PROC/023/B_Werkformulier validatie nieuwe analysemethode
Plan van Aanpak- uitvoering- rapportage-implementatie traject
Onderwerp: Opzetten Orthopox/Monkeypox qPCR
Datum30/05/2022

Plan van Aanpak

- **Validatie zal uitgevoerd worden door** 5.1,2,e

  5.1,2,e

- **Acceptatiecriteria**

  Technische validatie

  □ Limiet van detectie komen overeen met de resultaten van Amsterdam UMC, verkregen MPX materiaal (DNA)

  □ Resultaten van her AUMC panel komen 100% overeen

  □ Specificiteitpanel laat geen positieve signalen zien in orthopox PCR (herpes. VZV, Chlamydia, Gonorroea, syfilis) (NPV)

- **Parameters die getest moeten worden volgens criteria**

  □ 3 verschillende MPX PCR in twee verschillende condities QNP en SupermixUDG

  □ 1orthopox PCR in QNP en Supermix UDG

- **Materialen die getest moeten worden en een geschatte hoeveelheid**

  □ **pos samples GGD** (inclusief verdunningsreeks) Hoeveelheid ± 2
  □ pos samples AUMC(inclusief verdunningsreeks) Hoeveelheid ± 1
  □ Panel AUMC Hoeveelheid ± 7

- **Benodigde reagentia t.b.v. de validatie en een geschatte hoeveelheid**

  □ _____ Hoeveelheid ± _____
  □ _____ Hoeveelheid ± _____
  □ _____ Hoeveelheid ± _____
  □ _____ Hoeveelheid ± _____

- **Tijdbestek** _____ **weken / maanden**

- **Formuleer de actie(s) bij discrepanties**

  □ _____
  □ _____
  □ _____

- **Parafeer voor akkoord plan van aanpak**

  □ Hoofd Streeklab _____ Datum _____
  ☒ Arts microbioloog 5.1,2,e Datum 16/6/2022
  ☒ Moleculair microbioloog 5.1,2,e Datum 16/6/2022
  ☒ Leidinggevende _____ Datum 16/6/2022

Evaluatie validatierapport en implementatie

- **Parafeer voor akkoord eindrapport**
  - ☐ Hoofd Streeklab _____ Datum _____
  - ☒ Arts microbioloog 5.1,2,e _____ Datum 16-6-2022
  - ☒ Moleculair microbioloog 5.1,2,e _____ Datum 16/6/2022
  - ☐ Leidinggevende _____ Datum _____

- **Implementatie acties**
  - ☒ SOP in KIS _ NVT → zie klinische validatie
  - ☐ Nieuwe inwerkonderdelen op laten nemen Kwalificatiematrix NVT
  - ☐ Nieuwsbrief item "
  - ☐ Website Streeklaboratorium "
  - ☐ Vermelding op andere websites zoals WMDI onder NVMM "
  - ☐ Risico analyse bijwerken "
  - ☐ Nieuw scope-element JA/NEE, indien JA melden aan kwaliteitsadviseur

- Datum in gebruikname
  14/6/2022

PROC/023/B_Werkformulier validatie nieuwe analysemethode
Plan van Aanpak- uitvoering- rapportage-implementatie traject
Onderwerp: Orthopox/Monkeypox qPCR klinische validatie
Datum 07/06/2022

Plan van Aanpak

- **Validatie zal uitgevoerd worden door**

5.1,2,e

Dubbeldraaien van MPX PCR met Amsterdam UMC tot 10 positieve patiënten.

- **Acceptatiecriteria**

  Klinische validatie

  □ Uitslagen patiënt (pos/neg) komen 100% overeen met uitslagen Amsterdam UMC

  □ Uitslagen afnamelocaties komen >96% overeen, Ct waarden van gemiste afnamelocaties mogen niet Ct <36 zijn

- **Parameters die getest moeten worden volgens criteria**

  □ 3 afnamelocaties per patiënt (droge stok van blaasje, anus, keel)

  □ AUMC draait specifieke Monkeypox PCR

  □ GGD Amsterdam Streeklaboratorium draait Monkeypox PCR, en ter uitbreiding technische validatie Orhopox PCR er naast

- **Materialen die getest moeten worden en een geschatte hoeveelheid**
  □ 3 afnamelocaties per patiënt (droge stok) 10 POS patiënten
  □ 3 afnamelocaties per patiënt (droge stok) 30 NEG patiënten

- **Benodigde reagentia t.b.v. de validatie en een geschatte hoeveelheid**
  □ ___Supermix UDG_____ Hoeveelheid ± _100_____
  □ ___MP24 kits _____ Hoeveelheid ± _100_____
  □ _____ Hoeveelheid ± _____
  □ _____ Hoeveelheid ± _____

- **Tijdbestek** ____1_____ **week**

- **Formuleer de actie(s) bij discrepanties**
  X__Overleg met AM en MMM_____
  X Herhalingen of meer monsters includeren
  □ _____

- **Parafeer voor akkoord plan van aanpak**
  □ Hoofd Streeklab _____ Datum _____
  ☒ Arts microbioloog 5.1,2,e _____ Datum 16-6-2022
  ☒ Moleculair microbioloog 5.1,2,e _____ Datum 16/6/2022
  ☒ Leidinggevende 5.1,2,e _____ Datum 16/6/2022

Evaluatie validatierapport en implementatie

- **Parafeer voor akkoord eindrapport**
  - ☐ Hoofd Streeklab _____ Datum _____
  - ☒ Arts microbioloog 5.1,2,e _____ Datum 16-6-2022
  - ☒ Moleculair microbioloog 5.1,2,e Datum 16/6/2022
  - ☐ Leidinggevende _____ Datum _____

- **Implementatie acties**
  - ☒ SOP in KIS → scp gaat per 1 juli 2022 in KIS
  - ☒ Nieuwe inwerkonderdelen op laten nemen Kwalificatiematrix
  - ☒ Nieuwsbrief item
  - ☒ Website Streeklaboratorium
  - ☐ Vermelding op andere websites zoals WMDI onder NVMM WMD/
  - ☒ Risico analyse bijwerken
  - ☐ Nieuw scope-element JA/NEE, indien JA melden aan kwaliteitsadviseur

- Datum in gebruikname 17-06-2022

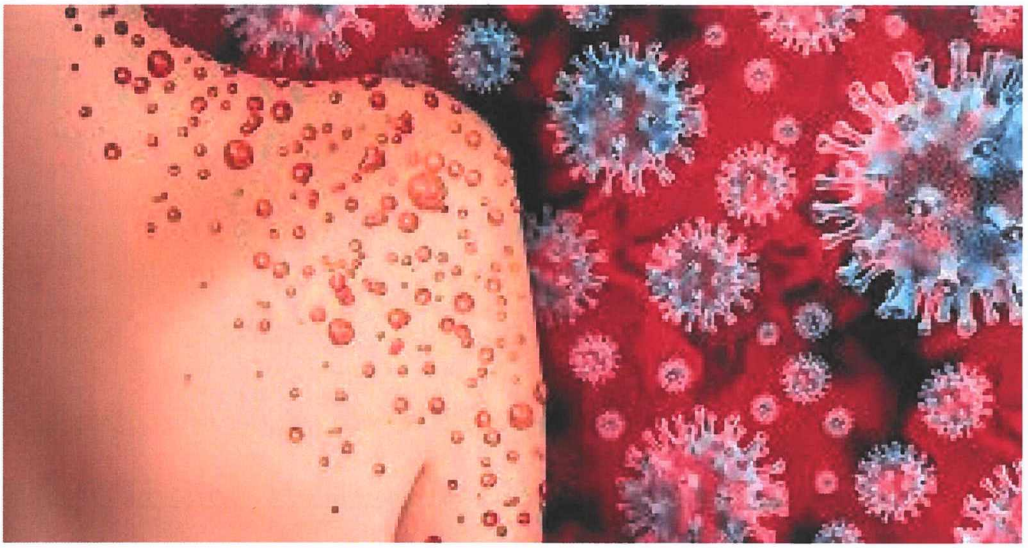
akkoord

5.1,2,e

20/06/22

Validatieverslag Monkeypox (MpX) PCR

16-06-2022



Uitgevoerd door:

5.1,2,e *(MMMi.o.)*

5.1,2,e

5.1,2,e

5.1,2,e

5.1,2,e

Eind verantwoordelijke: 5.1,2,e MMM

Achtergrond

Monkeypoxvirus (monkeypoxV) is een zoönotische infectie van het genus orthopoxvirus waar ook het pokkenvirus (variolavirus) toe behoort. Het ziektebeloop is doorgaans mild. Monkeypox is een pokkenvirus en het komt vooral voor in landen in West-Afrika en Midden-Afrika. In mei 2022 werd de ziekte bij mensen in Europa vastgesteld die geen directe link met de gebieden in Afrika hadden. Dat betekent dat de ziekte zich in Europa verspreidt. Om verspreiding tegen te gaan is snelle diagnostiek d.m.v. real-time qPCR van groot belang. Vanuit de literatuur zijn meerdere PCR testen besteld en deze worden besproken in dit validatieverslag.

Het verslag bestaat uit een technisch en een klinische validatie gedeelte.

Bestelde Primers en probe(s), incl. literatuur

1) Orthopoxvirus PCR

Multicolour, multiplex real-time PCR assay for the detection of human-pathogenic poxviruses
K. Schroeder, A. Nitsche. Mol Cell Probes . 2010 Apr;24(2):110-3.

OPV F	*TAATACTTCgATTgCTCATCCAgg*
OPV R	*ACTTCTCACAAATggATTTgAAAATC*
OPV probe	*FAM-TCCTTTACgTgATAAATCAT - NFQ MGB*

2) Monkeypox F3L

Species-specific differentiation of variola, monkeypox, and varicella-zoster viruses by multiplex real-time PCR assay
R. A. Maksyutov, E. V. Gavrilova, S. N. Shchelkunov. Journal of Vir Methods 236 (2016) 215–220

MPXV F3L probe	*FAM-5∗-TGTAGGCCGTGTATCAGCATCCATT-3∗-BHQ1*
MPXV F3L upper	*5∗-CATCTATTATAGCATCAGCATCAGA-3∗*
MPXV F3L lower	*5∗-GATACTCCTCCTCGTTGGTCTAC-3∗*

3) Monkeypox (G2R G) generic

Real-time PCR assays for the specific detection of monkeypox virus West African and Congo Basin strain DNA.
Y. Li et al. Journal of Virological Methods 169 (2010) 223–227

MPXV generic forward primer (5'-GGAAAATGTAAAGACAACGAATACAG),
MPXV generic forward primer (5'-GGAAAGTGTAAAGACAACGAATACAG),
MPXV generic reverse primer (5'-GCTATCACATAATCTGGAAGCGTA),
MPXV generic reverse primer (5'-GCTATCACATAATCTGAAAGCGTA),
MPXV generic probe sequence (5'FAM-AAGCCGTAATCTATGTTGTCTATCGTGTCC-3'BHQ1).

De rode nucleotide zijn polymorfismen; deze primers zijn apart besteld.

4) Monkeypox N3R

Monkeypox virus detection in rodents using real-time 30-minor groove binder TaqMan assays on the Roche LightCycler.
David A Kulesh; Laboratory Investigation (2004) 84, 1200–1208

N3R-F319	*AAC AAC CGT CCT ACA ATT AAA CAA CA*
N3R-R457	*CGC TAT CGA ACC ATT TTT GTA GTC T*
N3Rp352S-MGB	*6FAM- TAT AAC GGC GAA GAA TAT ACT- MGBNFQ*

Werkwijze

Technische Validatie

I.v.m. met langere levertijd van de MGB probes zijn assay 2 & 3 eerder ingezet.

Experiment 1. Test Assay 2 & 3 in PCR master mix A) Supermix UDG (invitrogen), en B) QNP (Qiagen).
Experiment 2. Bepalen van detectielimiet op positief materiaal incl.controle materiaal AMC.
Experiment 3. Test duplex PCR met PHhV van geselecteerde PCR (3 Generic)
Experiment 4. Specificiteitspanel Geselecteerde PCR
Experiment 5. Test Orthopox PCR (OPV, PCR nr 1)
Experiment 6. Test Monkeypox (N3R, PCR nr 4)
Experiment 7. Panel controle materialen AUMC

Opzet PCR

Er is gekozen om 2 verschillende PCR mastermixen te testen: QNP mastermix en Supermix UDG.

In de routine wordt voor de herpes/VZV/TP de Supermix UDG PCR mastermix gebruikt.
De QNP mastermix wordt NIET gebruikt voor de MGB assays (1 & 4) i.v.m. slechte ervaring van de combinatie QNP en MGB probes.

De experimenten zijn gedaan op de volgende materialen

Materiaal 1 ***26702
Materiaal 2 ***66302
Materiaal 3 AMC-MPX (CT ~25) (Geïncludeerd om limiet van detectie te kunnen vergelijken)

Mixschema's Assay's zie Bijlage 1

1) ***Orhopoxvirus (OPV) PCR***
2) ***Monkeypox F3L***
3) ***Monkeypox (G2R G) generic,***
4) ***Monkeypox N3B***

Klinische Validatie

Deel 1

Dubbel draaien droge stokken AUMC en GGD Streeklaboratorium
Hiervoor zijn er dubbele afnames op 3 anatomische locaties (Anus, Keel, Ulcus) gedaan.
Eén set afnames is direct naar het AMC gestuurd, één set afnames is bij Streeklaboratorium, GGD Amsterdam verwerkt.
Op AUMC wordt de F3L PCR (nr 2) en Generic PCR (nr 3) naast elkaar gerund.
Op het GGD Streeklaboratorium wordt de Generic PCR (nr 3) en de Orthopox PCR (nr 1) uitgevoerd.

Deel 2
Dubbeldraaien van PCR afname materiaal dat is over-gepipetteerd in Lysisbuffer buizen en daarna zowel op AUMC als op GGD Streeklaboratorium is gedraaid. Voor het tweede deel is op de GGD alleen de MPX Generic PCR (Nr 3) gedaan.

Opzet PCR Klinische validatie

Er is gekozen om 2 verschillende PCRs te testen op het GGD Streeklaboratorium

Details over de verschillende PCRs zijn te vinden in genoemde literatuur.

Nr 1: Orhopoxvirus (OPV) PCR
Nr 3: Monkeypox (G2R G) generic PCR= MPX PCR

Protocol

1) Elueer iedere stok in 600 µl PBS – schud gedurende 30 min.
2) Pipeteer 200 µl PBS in 3 mL Molgen Lysisbuffer, mix goed.
3) *Alleen voor deel 2* Pipeteer 200 µl PBS in epje lysisbuffer AMC
4) Pipeteer 500 µl van de molgen Lysis over in een draaidop epje voor extractie met de MP24 (gebruik het 'Pathogen 200 protocol', elutie in 50ul)
5) Gebruik 2 µl eluaat per PCR (DNA 2-staps) :

   MPX-PCR 18µl mix 2µl DNA
   OPV- PCR 18µl mix 2µl DNA
   PHhV 15µl mix 2µl DNA 2µl PHhV spike

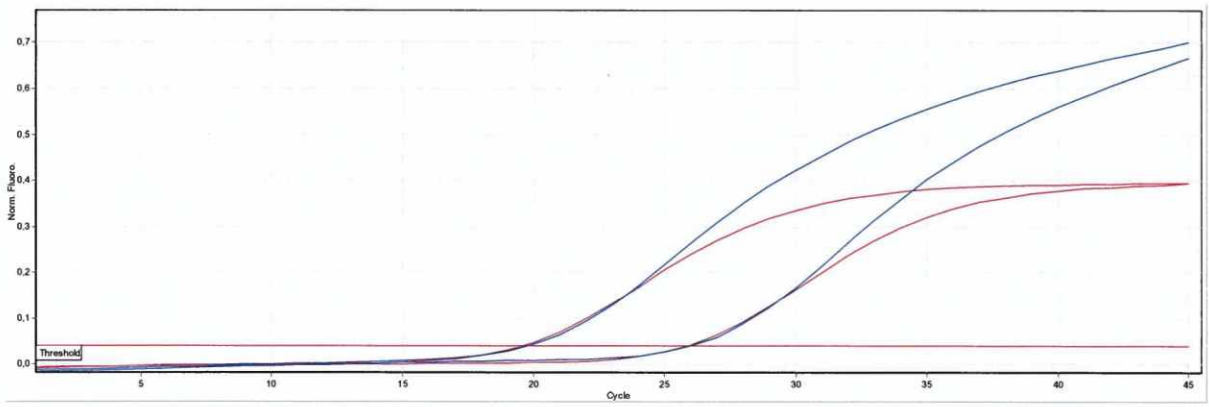
Resultaten Technische validatie

Experiment 1

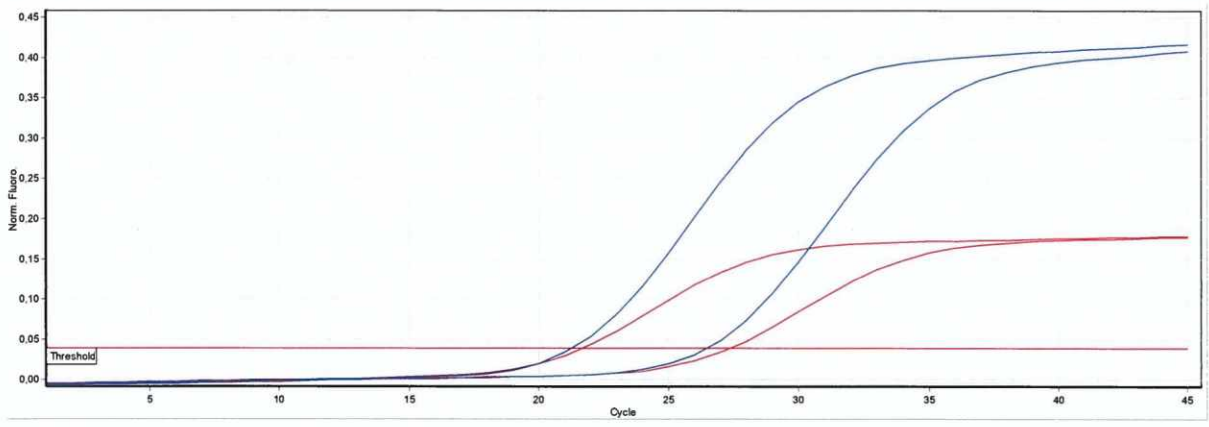
In Experiment 1 zijn de specifieke monkeypox Assay's 2 (blauwe lijnen) en 3 (rode lijnen) (Figuur 1 & 2) met elkaar vergeleken op 2 positieve materialen van GGD Amsterdam. De Ct waarden zijn met de Supermix UDG ongeveer 2 Ct waarden lager t.o.v. van de 2 monsters in QNP mastermix. Met het eventueel aanpassen zouden de Ct waarden wat omlaag gehaald kunnen worden, dit volgt uit vervolg experimenten. De PCR curves zijn allemaal naar wens, met uitzondering van de F3L primers in de Supermix UDG (blauwe lijnen figuur 1), deze buigen te snel af, maar dit heeft geen invloed op de Ct waarden.

Tabel 1. Resultaten experiment 1 Ct waarden.

		SUPERMIX UDG	QNP
Name	Type	Ct	Ct
5.1,2,e	Generic primers	19,61	21,72
	Generic primers	25,89	27,43
	F3L primers	19,82	21,32
	F3L primers	26,04	26,52



Figuur 1. Supermix UDG met Generic primers (rood), F3L (blauw)



Figuur 2. QNP met Generic primers (rood), F3L (blauw)

Conclusie experiment 1: Zowel Supermix UDG als de QNP mix zijn bruikbaar voor beide primersets. De F3L primers (PCR nr2) geven de beste curves.

Experiment 2

In experiment 2 is de limiet van detectie bepaald voor de beide mastermixen in een 10-stapsverdunningsreeks, waarbij 10^0het onverdunde materiaal is.
PCR 2: Monkeypox F3L in QNP en Supermix UDG
PCR 3: Monkeypox (G2R G) generic in Supermix UDG

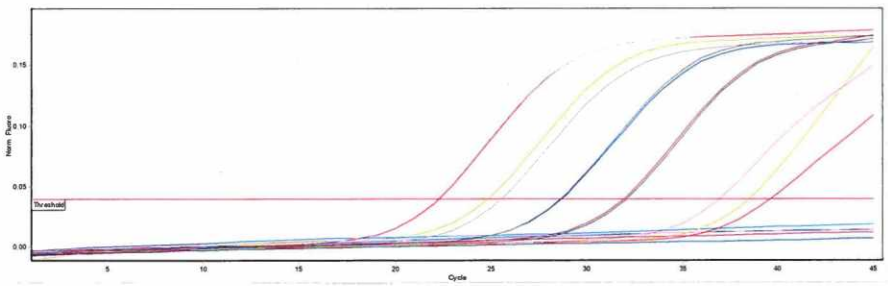
De verschuiving van de Ct waarden hebben inderdaad effect op de limiet van de detectie. Voor monster ***26702 met de supermix UDG is de detectielimiet verdunning 10^5 (2/2) met gemiddelde 35,95, waarbij detectielimiet van QNP verdunning 10^5 (1/2) met Ct van 38,52 is. Voor monster MPX-AMC is de detectielimiet verdunning 10^6 (1/2) met Ct waarden 38.9 Generic QNP en 35.93 Generic Supermix UDG. Voor F3L in QNP is de detectie limiet verdunning 10^5 (2/2) met een gemiddelde Ct 34.1 (Tabel 1). Detectielimiet van F3L QNP is gelijk aan die van de generic QNP, maar geeft lagere Ct waarden.

Tabel 2. Resultaten experiment 1 Ct waarden, 10-stapsverdunningsreeks.

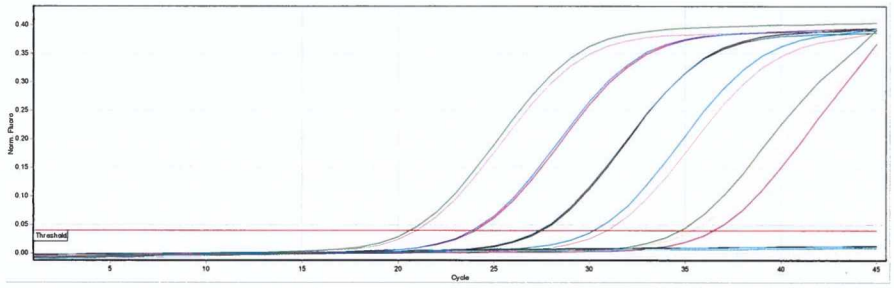
			10^0	10^1	10^2	10^3	10^4	10^5	10^6
5.1,2,e	QNP	Generic	22.29	24.88	28.7	31.91	36.96	neg	neg
	QNP	Generic	22.22	25.55	28.65	32.05	39.65	38.52	neg
	SupermixUDG (DNA2staps)	Generic	20.25	23.36	26.7	30.1	34.54	36.12	neg
	SupermixUDG (DNA2staps)	Generic	19.85	23.67	26.94	30.29	34.17	35.77	neg
	QNP	F3L	20.66	24.05	27.5	30.23	35.4	neg	neg
	QNP	F3L	20.98	23.89	27.37	30.91	34.76	36.5	neg
	SupermixUDG (DNA2staps)	F3L	NA	NA	NA	NA	NA	NA	neg
	SupermixUDG (DNA2staps)	F3L	NA	NA	NA	NA	NA	NA	neg
MPX-AMC	QNP	Generic	NA	NA	25.74	29.03	32.58	36.55	neg
MPX-AMC	QNP	Generic	NA	NA	25.88	29.19	32.72	37.26	38.9
MPX-AMC	SupermixUDG (DNA2staps)	Generic	NA	NA	24.7	27.63	31.8	34.25	neg
MPX-AMC	SupermixUDG (DNA2staps)	Generic	NA	NA	24.56	27.62	31.65	36.02	35.93
MPX-AMC	QNP	F3L	NA	NA	23.97	27.19	30.59	33.75	neg
MPX-AMC	QNP	F3L	NA	NA	24.09	27.12	30.76	35.4	neg
MPX-AMC	SupermixUDG (DNA2staps)	F3L	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
MPX-AMC	SupermixUDG (DNA2staps)	F3L	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA

De curves zien er allemaal goed uit de geteste primersets, weergegeven in figuur 3a t/m 3f.

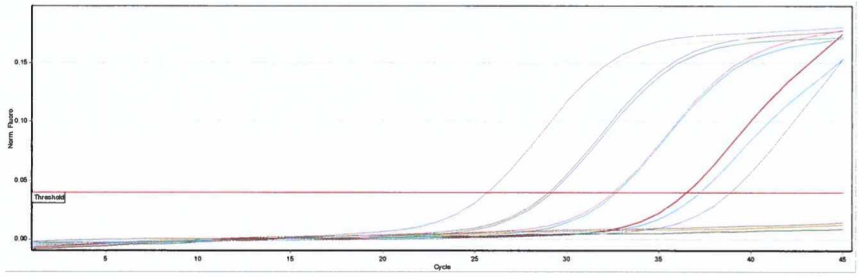
Figure 3. Verdunningsreeksen verschillende primer-probe paren: a. Assay 3 Generic QNP monster, b. Assay 2 F3L QNP Monster 5.1,2,e c. Assay 3 Generic QNP monster MPX-AMC, d. Assay 3 Generic QNP, e.Assay 3 Generic supermix Monster 5.1,2,e f. Assay 2 F3L monster MPX-AMC



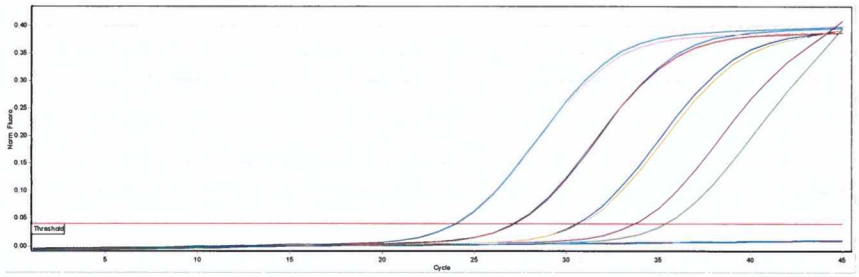
a. Assay 3 Generic QNP monster 5.1,2,e



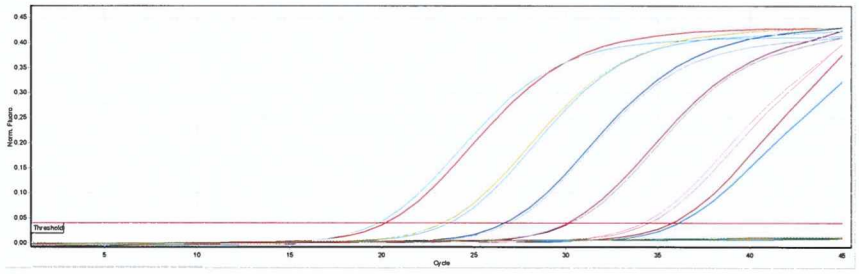
b. Assay 2 F3L QNP Monster 5.1,2,e



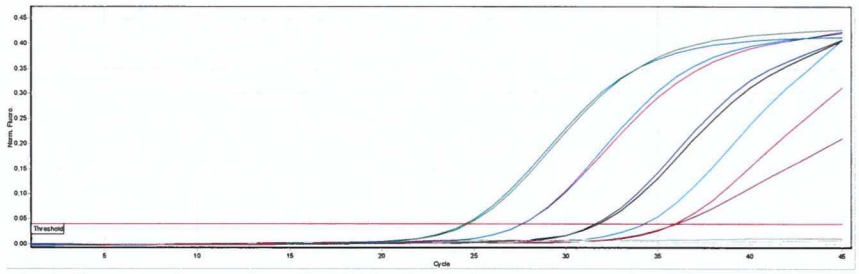
c. Assay 3 Generic QNP monster MPX-AMC



d. Assay 3 Generic QNP



e. Assay 3 Generic supermix Monster 5.1,2,e



f. Assay 2 F3L monster MPX-AMC

Op basis van de combinatie van detectielimiet en amplificatiecurves wordt er gekozen voor de generic primers assay 3 in Supermix UDG dit met bijkomend voordeel dat de HSV/VZV in hetzelfde protocol worden gerund, deze diagnostiek zal naar verwachting vaak in combinatie met MPX worden aangevraagd.

Experiment 3

Duplex mix met PhHV IC, het toevoegen van de PHhV IC in een duplex mix heeft invloed op de Ct waarden van de lagere verdunningen (verschuiving 1 á 3 Ct) waardoor mogelijk detectie van laagpositieven in gevaar komt en mogelijk gemist worden. In de single PCR 26702 10^4 lijkt er een pipeteerfout gemaakt te zijn. Zie figuren 4A en 4B.

Tabel 3. Resultaten experiment 3, 10 staps verdunningen, Ct waarden in 3-voud.

			10^0	10^1	10^2	10^3	10^4	10^5	10^6
5.1,2,e	SupermixUDG (DNA2staps)	Generic single MPX	20.01	23.41	26.83	30.04	?		
	SupermixUDG (DNA2staps)	Generic Duplex MPX	20.05	23.54	26.85	30.12	39.1		
	SupermixUDG (DNA2staps)	Generic Duplex MPX	20.05	23.52	26.84	30.51	38.03		
	SupermixUDG (DNA2staps)	Generic Duplex MPX	20.1	23.49	26.91	30.73	39.72		
	SupermixUDG (DNA2staps)	Generic Duplex PhhV	26.27	24.78	24.59	24.72	24.84	24.82	24.87
	SupermixUDG (DNA2staps)	Generic Duplex PhhV	26.17	24.26	24.65	24.71	24.68	24.82	24.85
	SupermixUDG (DNA2staps)	Generic Duplex PhhV	26.04	24.61	24.78	24.69	24.81		
MPX-AMC	SupermixUDG (DNA2staps)	Generic single			24.47	26.97	31.55	34.29	
MPX-AMC	SupermixUDG (DNA2staps)	Generic Duplex MPX			24.49	27.26	32.34	37.97	
MPX-AMC	SupermixUDG (DNA2staps)	Generic Duplex MPX			24.59	27.19	32.28	38.44	
MPX-AMC	SupermixUDG (DNA2staps)	Generic Duplex MPX			24.61	27.22	32.97	37.76	
MPX-AMC	SupermixUDG (DNA2staps)	Generic Duplex PhhV			24.54	24.68	24.85	24.88	24.63
MPX-AMC	SupermixUDG (DNA2staps)	Generic Duplex PhhV			24.51	24.65	24.86	24.71	24.71
MPX-AMC	SupermixUDG (DNA2staps)	Generic Duplex PhhV			24.47	24.75	24.67	24.66	24.8

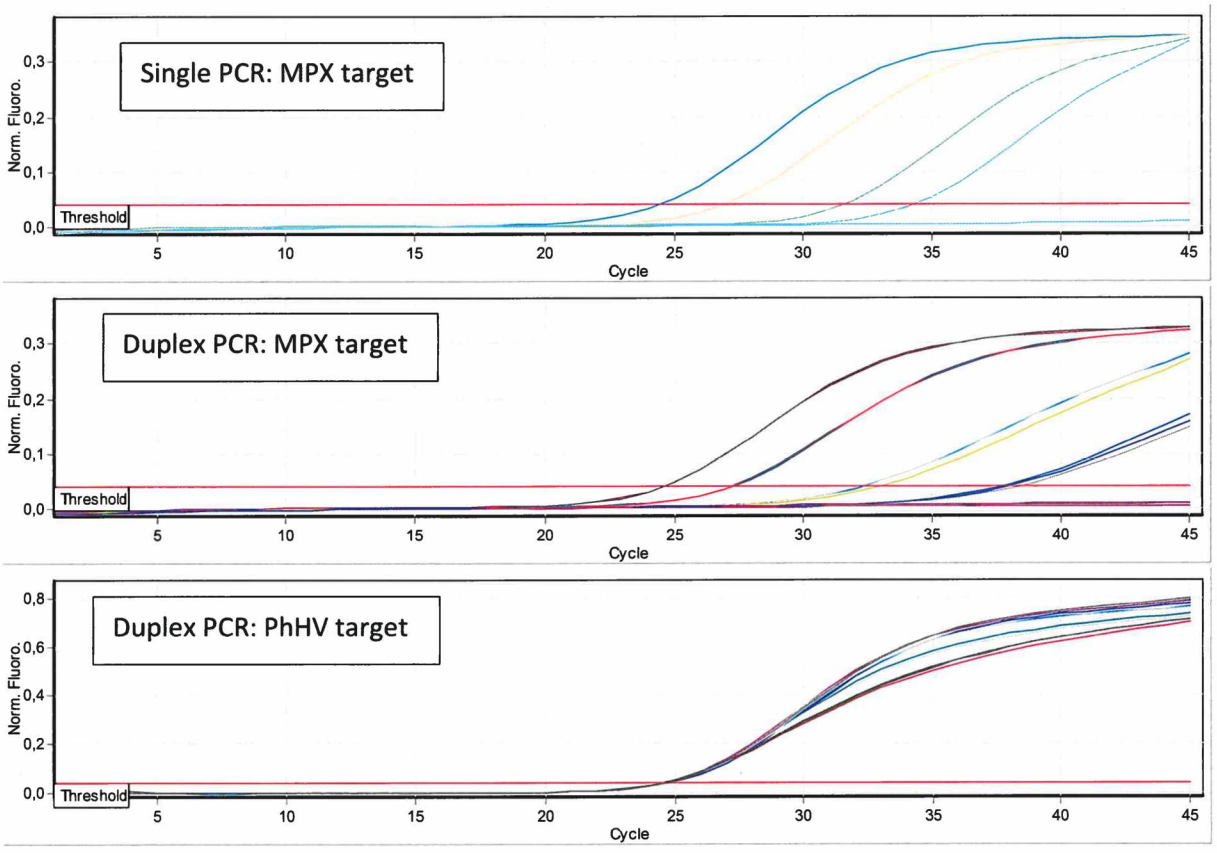


Figure 4A. Single MPX & Duplex MPX-PhHV monster MPX- AMC

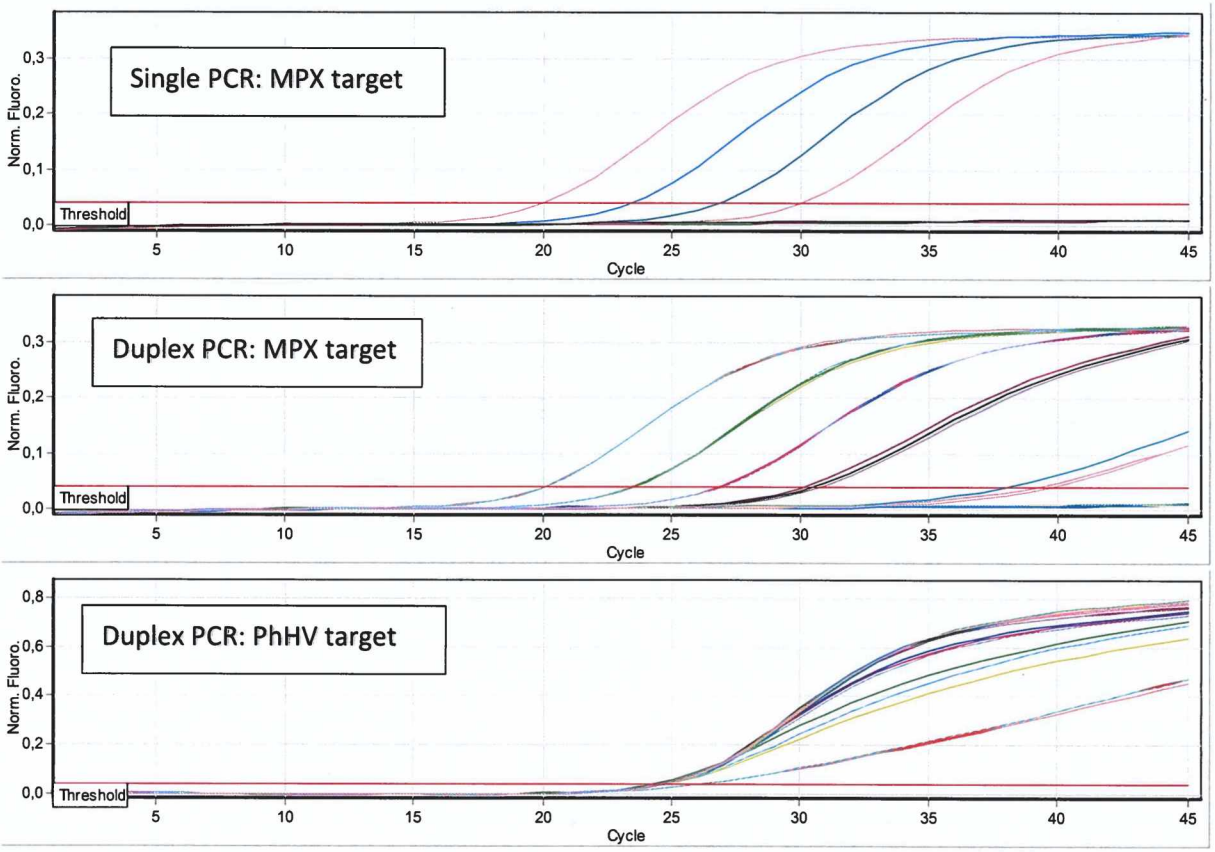


Figure 4B. Single MPX & Duplex MPX-PhHV monster 5.1.2,e

Conclusie experiment 3: PhHV is bruikbaar als IC maar kan problemen geven bij lage load mosters.

Experiment 4

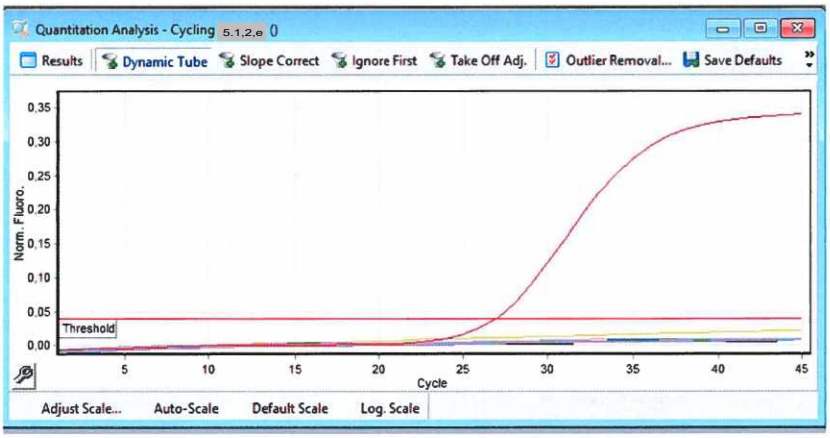
Specificiteitspanel, er is een panel van targets bedacht in het kader van Monkeypox diagnostiek. De uitkomsten met Ct waarden zijn weergegeven in Tabel 4.

Tabel 4. Specificiteitspanel

	Monster		*Originele target Ct*	*MPX PCR*
1	5.1.2,e	HSV1	*17,91*	*neg*
2		HSV1	*14,65*	*neg*
3		HSV2	*21,28*	*neg*
5		HSV2	*17,82*	*neg*
6		VZV	*17,16*	*neg*
7		VZV	*25,39*	*neg*
8		neg HSV	-	*neg*
9		Ng OPA	*20,95*	*neg*
10		Ng Opa	*17,82*	*neg*
11		Chlamydia	*16,23*	*neg*
12		Chlamydia	*18,97*	*neg*
13		N.typ		*neg*
14		TP	*27,92*	*neg*

15	5.1,2,e	TP	26,16	neg
16		TP neg		neg
17		Entero	NB	neg
18		HCV	NB	neg
19		HIV	NB	neg
20		PC		26,92

Alleen de positieve controle voor Monkeypox (Ct 26,92)komt op, geen van de andere targets zijn positief.



Figuur 5. Resultaten MPX generic PCR specificiteitspanel

Conclusie: de MPX PCR is 100% specifiek op basis van relevante targets.

Experiment 5

Orthopox PCR

De Ct waarden van de orthopox PCR zijn wat lager t.o.v. de MPX PCRs, de limiet van detectie is op basis van de MPX-AMC monster hetzelfde, echter voor het 5.1,2,e monster lijkt deze iets lager t.o.v. van de experiment 2. Curves zijn OK, maar zouden verder geoptimaliseerd kunnen worden. Zie figuur 6A en 6B.

Tabel 5. Resultaten Ct waarden OPV PCR

		10^0	10^1	10^2	10^3	10^4	10^5	10^6
5.1,2,e	OPV	18,74	22,3	25,52	29,03	34,5		
	OPV	18,87	22,34	25,62	28,84	34,34		
	OPV	18,94	22,24	25,63	28,6	32,77	34,46	
MPX/AMC	OPV			22,34	25,86	29,87	33,8	34,69
MPX/AMC	OPV			23,23	26,19	29,51	34,4	
MPX/AMC	OPV			22,48	26,01	29,54	31,92	

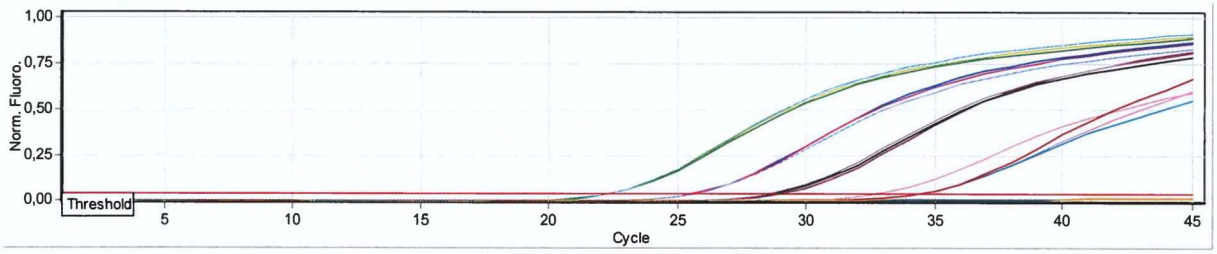


Figure 6A. Curves OPV PCR monster 5.1.2,e

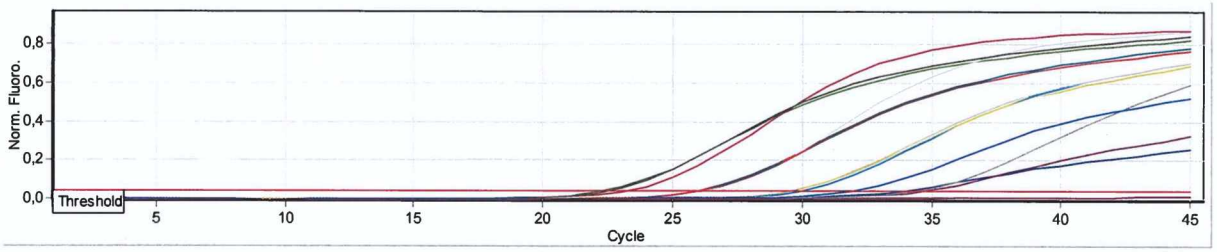


Figure 6B. Curves OPV PCR monster MPX-AMC

Experiment 6.

Test Monkeypox N3R (PCR 4): deze PCR met MGB probes werkt, maar behoeft wat optimalisatie. Gezien de goede resultaten van de mogelijke andere MPX specifieke PCRs en bijbehorende resultaten is besloten om deze PCR nu niet verder te optimaliseren.

Tabel 6. Resultaten MPX N3R PCR met MGB probe.

		10^1	10^2	10^3	10^4	10^5	10^6
5.1.2,e	N3R MPX	23,44	26,51	29,79			
	N3R MPX	23,09	26,18	29,77			
	N3R MPX	22,9	26,19	29,84	35,02		
MPX/AMC	N3R MPX		23,27	25,75	29,77	34,12	
MPX/AMC	N3R MPX		23,17	26,23	30,28	35,08	
MPX/AMC	N3R MPX		23,24	26,14	30,24	33,07	

Experiment 7

Een Panel van het AUMC is getest in de protocollen van GGD Amsterdam. De uitslagen komen overeen met uitzondering van het sample met een Ct 38. De uitslagen van de GGD hebben een hogere Ct waarde, dit komt voort uit een extra verdunningsstap in lysisbuffer.

Tabel 7. Resultaten Panel AUMC

mnst	Uitslag AMC	Uitslag GGD MPX	Uitslag GGD Orthopox	GGD PHhV
5.1.2,e	26	28,635	28,32	26,225
	29	33,29	32,745	26,23
	20	23,81	23,16	26,205
	38			26,18
				26,215
	23	23,875	22,495	26,185

	32	37,115	36,125	26,245
PC		30,74	31,02	30,74

Discussie Technische validatie

In dit rapportdeel is een technische validatie beschreven van verschillende Monkeypox PCRs. De generic MPX in SupermixUDG (=PCR 3, vanaf **nu MPX PCR**) kwam er heel goed uit wat betreft sensitiviteit in verdunningsreeksen en ook ten opzichte van het AUMC panel. Daarbij is deze MPX PCR 100% specifiek. De gevoeligheid van de MPX PCR zou ten opzichte van gestandaardiseerd MPX positief materiaal bepaald moeten worden maar dat is momenteel niet de mogelijk, omdat we niet beschikken over zulk standaard materiaal (bijvoorbeeld gekweekt virus)
De kwalitatieve resultaten van het panel van het AMC kwamen goed overeen, met een iets mindere gevoeligheid gemeten naar Ct waardes De verminderde gevoeligheid (Ct>36) komt door dat wij onze samples verder doorverdunnen t.o.v. AUMC. Bovendien zijn PCR uitslagen met Ct>36 (lage load) minder betrouwbaar (kans proces). Alternatieve extractiemethodes worden verder uitgewerkt.

Momenteel is ervoor gekozen om dezelfde IC (PhHV) als voor de HSV/VZV PCR te gebruiken. Hiermee zijn de condities gelijk tussen beide PCRs. Zo wordt echter alleen de remming van de PCR gemeten en het eventueel falen van de extractie wordt niet gemeten. Een alternatief voor deze IC, bijvoorbeeld Beta-globine, kan komende dagen/ weken verder gevalideerd worden wanneer.

Conclusie Technische validatie

De technische validatie van een specifieke MPX PCR is succesvol, er is gekozen voor de Generic PCR (PCR 3) in UDG Supermix. Er is ook de mogelijkheid om QNP als mastermix te gebruiken.

Resultaten Klinische validatie

Deel 1

Een patiënt kreeg een uitslag 'positief' indien ten minste één van de anatomische locaties positief werd getest. De uitslag kwam in 100% van de patiënten overeen met de uitslagen van het AUMC, namelijk 13 pos en 9 neg (Tabel 1). Er waren op de GGD 28/67 afnamelocaties positief, waarvan op het AUMC waren er 31/66 afname locaties positief. Van de 3 discrepanties waren 2 keel afnames en 1 anusafname negatief bij de GGD en positief op AUMC. Al deze materialen hadden Ct>35. De Ct waarden zijn niet goed vergelijkbaar omdat de elutie niet van dezelfde stok is gedaan. Bovendien is het extractieprotocol is niet gelijk aan het extractieprotocol van het AUMC.

Tabel 1. Uitslagen van dubbeldraaien droge stokken AUMC

	GGD Amsterdam		Amsterdam UMC	
MPX PCR	POS	NEG	POS	NEG
Totaal patiënten	**13**	**9**	**13**	**9**
Anus	9	13	10	12
Keel	6	16	8	14
Blaasjesvocht	13	9	13	9

In het eerste deel van de validatie is er ook een Orthopox PCR meegedraaid om eventuele discrepanties op te vangen. De discrepanties blijven gelijk voor beide PCRs. Ten tweede zijn de verschillen <1.77 Ct tussen de Orthopox PCR.

Voor het tweede deel van de validatie alleen de MPX PCR (zie technische validatie) gerund.

Deel 2

Een patiënt kreeg een uitslag 'positief' indien ten minste één van de anatomische locaties positief werd getest. In totaal zijn er 17 van de 32 patiënten positief bevonden en deze uitslagen komen 100% overeen op GGD Streeklaboratorium en AUMC. Er zijn 4 discrepanties gevonden in de verschillende afname locaties.

- Keelafname pos bij GGD Amsterdam en neg bij AUMC
- Keelafname pos bij AUMC en neg bij GGD Amsterdam
- 2 Anus samples zijn pos bij AMUC en neg bij GGD

Alle discrepanties zijn van materialen met Ct>36. De Ct waarden vallen in alle gevallen gunstiger (lager) uit voor het AMC, met een absoluut gemiddeld verschil van 2.45 (Range 1.19 <> 3.58)

Tabel 2. Uitslagen dubbeldraaien AUMC GGD Amsterdam MPX

	GGD Amsterdam		Amsterdam UMC	
MPX	POS	NEG	POS	NEG
Totaal patiënten	**17**	**15**	**17**	**15**
Anus*	11	20	13	18
Keel	9	23	10	22
Blaasjesvocht	15	17	15	17

*Van één patiënt was geen anus swab beschikbaar

Totaaloverzicht

In totaal zijn er 30 van de 54 patiënten op beide locaties positief getest. In totaal zijn er 161 afnames op beide laboratoria getest. Hiervan waren er op GGD Amsterdam 63/161 positief en 69/161 positief. Er zijn in totaal 6 discrepanties gevonden in de Anus en keel afnames.

Tabel 3. Totaal overzicht uitslagen dubbel draaien

	GGD Amsterdam		Amsterdam UMC	
MPX	POS	NEG	POS	NEG
Totaal patiënten	**30**	**24**	**30**	**24**
Anus*	20	33	23	30
Keel	15	39	18	36
Blaasjesvocht	28	26	28	26

*Van één patiënt was geen anus swab beschikbaar

Discussie

De uitslagen van patiënten komt kwalitatief 100% overeen, namelijk 30 van de 54 positief (56%). Wanneer gerekend wordt met de verschillende afnames dan waren er in totaal 7/161 discrepanties gevonden (4,3% van totaal aantal uitslagen), in de keel en anus afnames. In het blaasjesvocht zijn geen discrepanties gevonden. Alle discrepantie materialen hebben een Ct>35. Hierbij spelen twee factoren een rol, waarbij de monsters op de GGD bij extractie verder doorverdund worden t.o.v. AUMC. Daarnaast zijn PCR uitslagen met Ct>36 minder betrouwbaar (een kansproces).

In het eerste deel van de validatie zijn er klinische afnames met elkaar vergeleken waardoor het afname materiaal kan verschillen, en dus ook de uitslag. In het tweede deel is het gehele proces iets afwijkend, maar op het zelfde materiaal.

Conclusie

De klinische validatie voldoet aan de gestelde eisen, en de MPX PCR kan in gebruik genomen worden.

Aanvullende/ Vervolg stappen

1) Nu PhHV PCR spike, is werkzaam, maar graag alternatief IC, ook als extractiecontrole. Dit is alleen af te ronden met meerdere materialen in Lysisbuffer.

2) (Validatie van HSV/VZV/TP in directe afname in Molgen Lysisbuffer/panther Lysis als alternatief voor droge stok, wanneer er MPX aanvraag is.)
3) Alternatieve extractiemethode, waardoor het sample iets minder verdund wordt.

Bijlage 1. Mixschema's 4 PCRs

Mix OPV Supermix UDG	1 x (µl)
Rnase-free H20	5.7
2x Platinum Q-PCR supermix (Invitrogen)	10
MgCl2 (50 mM)	1
OPV F 10uM	0.6
OPV R 10uM	0.6
OPV probe 10uM	0.1
Mix volume	18
Monster	2
Totaal	20

Mix F3L Supermix UDG	1 x (µl)
Rnase-free H20	5.3
2x Platinum Q-PCR supermix (Invitrogen)	10
MgCl2 (50 mM)	1
MPXV F3L F 10uM	0.6
MPXV F3L R 10uM	0.6
MPXV F3L probe 10uM	0.5
Mix volume	18
Monster	2
Totaal	20

Mix F3L	1x (µl)
Rnase-free H2O	11.3
QNP mastermix 4x	5
MPXV F3L F 10uM	0.6
MPXV F3L R 10uM	0.6
MPXV F3L probe 10uM	0.5
Mix volume	18
monster	2
eindvolume	20

MPX Genereic Supermix UDG	1 x (µl)
Rnase-free H20	5.2
2x Platinum Q-PCR supermix (Invitrogen)	10
MgCl2 (50 mM)	1
MPXV generic F1 10uM	0.4
MPXV generic F2 10uM	0.4
MPXV generic R1 10uM	0.4
MPXV generic R2 10uM	0.4
MPXV generic probe	0.2
Mix volume	18
Monster	2
Totaal	20

MPX Generic QNP	1x (µl)
Rnase-free H2O	11.2
QNP mastermix 4x	5
MPXV generic F1 10uM	0.4
MPXV generic F2 10uM	0.4
MPXV generic R1 10uM	0.4
MPXV generic R2 10uM	0.4
MPXV generic probe	0.2
Mix volume	18
monster	2
eindvolume	20

MPX N3R Supermix UDG	1 x (µl)
Rnase-free H20	4.9
2x Platinum Q-PCR supermix (Invitrogen)	10
MgCl2 (50 mM)	1
N3R F 10 uM	1
N3R R 10 uM	1
N3R probe 10 uM	0.1
Mix volume	18
Monster	2
Totaal	20

Bijlage 2. Overzicht test resultaten per patiënt

Totaaloverzicht van uitslagen PCR GGD en PCR AMC

Deel 1.

	GGD uitslagen				AMC uitslagen		
Monsternummer	Mpox generic	PhHV	OPV	Uitslag def	Mpos F3l	Mpox Generic	Uitslag def
5.1,2,e	34,4	25,66	33,34	pos	27,14	26,51	pos
		26,15		neg	neg		neg
	24,6	26,08	23,83	pos	25,46	24,81	pos
	29,35	26,04	29,17	pos	33,1	32,53	pos
		25,88		pos	36,75	36,99	pos
	24,95	25,88	24,42	pos	24,26	23,64	pos
		25,63		neg	neg		neg
		26,03		neg	neg		neg
		26,11		neg	neg		neg
		26,22		neg	neg		neg
		26,06		neg	neg		neg
	31,92	25,92	33,46	pos	33,65	33,27	pos
		26,04		neg	neg		neg
		25,81		neg	neg		neg
	25,89	26,02	26,06	pos	24,04	23,46	pos
		26		neg	neg		neg
		26,12		neg	neg		neg
		26,2		neg	neg		neg
		25,74		neg	neg		neg
		26,04		neg	neg		neg
		25,91		neg	neg		neg
		25,94		neg	neg		neg
		26,1		neg	neg		neg
		25,98		neg	neg		neg
		25,77		neg	neg		neg
		25,81		neg	neg		neg
		25,66		neg	neg		neg
		26,09		neg	neg		neg
		25,68		neg	neg		neg
		25,25		neg	neg		neg
		25,8		neg	neg		neg
		26,04		neg	neg		neg
		25,61		neg	neg		neg
	17,99	25,6	16,91	pos	17,59	17,19	pos
	36,94	25,71	34,28	pos	40	37,08	pos
	18,81	26,14	17,76	pos	19,26	18,62	pos
		25,76		neg	neg		neg
		25,98		neg	neg		neg
		25,78		neg	neg		neg
	25,14	26,06	24,32	pos	25,65	24,94	pos

5.1,2,e	32,67	25,85	31,58	pos	37,28	36,25	pos
	18,74	26,09	17,82	pos	20,56	19,8	pos
		26,46		pos	35,29	35,12	pos
		26,38		pos	35,59	36,96	pos
	23,27	26,34	22,24	pos	21,51	20,69	pos
	21,01	26,31	19,84	pos	21,25	20,55	pos
	33,73	26,37	34,33	pos	32,48	32,02	pos
	25,28	26,21	24,38	pos	22,07	21,16	pos
		26,53		neg	neg		neg
		26,41		neg	neg		neg
		26,51		neg	neg		neg
	21,74	26,51	20,91	pos	18,86	18,05	pos
	32,18	26,37	30,41	pos	31,45	30,95	pos
	19,41	26,29	18,48	pos	18,1	17,59	pos
	29,9	26,24	28,28	pos	27,31	27,76	pos
		26,65		neg	neg		neg
	30,09	26,5	29,06	pos	27,84	26,98	pos
	19,72	26,41	18,1	pos	19,17	18,54	pos
	29,25	26,48	28,37	pos	28,08	27,61	pos
	20,29	26,45	19,04	pos	20,1	19,41	pos
		26,35		neg	neg		neg
		26,61		neg	neg		neg
	24,87	26,41	24,07	pos	23,61	22,92	pos
	37,16	26,5		pos	37,37	36,8	pos
	32,67	26,21	31,86	pos	32,86	31,92	pos
5.1,2,e bil	31,07	26,63	30,15	?	?	?	?
5.1,2,e gezicht	28,17	26,91	29,43	pos	28,83	27,56	pos

Deel 2.

		GGD Uitslagen			AMC uitslagen		
Monsternummer	geb. datum	MPX Generic	PhHV	Uitslag def	Mpos F3l	Mpox Generic	Uitslag def
5.1,2,e	5.1,2,e		25,96	neg	neg		neg
			25,95	neg	neg		neg
			26,01	neg	neg		neg
			25,97	neg	neg		neg
			26,14	neg	neg		neg
			25,99	neg	neg		neg
		21,65	25,89	pos	19,58	19,07	pos
		35,95	25,96	pos			neg
		25,32	25,79	pos	23,72	22,27	pos
			25,97	neg	40	40	neg
			26	neg	38,12	36,85	pos
		20,09	25,81	pos	18,28	17,74	pos
		36,8	25,83	pos	36,07	35,04	pos
			26,09	neg	37,63	35,65	neg

	5.1,2,e							
			30,27	26,07	pos	29	27,86	pos
		5.1,2,e	25,22	25,9	pos	23,95	22,97	pos
			31,27	26,05	pos	30,43	29,49	pos
			19,7	25,94	pos	17,85	17,06	pos
				25,98	neg	neg		neg
				26,06	neg	neg		neg
				25,78	neg	neg		neg
			21,58	25,76	pos	20,06	19,27	pos
			24,93	25,81	pos	23,48	22,57	pos
			21,71	25,92	pos	20,49	19,6	pos
				25,94	neg	neg		neg
				25,94	neg	neg		neg
				25,96	neg	neg		neg
			26,87	26,16	pos			pos
				26,36	neg			pos
				26,28	neg			pos
				26,26	neg			neg
				26,33	neg			neg
				26,06	neg			neg
			28,48	26,24	pos			pos
			32,11	26,17	pos			pos
				26,14	neg			neg
				26,01	neg			neg
				26,28	neg		neg	neg
				26,2	neg		neg	neg
				26,34	neg			neg
				26,12	neg			neg
				26,13	neg			neg
				26,18	neg	pos	neg	neg
			36,8	26,41	pos	pos	pos	pos
			26,75	26,14	pos	pos	pos	pos
				26,15	neg	pos	pos	pos
			35,67	26,22	pos	pos	pos	pos
			22,2	26,08	pos	pos	pos	pos
				26,39	neg			neg
				26,53	neg			neg
				26,5	neg			neg
			20,78	26,43	pos			pos
			20,75	26,59	pos			pos
			24,74	26,57	pos			pos
			25,97	26,56	pos			pos
			36,11	26,69	pos			pos
			35,12	26,53	pos			pos
			33,15	26,51	pos			pos
				26,64	neg			neg
				26,55	neg			neg
			22,16	26,72	pos			pos

	5.1,2,e			26,53	neg			neg
			28,81	26,42	pos			pos
		5.1,2,e		26,43	neg			neg
				26,61	neg			neg
				26,52	neg			neg
				26,31	neg		neg	neg
				26,2	neg		neg	neg
				26,02	neg		neg	neg
				26,19	neg		neg	neg
				26,16	neg		neg	neg
				26,25	neg		neg	neg
				26,23	neg		neg	neg
				26,34	neg		neg	neg
				26,34	neg		neg	neg
	5.1,2,e ulcus hand			26,29	?		?	?
	5.1,2,e			26,01	neg		neg	neg
	5.1,2,e ulcus gezicht			26,14	neg		neg	neg
	5.1,2,e		27,41	26,2	pos	25,19	24,46	pos
			32,54	26,22	pos	30,64	29,72	pos
			20,45	26,24	pos	18,22	17,42	pos
			43,77	26,5	neg		neg	neg
				26,33	neg		neg	neg
			33,58	26,36	pos	31,11	30,22	pos
				26,21	neg	neg		neg
				26,38	neg	neg		neg
				26,38	neg	neg		neg
				26,09	neg	neg		neg
				26,16	neg	neg		neg
				26,45	neg	neg		neg
				26,01	neg	36	36	pos
				26,44	neg	38,12	37,72	pos
			32,6	26,44	pos	32,27	31,41	pos
				26,04	neg	neg	40	neg
				26,22	neg			neg
			29,52	26,31	pos	27,56	26,74	pos