MOBIOL/059 nCoV-19

1 INLEIDING

1.1 Doel van het onderzoek

Het detecteren van RNA van het SARS-2 Corona virus (SARS-CoV-2) uit patiëntmateriaal door middel van een real-time polymerase chain reaction (PCR), met de Taqman-chemie.

1.2 Principe van de bepaling en achtergrondinformatie

Eind 2019 is in China in de stad Wuhan een coronavirus overgesprongen vanuit vleermuis populaties via een ander zoogdier (mogelijk Pangolin) naar mensen. Het coronavirus heet 2019 nCoV-SARS-2 en behoort tot de lijn van de Sarbeco virussen. De ziekte die het veroorzaakt heet CoVID-19. Vanaf januari 2020 heeft SARS-2 zich vanuit China wereldwijd verspreid en is eind februari ook in Nederland waargenomen.

Deze PCR test wordt toegepast in geval van een infectie aan de luchtwegen met verdenking op SARS-CoV. De test kan los uitgevoerd worden of in combinatie met het ARI basispakket,.

Deze SARS-CoV-2 qPCR test wordt ingezet op (medium van) keel- en neus-swabs, neusspoelsels, BAL en sputum. Nucleïnezuur (NA) wordt uit deze materialen geïsoleerd met behulp van de MagNA Pure 24 (MP24) of de Arrow of met isopropanol precipitatie. Welke methode gekozen wordt hangt af van beschikbaarheid van materialen en apparatuur.
Droge swabs worden eerst geëlueerd in PBS. Indien een BAL of sputum erg taai/slijmerig is kan deze eerst met proteïnase K behandeld worden (zie bij 5.2.2).

SARS coronavirussen zijn RNA virussen dus dit RNA dient eerst vertaald te worden naar een kopie DNA (cDNA) middels het Reverse Transcriptase enzym. Voor deze SARS-CoV-2 PCR wordt de QNP mastermix kit van Qiagen gebruikt. In deze mix wordt de cDNA reactie en meteen erna de real-time PCR uitgevoerd. Voor de real-time PCR is gekozen voor de Taqman-chemie. Hierbij wordt gebruik gemaakt van een hydrolyse probe. Deze probe wordt als het ware opgegeten door de 5'- 3' exonuclease activiteit van het Taq polymerase. Aan de probe zit een fluorofoor en een quencher. Als de probe intact is wordt de fluorescentie uitgedoofd door de quencher. Tijdens de elongatie (verlenging van de primers) wordt de probe gescheiden van het DNA en daarbij de quencher, wat resulteert in een toename in het fluorescentie signaal, naarmate er meer PCR product wordt gevormd.

Voor de detectie van SARS-CoV zijn 3 verschillende target PCR's beschikbaar binnen het GGD Streeklaboratorium.
- Een PCR op het RdRp gen bestaande uit een primerset en 2 probes, waarvan 1 probe specifiek voor 2019-nCoV en de ander voor 2019-nCoV, SARS-CoV en vleermuis-SARS-gerelateerde CoV's. Deze test is het minst gevoelig en wordt alleen in bijzondere gevallen gebruikt.
- Een PCR op het envelop gen (E gen), bestaande uit een primerset en een probe specifiek voor 2019nCoV, SARS-CoV en vleermuis-SARS-gerelateerde CoV's en een primer/probe set voor het phocine herpes virus (PhHV).
- Een PCR op het nucleocapside gen (N gen) bestaande uit een commerciële primer/probe mix van IDT voor 2 N genen specifiek voor 2019-nCoV

De volgende teststrategie wordt gebruikt:
-Screenen met de E gen PCR; indien eenduidig resultaat (pos of neg): test uitgeven
-Indien dubieus resultaat in E-gen PCR (zie bij interpretatie): test herhalen , bij voorkeur met nieuw isolaat, op E-gen plus N-gen; resultaat uitgeven zoals in tabel bij 'interpretatie' (paragraaf 6.1).

De RdRp gen PCR wordt alleen gebruikt in uitzonderlijke gevallen en i.o.m. de MMM.

1.3 Afkortingen en definities

BAL	Broncho-Alveolaire Lavage
cDNA	copyDNA
CoV	Corona virus
PhHV	Phocine herpes virus
RT-qPCR	Reverse-Transcriptase real time Polymerase Chain Reaction
SARS	Severe Acute Respiratory Syndrome
T10	10 mM Tris-HCl, PH 8.0
Taq	Thermus aquaticus
UTM	Universal transport medium

1.4 Veiligheid

Zie het PROC/022 Algemeen veiligheidsvoorschrift en Richtlijn Moleculaire Biologie

2 REAGENTIA, MEDIA EN HULPSTOFFEN

Maak alle amplificatiebuffers in ruimte 1

2.1 Specifieke hulpstoffen

Zie voor buffers de map met Moleculaire biologie bereidingsvoorschriften bereidingsvoorschriften in KIS.
Voor deze SOP zijn van belang:
M7: 70% of 75% Ethanol
M19: PBS voor moleculair
M23 100 mM tris-buffer
M26: T10 + RNasin
M27:Lysisbuffer met glycogeen

Voor de bijsluiters van de gebruikte kits en chemicaliën zie de map op de U-schijf (U:\IZ\Streeklab\Moleculaire biologie_Algemeen\Routine\Bijsluiters)

Oligonucleotiden:
Target: RdRp (RNA dependent RNA polymerase) gen en E (Envelop) gen en N-genen

Tabel 1: Primers en probes voor SARS-CoV RT-qPCR

Gen	Primer/probe	Sequentie 5' - 3'
RdRp	RdRP_SARSr-F	GTGARATGGTCATGTGTGGCGG
	RdRP_SARSr-R	CARATGTTAAASACACTATTAGCATA
	RdRP_SARSr-P1	FAM-CCAGGTGGWACRTCATCMGGTGATGC-BBQ*
	RdRP_SARSr-P2	FAM-CAGGTGGAACCTCATCAGGAGATGC-BBQ*[2]
E	E_Sarbeco_F	ACAGGTACGTTAATAGTTAATAGCGT
	E_Sarbeco_R	ATATTGCAGCAGTACGCACACA
	E_Sarbeco_P1	FAM-ACACTAGCCATCCTTACTGCGCTTCG-BBQ*

N	2019_nCoV_N1-F	GACCCCAAAATCAGCGAAAT
	2019_nCoV_N1-R	TCTGGTTACTGCCAGTTGAATCTG
	2019_nCoV_N1-P	FAM-ACCCCGCATTACGTTTGGTGGACC-BHQ1
	2019_nCoV_N2-F	TTACAAACATTGGCCGCAAA
	2019_nCoV_N2-R	GCGCGACATTCCGAAGAA
	2019_nCoV_N2-P	FAM-ACAATTTGCCCCCAGCGCTTCAG-BHQ1

* Probe zal 2019-nCoV, SARS-CoV and vleermuis-SARS-gerelateerde CoV's detecteren
*ˢ Probe specifiek voor 2019-nCoV*** Voor PhHV primers en probe zie MOBIOL/025 PhHV Real time PCR

Referentie RdRp en E gen: Corman et al. (2020). Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by
real-time RT-PCR. *Euro Surveill. 2020;25(3)*
Referentie N gen: https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/rt-pcr-panel-primer-probes.html

3 APPARATUUR EN HULPMIDDELEN

Voor apparatuur: zie de map Apparatuur moleculaire biologie voorschriften in KIS:
MOBIOL/032 Tafelcentrifuges
MOBIOL/408 Rotorgene
MOBIOL/037 Qiagility
MOBIOL/027 Mp24
MOBIOL/050 Arrow

4 BIOLOGISCH MATERIAAL

Patiëntmateriaal:
Materiaal van de bovenste en onderste luchtwegen. Meestal keeluitstrijk, neusuitstrijk of nasopharyngeaal aspiraat (spoelsel). Soms ook BAL (Broncho-Alveolaire Lavage) of sputum. Patiëntmateriaal en RNA isolaat worden opgeslagen in de -80 °C vriezer in het daarvoor bestemde bakje, volgens de afspraken voor de Biobank.

5 WERKWIJZE REAl-TIME PCR

1. Maak alle buffers en PCR mixen in ruimte 1.
2. Gebruik pipetten en rekjes die bij de ruimte horen.
3. Wanneer meerdere soorten mixen gemaakt moeten worden op een dag moet alles in de ochtend gemaakt worden, voordat er in andere ruimtes gewerkt gaat worden.

5.1 Bereiden van de real-time PCR oplossingen (mixen)

1. Laat alle PCR-buffer oplossingen ontdooien en zorg dat ze koud blijven door ze in de koelrekken te bewaren.
2. Print etiketten via GLIMS
3. Voeg de mix toe in Labtrain volgens WI/084 Mixen maken met de Qagility en Labtrain
4. Maak de benodigde hoeveelheid PCR-mix volgens tabel 2 of gebruik de template in de Qiagility

5. Breng de mix naar ruimte 2 in een afsluitbaar plastic zakje

Tabel 2a. Primermix SARS-CoV RT-qPCR RdRp gen

GGD Streeklab primermix schema				
RdRp gen primermix	**µl uit stock per reactie**	**Concentratie in primermix**	**Concentratie in PCR mix***	**Concentratie stock oplossing**
RNAse free water	0,72			
RdRP_SARSr-F	0,12	12 µM	600 nM	100 µM
RdRP_SARSr-R	0,16	16 µM	800 nM	100 µM

* Bij een input van 1 µl primermix bij een totaal reactievolume van 20 µl in de PCR mix.

Tabel 2b. Primermix SARS-CoV RT-qPCR E gen

GGD Streeklab primermix schema				
E gen primermix	**µl uit stock per reactie**	**Concentratie in primermix**	**Concentratie in PCR mix***	**Concentratie stock oplossing**
RNAse free water	0,805			
E_Sarbeco_F	0,08	8 µM	400 nM	100 µM
E_Sarbeco_R	0,08	8 µM	400 nM	100 µM
PhHV_F	0,01	10 ng/µl	0,5 ng/µl	1 µg/µl
PhHV_R	0,025	25 ng/µl	1,25 ng/µl	1 µg/µl

* Bij een input van 1 µl primermix bij een totaal reactievolume van 20 µl in de PCR mix.

Tabel 3a: Mixschema SARS-CoV RT-qPCR RdRp gen.

Aantal mixen	1 x (in µl)
Nuclease free water	7,6
QNP Mastermix	5
IC red Probe (QNP)	1
Primermix RdRp gen*	1
RdRp_SARSr-P1 (10 µM)	0,2
RdRp_SARSr-P2 (10 µM)	0,2
Mix volume	15
Monster	5
Eindvolume	20

* Voor schema primermix zie tabel 2a

Tabel 3b: Mixschema SARS-CoV RT-qPCR E gen.

Aantal mixen	1 x
Nuclease free water	7,1
QNP Mastermix	5
IC red Probe (QNP)	1
Primermix E gen/PhHV*	1
E_Sarbeco_P1 (10 µM)	0,4
PhHV probe (20 ng/µl)	0,5
Mix volume	15
Monster	5

Eindvolume	20

* Voor schema primermix zie tabel 2b

Tabel 3c: Mixschema SARS-CoV RT-qPCR N gen.

Aantal mixen	1x
Nuclease free water	6
QNP Mastermix	5
IC red Probe (QNP)	1
Primer/probe mix N1	1,5
Primer/probe mix N2	1,5
Mix volume	15
Monster	5
Eindvolume	20

5.2 Materiaal voorbehandeling

5.2.1 Voor (droge) wattenstokken

1. Werk in de flowkast in ruimte 2b
2. Breek de stok af in het epje met het juiste ordernummer. Neusstokken (ijzer) moeten geknipt worden; maak na elke stok de kniptang schoon met verdunde glorix.
3. Pipetteer 600 µl PBS bij één witte Copan stok, 500 µl bij een flexibele wattenstok en pipetteer 700 µl PBS in een 2 ml epje indien 2 dezelfde stokken zijn ontvangen van dezelfde afnamelocatie. IJzeren stokken en droge watten stokken mogen niet samen geëlueerd worden i.v.m. remming. Schud de epjes minimaal een half uur bij kamertemperatuur in het schudapparaat.
4. In het geval van een E-swab of UTM kan het medium rechtstreeks gebruikt worden voor extractie.
5. Volg vanaf hier MOBIOL/027 Mp24 voor de extractie met de MagNA Pure 24, of MOBIOL/007 DNA/RNA Isopropanol voor isopropanol precipitatie of MOBIOL/050 Arrow voor extractie met de Arrow

5.2.2 Voor spoelsel, sputum en BAL

1. Werk in de flowkast in de research ruimte i.v.m. infectie gevaar.
2. Indien het materiaal erg visceus is, verdunnen met PBS en/of behandelen met proteïnase K. Aan 180ul materiaal wordt 20 µl Proteïnase K toegevoegd. Vervolgens wordt het materiaal ongeveer 15-20 minuten geschud bij 56°C in het heatblock.
3. Volg vanaf hier MOBIOL/007 DNA/RNA Isopropanol nucleïnezuur extractie met behulp van isopropanol precipitatie. Los het pellet op in 50 µl T10.

5.3 Inzetten van de SARS-CoV PCR.

Werk op tafel met het hierbij behorende eppenrekje in ruimte 2

1. Maak een werklijst in Glims (WI/070 Gebruik GLIMS Moleculaire biologie)
 of Labtrain (WI/079 Labtrain). Vermeld op de werklijst welke mix en batchcontrole gebruikt is. Vul 15 µl mix uit per welletje
2. Pipetteer 5 µl monster bij de verschillende te gebruiken PCR mix(en).
3. Pipetteer 5 µl van de negatieve extractie controle (NEC) bij de PCR mix(en).
4. Pipetteer voor de positieve controle 5 µl SARS-CoV-2 controle RNA bij de PCR mix(en). Pipetteer ook 5 µl PhHV positieve controle bij de E gen mix.
5. Pipetteer voor de negatieve controle 5 µl T10 bij de PCR mix(en).
6. Meng de mixen en breng ze naar de RotorGene
7. Plaats de mixen in de RotorGene en start programma RNA 2 staps PCR (tabel 4a). In bijzondere gevallen kan er ook gebruik gemaakt worden van het RNA 3 staps programma (tabel 4b).

Tabel 4a: PCR programma RNA 2 staps PCR.

Aantal cycli	Tijd	Temperatuur in °C
Hold	15 min	50
Hold	2 min	95
45	15 sec	95
	30 sec	60*

Tabel 4b: PCR programma RNA 3 staps PCR.

Aantal cycli	Tijd	Temperatuur in °C
Hold	15 min	45
Hold	2 min	95
45	15 sec	95
	30 sec	50
	30 sec	60*

* Acquiring on green, orange en red: meet de fluorescentie in de kanalen groen (SARS-CoV), oranje (PhHV) en rood (IC red QNP).

6 VERWERKING VAN DE RESULTATEN

6.1 Interpretatie

Voor het juist interpreteren van de curves in het Rotorgene bestand zijn een aantal regels nodig. Stel de treshold in het begin in op 0,04; als de basislijnen boven de treshold uit komen kan de treshold wat hoger gelegd worden.

1. De negatieve controle moet negatief zijn; dit is het geval als er geen Ct-waarde of een Ct-waarde van boven de 40 cycli is.
2. De positieve controle moet een mooie sigmoïde curve hebben met een Ct-waarde kleiner dan 36. De validatiegrenzen van de positieve controle staan ingesteld in Labtrain, wanneer de PC afwijkt en overruled moet worden, mag dit alleen in overleg met de MMM'er of senior analist.
3. Voor elk monster dienen de interne- en/of remmingscontroles, PhHV en/of IC red QNP, positief te zijn: er is een mooie curve en Ct<36
4. Indien de PhHV en de IC red QNP negatief zijn, maar het target positief, dan is de target uitslag positief.
5. Indien de PhHV en de IC red QNP negatief of dubieus zijn en het target negatief in de eerste E-gen PCR, dan is er sprake van remming of mislukte isolatie en moet het monster herhaald worden. Maak bij voorkeur een nieuw isolaat en test dit met zowel de E-gen PCR als met de N gen PCR. Zie ook WI/052 herhalen van individuele monsters in de moleculaire diagnostiek De uitslag van de herhalingstesten staat in onderstaande tabel.
6. Als de controles goed zijn dan kunnen de monsters op de volgende manier geïnterpreteerd worden:

Een monster is positief voor het target als er een mooie sigmoïde curve is die voor 36 cycli opkomt en dus een Ct waarde heeft van 36 of lager. Alles wat na de 40 cycli opkomt is negatief. Curves die tussen de 36 en 40 cycli opkomen en/of niet mooi sigmoïde zijn of erg laag blijven in de fluorescentie zijn dubieus en moeten herhaald worden in het E gen én de N gen bevestiging PCR.

Na herhaling is interpretatie van de monsters als volgt:

		Uitslag in Glims	**Uitslag in CoronIT**
E2-gen	**N2-gen**	**SARS Coronavirussen bevestiging**	**SARS Coronavirussen bevestiging**

		(N-gen)	(N-gen)
negatief	negatief	negatief	Negative
positief	negatief	dubieus	Indeterminate
negatief	positief	dubieus	Indeterminate
positief	positief	positief	Positive
dubieus	negatief	dubieus	Indeterminate
dubieus	positief	positief	Positive
dubieus	dubieus	positief	Positive
positief	dubieus	positief	Positive
negatief	dubieus	dubieus	Indeterminate
geremd	geremd	geremd	Indeterminate
geremd	negatief	geremd	Indeterminate
geremd	positief	dubieus	Indeterminate
geremd	dubieus	geremd	Indeterminate
negatief	geremd	geremd	Indeterminate
positief	geremd	dubieus	Indeterminate
dubieus	geremd	geremd	

6.2 De administratieve verwerking van de resultaten

1. Noteer de interpretatie gegevens op het werkformulier.
2. Valideer de resultaten in Labtrain volgens WI/079 Labtrain of voer handmatig in GLIMS in volgens PROC/042 Gebruiksaanwijzing GLIMS
3. Bijzondere positieve uitslagen altijd overleggen met moleculair microbioloog of andere moleculair biologisch analist en indien nodig door laten bellen door de dienstdoende arts-microbioloog.
4. Berg de formulieren op in de bijbehorende map in de analisten kamer.

7 KWALITEITSCONTROLE

Bij de revisie van deze SOP is vastgesteld dat de beschreven onderzoeksmethode voldoet aan de medisch diagnostische doeleinden.

1. Voor deze test worden 2 positieve controles meegenomen. Voor SARS-CoV-2 is dat 5 µl SARS-CoV-2 (BetaCoV/Germany/BavPat1/2020) RNA en voor PhHV 5 µl kweeksuspensie DNA. Er moet hiervan een batch gemaakt worden met ingangswaarden tussen CT 25 en 32. Deze staat gedocumenteerd in labtrain.
2. De negatieve controle is 5 µl T10
3. NEC is een controle die meegenomen wordt om de buffers en chemicaliën te controleren op contaminatie.
4. Voor deze PCR wordt meegedaan aan kwaliteitsrondzendingen zoals QCMD en/of Instand.

8 SAMENHANGENDE DOCUMENTEN (overige links in 'waarmee')

Richtlijn moleculaire biologie diagnostiek van infectieziekten

1. Corman et al., Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by

real-time RT-PCR. Eurosurveillance 2020

Validatierapporten op de U-schijf (U:\IZ\Streeklab_Algemeen\VALIDATIES apparaten en methoden\Validatieverslagen Moleculair):
-Validatierapport 2019 nCoV SARS-2 coronavirus PCR_AC_200312
-Validatierapport 2019 nCoV N-gen SARS-2 PCR 26-3-20

https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/rt-pcr-panel-primer-probes.html

Naam evaluator(en): [redacted]

Revisietermijn: 1 jaar

Identificatie van inhoudelijke wijzigingen ten opzichte van de vorige opsteldatum
N-gen PCR toegevoegd
T10+RNasin gewijzigd naar T10
Primermixschema's voor primers gekregen van het RIVM verwijderd
Test algoritme toegevoegd
Tabel met interpretatie toegevoegd

	Relatiecategorie	Kenmerk	Naam	Van
	Waarmee		Apparatuur algemeen gebruik	Apparatuurvoorschriften
	Waarmee		MOBIOL/007 DNA/RNA Isopropanol	Moleculaire biologie analysevoorschriften
	Waarmee		MOBIOL/008 RNA TriPure Isolation Reagent	Moleculaire biologie analysevoorschriften
	Waarmee		PROC/012 Splitsen van monsters	Primair proces
	Waarmee		Validaties moleculaire biologie	Validatieverslagen overzichten
	Waarmee		MOBIOL/032 Tafelcentrifuges	Apparatuur moleculaire biologie
	Waarmee		M7: 70% of 75% Ethanol	Moleculaire biologie bereidingsvoorschriften
	Waarmee		MOBIOL/011 PIV 1 en 3 nested PCR	Moleculaire biologie analysevoorschriften
	Waarmee		WI/070 Gebruik GLIMS Moleculaire biologie	Mol. biologie werkinstructies
	Waarmee		MOBIOL/037 Qiagility	Apparatuur moleculaire biologie
	Waarmee		M23 100 mM tris-buffer	Moleculaire biologie bereidingsvoorschriften
	Waarmee		WI/079 Labtrain	Mol. biologie werkinstructies
	Waarmee		M26: T10 + RNasin	Moleculaire biologie bereidingsvoorschriften
	Waarmee		M27:Lysisbuffer met glycogeen	Moleculaire biologie bereidingsvoorschriften
	Waarmee		WI/018 Logistiek Corona	Algemeen werkinstructies
	Waarmee		WI/019 Corona aanvragen	Algemeen werkinstructies
	Waarmee		WI/142 Corona pre analyse	Algemeen werkinstructies
	Waarmee		MOBIOL/408 Rotorgene	Apparatuur moleculaire biologie
	Waarmee		MOBIOL/028A inflA RT-Real time PCR	Moleculaire biologie analysevoorschriften
	Waarmee		PROC/071 Telefonisch doorgeven (voorlopige) uitslagen	Primair proces
	Waarmee		MOBIOL/029 Adeno real time PCR	Moleculaire biologie analysevoorschriften
	Waarmee		MOBIOL/033B Entero RT-Real time PCR	Moleculaire biologie analysevoorschriften

Waarmee		MOBIOL/034 Rhinovirus RT-Real time PCR	Moleculaire biologie analysevoorschriften
Waarmee		PROC/110 Pre-analyse	Primair proces
Waarmee		MOBIOL/036 Infl B RT-Real time PCR	Moleculaire biologie analysevoorschriften
Wie		Medisch Moleculair microbioloog (MMM)	MT
Wanneer		Revisie 2022 / 09	SL
Hyperlink in		Wijzigingsverslag maart 2020 versie 23027/23028	Wijzigingsverslagen
Hyperlink in		Wijzigingsverslag september 2020 versie 23034/Oktober 23035	Wijzigingsverslagen

Detailproces (Sociaal)	
Proceseigenaar	Hoofdanalist moleculaire biologie
Status	Definitief
Versie datum	
Vastgesteld	
Vastgesteld door	Medisch Moleculair microbioloog (MMM)
Revisie datum	
Interne audit	
Versienummer	
Opgesteld door	