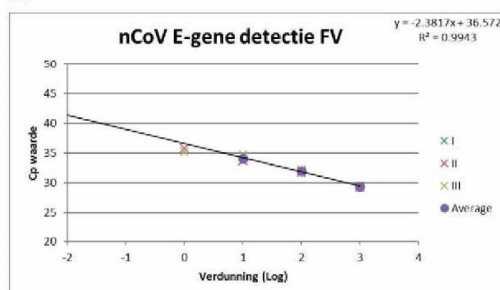
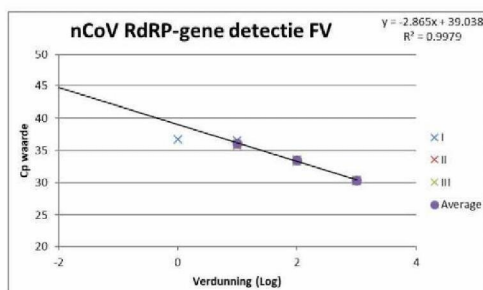


**Figure 2.** Amplification curve RdRP-gene qRT-PCR. Pink Eurogentec primers and probe; green German primers and probe.

Based on the 10-fold dilution series the linearity was determined and the efficiency calculated (Figure 3). Result of the LOD95% determination is shown in Figures 4 and 5.

**A**



**B**

|                | Slope  | $E = 10^{-1/\text{slope}}$ | $E (\%) = 100 \times [10^{-1/\text{slope}} - 1]$ | $R^2$  |
|----------------|--------|----------------------------|--------------------------------------------------|--------|
| Theoretical    | -3.322 | 2.00                       | 100                                              | 0.9500 |
| nCoV E-gene    | -2.382 | 2.63                       | 162.95                                           | 0.9943 |
| nCoV RdRp-gene | -2.865 | 2.23                       | 123.38                                           | 0.9979 |

**Figure 3.** Linearity (panel A) and amplification efficiency (panel B) with Eurogentec primers and probes

Linearity and efficiency were excellent.

#### LOD95% with upper and lower bound

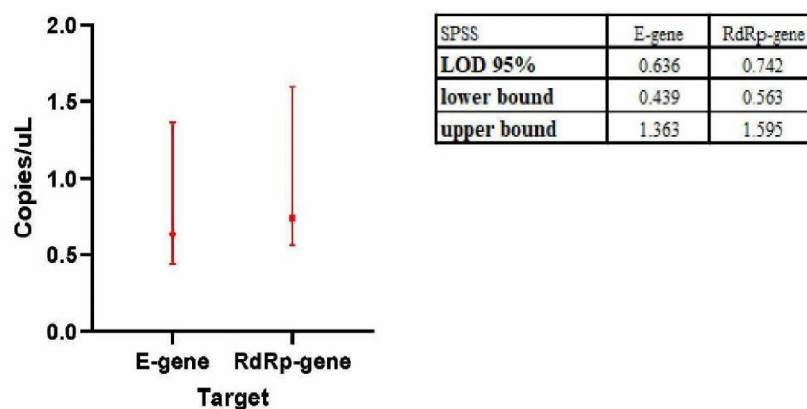


**Figure 5:** The LOD95% copies/μL RNA of the current E-gene and RdRp-gene RT-qPCR.

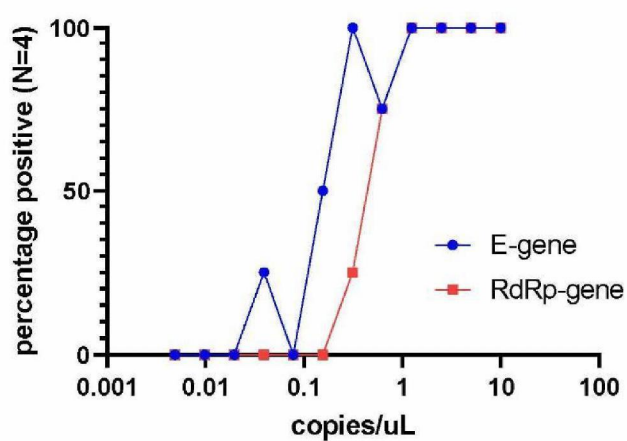


**Figure 4.** 95% limit of detection curves with calculated LOD95; Eurogentec primers and probes

### Clinical specimens

Except for two of the clinical specimens and other cultured viruses, the cultured bacteria and the 2019 MERS-CoV QCMD EQA panel specimens were negative in the qRT-PCR with Eurogentec primers and probes.

One (with Ct 28.1) of 10 influenza A(H1N1)pdm09 positive specimens and one (with Ct 29.3) of 11 RSV-B positive specimens were positive in the E-gene qRT-PCR only with high Ct values of 37.7 and 39.1 respectively (Figure 5). Both specimens have been repeated in the E-gene RT-PCR with annealing temperatures of 58°C and 60°C and turned out negative. None of the other A(H1N1)pdm09 and RSV-B positive specimens with higher viral load generated a positive signal in the E-gene qRT-PCR.

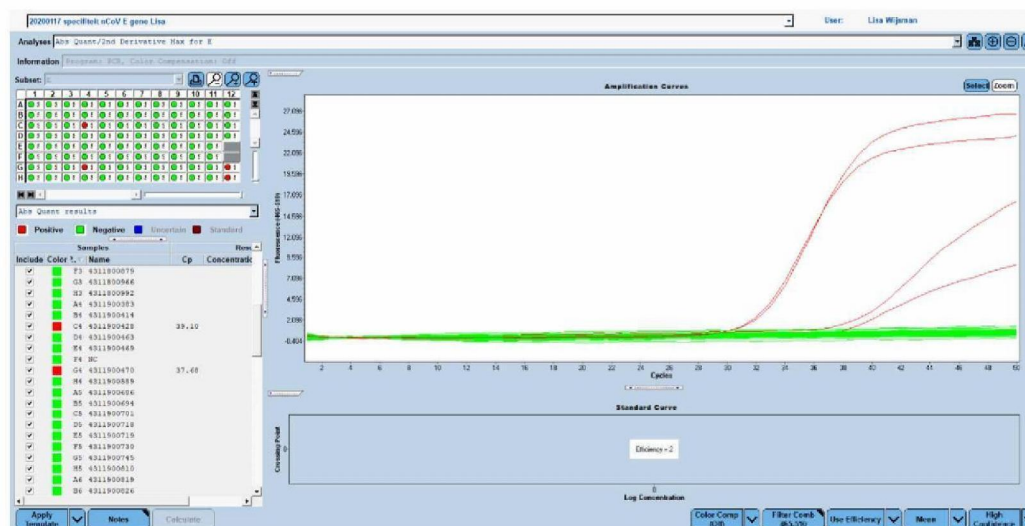


Figure 6. Amplification curves of clinical specimens with E-gene qRT-PCR

### Discussion

Except for two of the clinical specimens and other cultured viruses, the cultured bacteria and the 2019 MERS-CoV QCMD EQA panel specimens were negative in the qRT-PCR with Eurogentec primers and probes. Both specimens have been repeated in the E-gene RT- and turned out negative. The measurement trueness is 100%.

Based on the 10-fold dilution series in both E-gene and RdRP-Gene the efficiency excellent.

Based on the 2-fold dilution series in both E-gene and RdRP-Gene the analytical sensitivity is below 1 copy per  $\mu$ l input RNA and 3.2 and 3.7 copies RNA/reaction, respectively.

### Conclusion

Based on the results of the measurement trueness, efficiency and analytical specificity and analytical sensitivity the test can be implemented to detect the new coronavirus 2019-nCoV.

### Literature

5.1.2h

### Archive raw data

5.1.2h

**Linked documents:**

IDS\_PRO\_0701 'Validatie van methoden en apparatuur – versie 13

Leidraad parameters en criteria validatie (IDS\_PRO\_0701\_bijlage 1) – versie 2

IDS/VIR/P014 Uitpakprotocol diagnostieaanvraag BSL-2plus en BSL-3 respiratoire virussen – versie 6

IDS/VIR/M900 Het isoleren en zuiveren van nucleinezuur uit klinische monsters m.b.v. de MagNA

Pure 96 – versie 7

IDS/VIR/M012 Lightcycler- qPCR – versie 9

IDS/VIR/F927 Coronavirus detectie PCR – versie 1

20 - 176

5.1.2i Concept