PROC/023/B2_Werkformulier validatie nieuwe apparatuur en analysemethode
Plan van Aanpak- uitvoering- rapportage-implementatie traject
Autorisatie zie PROC/023 Aanschaf, verificatie en evaluatie van apparatuur en/of analyse methoden
Onderwerp: Validatie Monkeypox PCR op pop-up lab Sanquin
Datum: 14-07-2022

Plan van Aanpak

- **Validatie zal uitgevoerd worden door:** 5.1.2,e en 5.1.2,e
- **Aanvullende scholing nodig voor uitvoerende analist** □ **JA** ☒ **NEE**
- **Validatiecriteria**
  - □ Uitslagen positieve en negatieve geteste patiënten materiaal komen 100% overeen
  - □ Uitslagen droge stokken komen 100% overeen
  - □ CFX curves en Cq waarde zijn vergelijkbaar met de Rotorgene
- **Materialen die getest moeten worden en een geschatte hoeveelheid**
  - □ MPXV routine positieve en negatieve patiënten materiaal Hoeveelheid 14
  - □ 3 afnamelocaties per patient (droge stokken) Hoeveelheid 34
- **Benodigde reagentia t.b.v. de validatie en een geschatte hoeveelheid**
  - □ MPXV mix Hoeveelheid ± 7 ml
  - □ PhHV15 mix Hoeveelheid ± 6 ml
  - □ MPXV PC Hoeveelheid ± 100 µl
  - □ PhHV Hoeveelheid ± 550 µl
- **Tijdbestek** 2 weken
- **Formuleer de actie(s) bij discrepanties**
  - □ Alle discrepanties worden met de MMM`er besproken
- **Parafeer voor akkoord <u>plan van aanpak</u>**
  - □ Hoofd Streeklab _____ Datum _____
  - □ Arts microbioloog _____ Datum _____
  - □ Moleculair microbioloog 5.1.2,e Datum 20/7/2022
  - □ Leidinggevende _____ Datum 22/7/2022

z.o.z
Evaluatie validatierapport en implementatie

- **<u>Parafeer voor akkoord eindrapport</u>**
  - □ Hoofd Streeklab _____ Datum _____
  - □ Arts microbioloog 5.1.2,e Datum 16-08-2022
  - □ Moleculair microbioloog _____ Datum _____
  - □ Leidinggevende _____ Datum 16/08/2022

- **Implementatie acties**
  - ☑ SOP in KIS _ _____
  - ☐ Nieuwe inwerkonderdelen op laten nemen Kwalificatiematrix_____
  - ☐ Nieuwsbrief item_____
  - ☐ Website Streeklaboratorium_____
  - ☐ Vermelding op andere websites zoals WMDI onder NVMM _____
  - ☑ Risico analyse bijwerken
  - ☐ GLIMS parametrisering/ koppeling_____
  - ☐ Andere software _____
  - ☐ Nieuw scope-element JA/NEE, indien JA melden aan kwaliteitsadviseur

- Datum in gebruik name

  _____

Naam evaluator(en): 5.1,2,e & 5.1,2,e

Identificatie van inhoudelijke wijzigingen ten opzichte van de vorige opsteldatum
Samenvoeging van PROC/023/B2 & PROC/076/B2.

Validatieverslag Monkeypox PCR op lab Sanquin

Datum:
16-08-2022

Uitgevoerd door:

5.1,2,e

5.1,2,e

5.1,2,e

Eind verantwoordelijken:

5.1,2,e MMM

5.1,2,e MMM i.o.

5.1,2,e

5.1,2,e

16/8/22

16/08/22

Inleiding

Op de Nieuwe Achtergracht wordt sinds 14 juni 2022 Monkeypox PCR in de diagnostiek gebruikt. Bij verhoogde Monkeypox PCR aanvragen kan ook op de laboratorium locatie van Sanquin de Monkeypox PCR als diagnostiek uitgevoerd worden. Met deze testen willen we valideren dat de Monkeypox PCR in combinatie met pipetteerrobot Myra en Biorad CFX voldoet aan de gestelde eisen op locatie Sanquin.

Behalve opschaling is het ook de bedoeling dat de gehele test zoveel mogelijk geautomatiseerd wordt uitgevoerd, dus met zo min mogelijk handmatige (bewerkelijke en foutgevoelige) stappen. Op locatie Sanquin staan meerder CFX PCR apparaten die werken met 96 well platen. Dit is fundamenteel anders dan het werken met losse epjes of strips, zoals dat nu in de routine op locatie Nieuwe Achtergracht (NA) plaatsvindt. Daarom is er een serie andere apparatuur en plastics nodig op locatie Sanquin.

De criteria waaraan deze validatie aan moet voldoen zijn:

- Uitslagen positieve en negatieve geteste patiënten materiaal komen 100% overeen
- Uitslagen droge stokken komen 100% overeen
- CFX curves en Cq waarde zijn vergelijkbaar met de Rotorgene

Experiment 1 Schaakbordtest PhHV

Uitvoerdatum: 13-07-2022

Methode

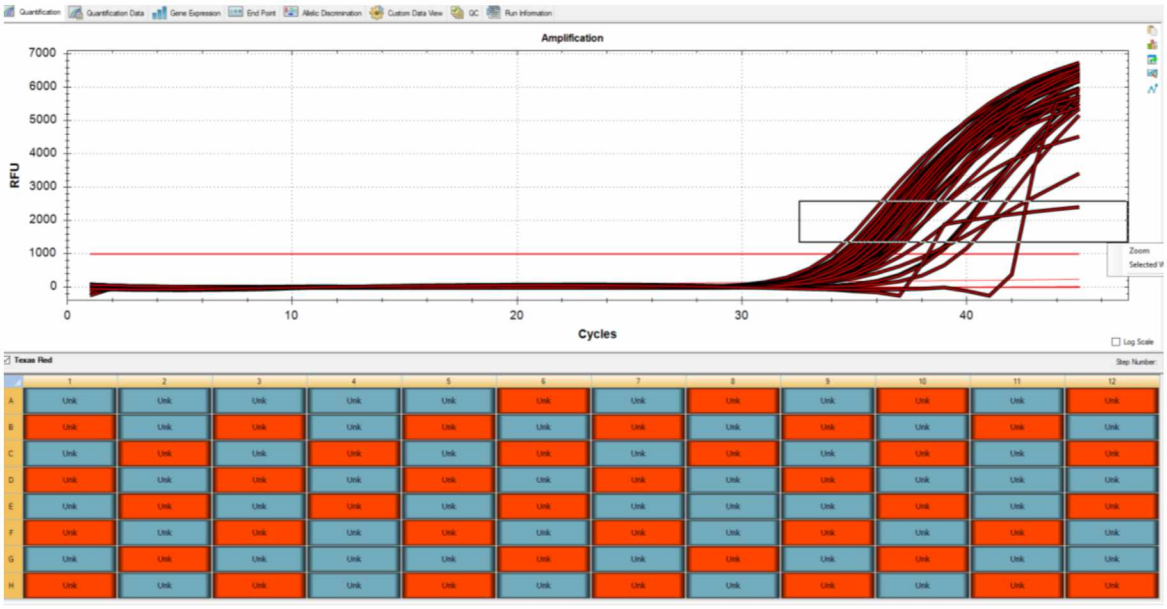
Om de automatisering van de test te bevorderen op lab Sanquin is bedacht dat met pipeteerrobot Myra de opgekookte monsters vanuit een 96 well plaat die afgedekt is met aluminiumfolie kan laten over pipetteren naar een Biorad 96 well plaat gevuld met PCR mix die afgesloten met een seal. Om te evalueren dat de Myra het aluminium seal kan door prikken is een schaakbordtest met positieve interne controle PhHV uitgevoerd (Fig.1). Met de Myra is 15 µl PBS en PhHV (10x verdund) in schaakbordvorm gepipetteerd in een PCR plaat, deze is vervolgens afgedekt met aluminium seal. Vanuit deze plaat is 2 µl PhHV (10x verdund) met de Myra in schaakbordvorm in een 96 well Biorad plaat gepipetteerd met 15 µl PhHV 15 mix (Fig. 2). Dezelfde proef is nog een keer uitgevoerd met 3 µl PhHV (5x verdund)(Fig. 3).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	PBS	PhHV	PBS	PhHV	PBS	PhHV	PBS	PhHV	PBS	PhHV	PBS	PhHV
B	PhHV	PBS	PhHV	PBS	PhHV	PBS	PhHV	PBS	PhHV	PBS	PhHV	PBS
C	PBS	PhHV	PBS	PhHV	PBS	PhHV	PBS	PhHV	PBS	PhHV	PBS	PhHV
D	PhHV	PBS	PhHV	PBS	PhHV	PBS	PhHV	PBS	PhHV	PBS	PhHV	PBS
E	PBS	PhHV	PBS	PhHV	PBS	PhHV	PBS	PhHV	PBS	PhHV	PBS	PhHV
F	PhHV	PBS	PhHV	PBS	PhHV	PBS	PhHV	PBS	PhHV	PBS	PhHV	PBS
G	PBS	PhHV	PBS	PhHV	PBS	PhHV	PBS	PhHV	PBS	PhHV	PBS	PhHV
H	PhHV	PBS	PhHV	PBS	PhHV	PBS	PhHV	PBS	PhHV	PBS	PhHV	PBS

Figuur 1: Indeling plaat schaakbordtest met positieve interne controle PhHV. In oranje gemarkeerde vakjes is 15 µl positieve interne controle PhHV (10x verdund, 2 µl en 5x verdund, 3 µl) gepipetteerd. In wit gemarkeerde vakjes is 15 µl PBS toegevoegd.

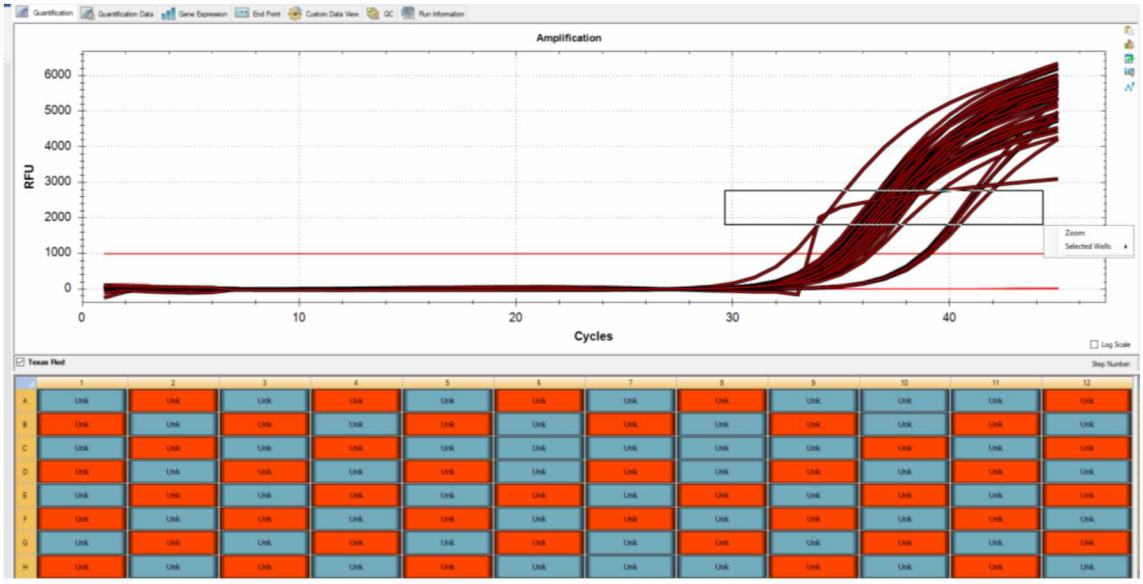
Resultaten

Er waren 42 van de 48 PhHV gespikte wells positief (zie figuur 2) , wat betekent dat er 6 gemist waren. De Cq waarden van alle positieve wells staat in bijlage I, tabel 1, waarbij de gemiste in rood gemarkeerd zijn. De gemiddelde van de PhHV is 35,88. In de routine op NA was dat gemiddeld 26,22 Ct.



Figuur 1: CFX resultaten schaakbord test PhHV 10X verdund en 2µl sample, Th=1000. Rood gekleurd vakjes corresponderen met de positieve curves die opkomen en blauw negatief. 42 van de 48 is daadwerkelijk positief, wat betekent dat 6 gemist waren. De gemiddelde PhHV is 35,88.

In de tweede set waren 44 van de 48 PhHV gespikte wells positief (zie figuur 3), wat betekent dat er 4 gemist waren. De Cq waarden van alle positieve wells staat in bijlage I tabel 1 in de, waarbij de gemiste in rood gemarkeerd staan. Het gemiddelde van de PhHV is 35,38 Ct.



Figuur 2: CFX resultaten schaakbord test PhHV 5X verdund en 3µl sample, Th=1000. Rood gekleurd vakjes corresponderen met de positieve curves die opkomen en blauw negatief. 44 van de 48 is daadwerkelijk positief, wat betekent dat 4 gemist waren. De gemiddelde PhHV is 35,38,

In beide schaakbordtesten bleven alle negatieven ook negatief na het analyseren, dus geen contaminatie.

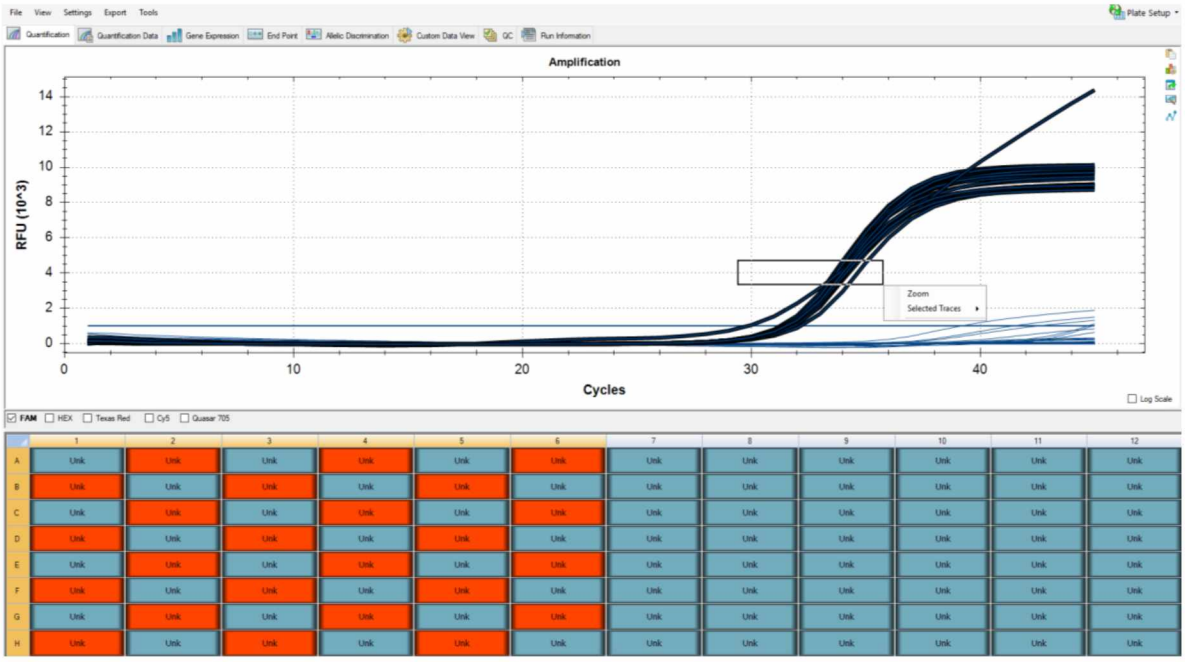
Experiment 2 Schaakbordtest MPX
Uitvoerdatum: 14-07-2022

Methode

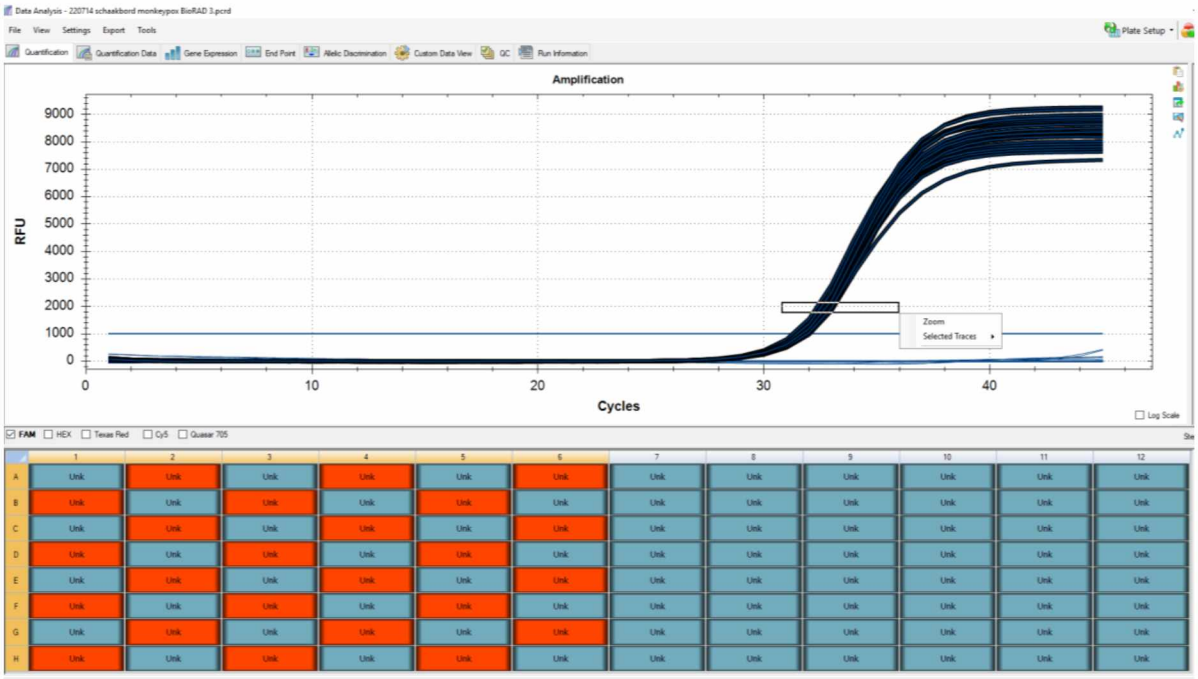
Er is ook een schaakbordtest uitgevoerd met de monkeypox mix die in routine gebruikt wordt en positieve MPX controle met op de NA een gemiddelde waarde van 30,29 Ct . Hierbij werden twee verschillende CFX apparaten (Zee, nieuw en Biorad 5) met elkaar vergeleken. Met de Myra zijn er 2 platen volgens een schaakbord voor de helft gepipetteerd, namelijk 3 µl positieve controle MPX en 3 µl PBS om en om bij 18 µl monkeypox mix.

Resultaten

In beide CFXen komen alle 24 positieve monsters op (Fig. 4 en 5). In CFX Zee heeft MPXV een gemiddelde van 31.48 Ct en in CFX BioRAD 5 31.66 Ct. Eén negatieve PBS komt op als fout positieve met een waarde van 39,17 Ct.



Figuur 4: CFX resultaten schaakbord MPXV CFX Zee, Th=1000. Rood gekleurd vakjes corresponderen met de positieve curves die opkomen en blauw negatief. Alle positieve komen op, met een na met Ct waarde van 39,17. De gemiddelde Ct van MPXV is 31,48.



Figuur 5: CFX resultaten schaakbord MPXV CFX BioRad 5, Th=1000. Rood gekleurd vakjes corresponderen met de positieve curves die opkomen en blauw negatief. Alle positieve komen op. De gemiddelde Ct van MPXV is 31,66.

In beide schaakbordtesten bleven alle negatieven ook negatief na het analyseren, dus geen contaminatie.

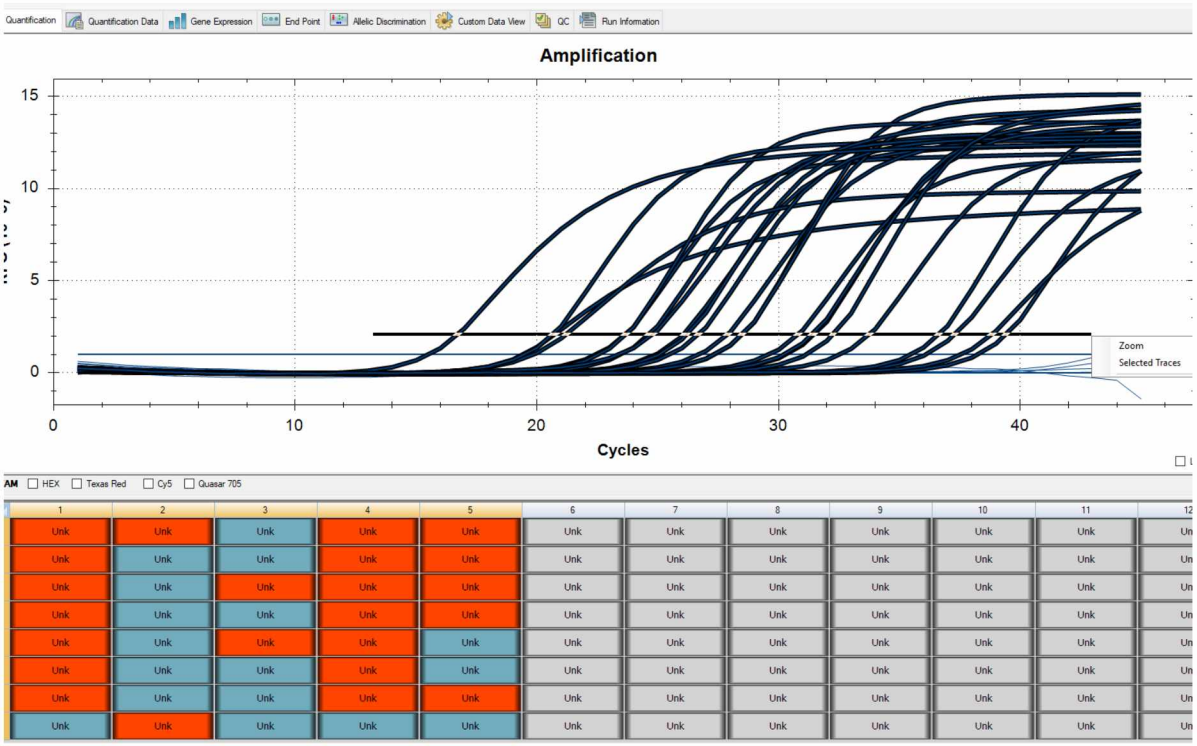
Experiment 3 Dubbeldraaien routine monsters
Uitvoerdatum: 21-07-2022

Methode
Tijdens dit experiment zijn er monsters van 12 patiënten gebruikt; 9 patiënten waren op alle 3 de afname locaties positief en de overige 3 patiënten waren op alle 3 afnamelocaties negatief getest in de routine op de NA. Er is eerst met de pipeteerobot Myra 1 30 µl in een 96 well plaat gepipeteerd vanuit de 2 ml epjes met eluaat. Deze plaat is met aluminium seal afgedekt en 15 min opgekookt bij 95°C. Met een multichannel pipet is eerst mix uitgevuld en vervolgens is met de pipeteerrobot Myra 2, 3 µl vanuit de opgekookte plaat overgippiteerd naar de 96 well Biorad mixplaat

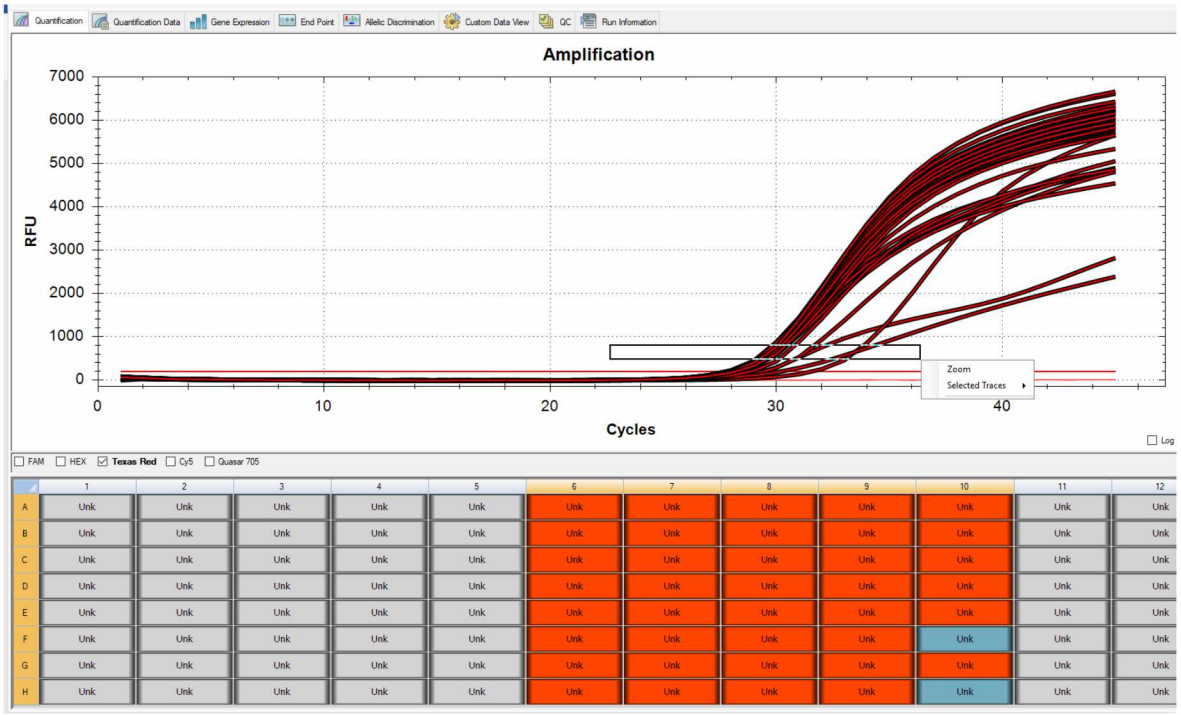
Resultaten
In tabel 1 is te zien dat de resultaten op patiënt niveau 8 van de 9 positieve uitslagen overeenkomen en 1 dubieus uitslag, die conform NA routine afspraken herhaald zou worden. Alle 3 negatieve patiënten uitslagen komen overeen. Op swab niveau zijn er echter 5 van de 36 stokken met een discordant resultaat (in rood in tabel 1). In 2 gevallen was er een zwak positief MPX resultaat op Sanquin te zien (patiënt 6) terwijl voor de overige 4 stokken er een lagere Ct was op NA. Het gemiddelde verschil is gemiddeld 1 Ct (factor 2) wat aanvaardbaar is. In Figuur 9 is te zien dat de meeste PhHV uitslagen in orde zijn maar 2 hebben een verhoogde Ct met slechtere curve (remming). Dit had geen invloed op de patiënt uitslag.

			N/A Routine		Sanquin			
			7-7-2022 + 8-7-2022		21-7-2022 Th= 1000			
Well	Locatie	Monsternummer	Ct routine	Uitslag	Cq MPXV	Uitslag	Verschil MPXV	Cq PhHV (IC)
A01	anus	5.1.2,e	19,2		19,42		-0,22	29,45
B01	keel	5.1.2,e	23,78	pos	25,06	pos	-1,28	27,92
C01	blaasjes	5.1.2,e	26,15		26,68		-0,53	28,11
D01	anus	5.1.2,e	19,6		19,46		0,14	28,26
E01	keel	5.1.2,e	32	pos	32,52	pos	-0,52	28,01
F01	blaasjes	5.1.2,e	23,62		25,47		-1,85	28,01
G01	anus	5.1.2,e	22,78		23,37		-0,59	28,03
H01	keel	5.1.2,e	28,64	pos		pos		28,04
A02	blaasjes	5.1.2,e	28,59		29,58		-0,99	28,01
B02	anus	5.1.2,e						31,59
C02	keel	5.1.2,e		neg		neg		27,84
D02	blaasjes	5.1.2,e						27,8
E02	anus	5.1.2,e						30,25
F02	keel	5.1.2,e		neg		neg		28,1
G02	blaasjes	5.1.2,e						28,02
H02	anus	5.1.2,e	35,68		37,53		-1,85	28,11
A03	keel	5.1.2,e	36,33	pos		dub		28,03
B03	blaasjes	5.1.2,e	35,76					27,93
C03	anus	5.1.2,e	24,09		27,34		-3,25	28,01
D03	keel	5.1.2,e	39,57	pos		pos		27,81
E03	blaasjes	5.1.2,e	22,61		23,45		-0,84	28,08
F03	anus	5.1.2,e						28,18
G03	keel	5.1.2,e		neg		neg		28,14
H03	blaasjes	5.1.2,e						28,02
A04	anus	5.1.2,e	23,08		24,92		-1,84	27,94
B04	keel	5.1.2,e	36,41	pos	38,23	pos	-1,82	28,13
C04	blaasjes	5.1.2,e	37,36		36,09		1,27	28
D04	anus	5.1.2,e	29,76		30,29		-0,53	27,98
E04	keel	5.1.2,e	34,76	pos	35,45	pos	-0,69	27,84
F04	blaasjes	5.1.2,e	29,45		30,22		-0,77	28,01
G04	anus	5.1.2,e	15,96		15,5		0,46	28,33
H04	keel	5.1.2,e	36,82	pos		pos		28,2
A05	blaasjes	5.1.2,e	21,05		22,43		-1,38	28,09
B05	anus	5.1.2,e	19,54		19,86		-0,32	29,43
C05	keel	5.1.2,e	22,72	pos	22,53	pos	0,19	28,08
D05	blaasjes	5.1.2,e	24,39		27,32		-2,93	28,27
E05		NEC						28,31
F05		T10						
G05		PC			31,14			28,89
Gemiddeld verschil							-0,92	28,2960526

Tabel 1: Vergelijking Ct waarden op NA en op Sanquin van 36 monsters van 12 patiënten. 8 van de 9 positieve uitslagen komen overeen, met uitzondering van een dubieus uitslag. De negatieve resultaten komen allemaal overeen. Op swab niveau komen 5 van de 36 resultaten niet overeen (in rood gemarkeerd) met NA routine uitslagen. Gemiddeld verschil is <1. Verschil is berekend door Cq waarde van Sanquin af te trekken van Ct routine.



Figuur 6: MPXV CFX curves. Weergegeven zijn alle positieve patiënten en de PC MPXV (Ct 31,14) in het rood. De CFX resultaten geven een mooie s-curve.



Figuur 7: PhHV (IC) CFX Curves. Weergegeven is de positieve controle PhHV die op 2 curves na (geremd), allemaal een mooie s-curves hebben met een gemiddelde Ct van 28,30.

Experiment 4 Dubbeldraaien AUMC monsters
Uitvoerdatum: 26-07-2022

Methode

Tijdens de technische en analytische validatie van de MPXV PCR waren bij patiënten dubbele afnames uitgevoerd voor de PCR bepaling op het AUMC. Tijdens deze validatie is ervoor gekozen om vanuit NA eluaat in lysisbuffer voor AMC te pipeteren en opsturen. Hierdoor waren er onbewerkte swabs van patiënten beschikbaar waar de uitslagen ervan al bekend zijn. Om het proces van stokken afbreken tot analyseren op de CFX te evalueren is gekozen om met deze materiaal te gaan werken. Van de onbewerkte swabs die beschikbaar zijn er blind 10 uitgekozen en mee verder gegaan. Deze hebben we in 2 ml epjes afgebroken en in 600 µl PBS voor 30 min geëlueerd. De epjes zijn vervolgens in pipetteerobot Myra 1 geplaats om in een 96 well plaat 30 µl over te pipeteren. Dit plaat is afgeseald en voor 15 min opgekookt bij 95°C. Vervolgens is met pipeteerrobot Myra 2 3 µl opgekookte sample naar een Biorad 96 well plaat gevuld met MPXV en PhHV 15 mix.

Resultaten

In tabel 2 is te zien dat van de 10 patiënten, 3 een positieve uitslag hebben. De uitslagen komen 100% overeen met de uitslagen van NA en AMC. Voor 1 patiënt waren op 2 van de 3 swabs op NA negatief getest (rood gemarkeerd), terwijl deze zowel op AMC en SAnquin wel positief getest zijn. Maar dit had geen gevolg op de uitslag voor de patiënt. Het gemiddeld ct verschil is 1,76. Op een geremd sample na, komen bij alle patiënten de interne controle op met een gemiddelde Ct waarde van 31,01.

Tabel 2: Vergelijking resultaten op AMC/ NA met lysisbuffer methode en MPX PCR met opkoken op Sanquin. Alle monkeypox uitslagen van patiënten komen 100% overeen. Op swab niveau is voor één patiënt (rood gemarkeerd) met de routine negatief, maar zowel met de CFX en vanuit AMC positief.

Routine	Routine	CFX	Routine	CFX	AMC uitslagen					
	MPX	MPXV	PhHV	PhHV	Mpos F3l	Mpox Generic	Uitslag def	Uitslag routine	Uitslag Sanquin	verschil Routine-Sanquin
5.1.2,e			26,09	30,61	neg					
5.1.2,e			26,16	30,68	neg		neg	neg	neg	
5.1.2,e			26,45	30,6	neg					
5.1.2,e			26,31	30,71		neg				
5.1.2,e			26,2	30,43		neg	neg	neg	neg	
5.1.2,e			26,02	30,52		neg				
5.1.2,e	21,58	22,08	25,76	34,36	20,06	19,27				-0,5
5.1.2,e	24,93	28,32	25,81	30,69	23,48	22,57	pos	pos	pos	-3,39
5.1.2,e	21,71	20,15	25,92	33,7	20,49	19,6				1,56
5.1.2,e			26,23	30,79		neg				
5.1.2,e			26,34	30,82		neg	neg	neg	neg	
5.1.2,e			26,34	30,76		neg				
5.1.2,e	21,65	19,79	25,89	31,26	19,58	19,07				1,86
5.1.2,e	35,95	34,03	25,96	30,71			pos	pos	pos	1,92
5.1.2,e	25,32	23,31	25,79	30,71	23,72	22,27				2,01
5.1.2,e		35,45	26,01	30,76	36	36				
5.1.2,e		38,05	26,44	30,53	38,12	37,72	pos	pos	pos	
5.1.2,e	32,6	31,49	26,44	30,71	32,27	31,41				1,11
5.1.2,e			26,21	31,08	neg					
5.1.2,e			26,38	30,81	neg		neg	neg	neg	
5.1.2,e			26,38	31,03	neg					
5.1.2,e			25,98	Geremd	neg					
5.1.2,e			26,06	30,77	neg		neg	neg	neg	
5.1.2,e			25,78	30,72	neg					
5.1.2,e			25,94	30,76	neg					
5.1.2,e			25,94	31,13	neg		neg	neg	neg	
5.1.2,e			25,96	31,09	neg					
5.1.2,e			25,96	31,01	neg					
5.1.2,e			25,95	30,65	neg		neg	neg	neg	
5.1.2,e			26,01	30,92	neg					Absolute gemmidelde =1,76

Experiment 5 `End-to-end test`
Uitvoerdatums: 03-08-2022 en 11-08-2022

Methode
Met het `end-to-end test` wordt het gehele process met LabTrain koppeling getest. Hiervoor zijn "dummy" nummers aangemaakt in LabTrain om mee te kunnen werken. Ook kan met het `end-to-end test ` een indicatie krijgen hoelang het process duurt, vanaf het ontvangen van het test materiaal tot uitgeven van het uitslag. Met ingang van 25-07-2022 wordt op Nieuw Achtergracht voor de monkeypox diagnostiek een duplex mix voor de PCR gebruikt. Hier is tijdens dit experiment ook gebruik van gemaakt.
Deze test was twee keer uitgevoerd. In totaal zijn 71 samples samples gebruikt, waarvan 45 positief in het eerste experiment. In het tweede experiment waren 36 positief. Hiervoor zijn positieve eluaaten uitgezocht waar droge swabs ingedipt zijn en in safety bags verpakt. De negatieve swabs waren in PBS gedipt.
Na hun komst op Sanquin zijn de stokken afgebroken in 2 ml epje en 15 min geelueerd in 600 µl PBS op schudapparaat. De swabs werden vervolgens met lange 10 µl puntje uit het epje gehaald. Voordat deze epjes met eluaat in de Myra 1 sample blok werden geplaats, werd het GLIMS nummer eerst in LabTrain gescand om een werklijst te maken. Vanaf dit moment stond de volgorde van de samples en de werklijst vast. Met alle samples ingecand en een positie in het sample blok, werd het werklijst gemaakt. Met pipeetteerrobot Myra 1 werd vanuit 2 ml epjes 30 µl eluaat voor het opkoken naar een 96 well plaat overgepippeteerd in het volgorde van het werklijst. Deze plaat werd afgesloten met en alumunium seal en 15 min op 95°C opgekookt. Het opgekookte plaat is vervolgens in pipeteerrobot Myra 2 geplaats. Hier wordt in een Biorad 96 well plaat in de volgorde van de werklijst zowel mix, opgekookte samples en controles gepipetteerd. Na afloop werd de plaat in de CFX geplaats, de werklijst ingeladen en de run gestart. Na afloop kon de resultaten doorgestuurd worden naar LabTrain om uit te geven.

Resultaten
In totaal duurt het gehele process ongeveer 300 min, dus ongeveer 5 uur vanaf het ontvangen van het materiaal op Sanquin tot het uitgeven van de uitslagen. In onderstaand tabel 3 wordt de tijd per handeling weergegeven.

Tabel 3: Overzicht van Monkeypox PCR proces per handeling in minuten

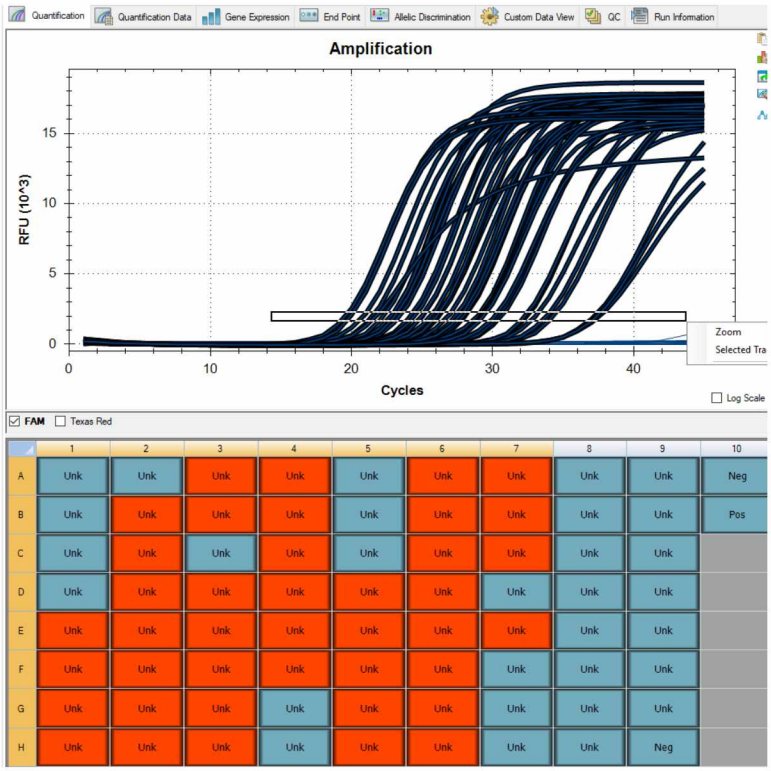
Handelingen	**Tijd (minuten)**
Samples brengen van Nieuw Achtergracht naar Sanquin	30
Voorbewerking materiaal (Analytische controle, stickeren 2 ml epjes, afbreken, PBS toevoegen, schudden)	45
LabTrain werklijst maken + pipeteerrobot Myra 1 (15 min run)	30
96 well plaat opkoken, afkoelen en afdraaien	20
Pipiteerobot Myra 2 Totale mix berekening, mixen + samples uitpipetteren door Myra (20 min)	40
CFX (Plaat en werklijst inladen, DNA 2 staps run)	105
Analyse (Exporteren, herhalingen, uitgeven)	30
Totaal	**300**

De resultaten van het `end-to-end test` kunnen niet één op één met elkaar vergeleken worden, omdat er voor een dipmethode is gekozen.Hierbij wordt de swab in de positieve eluaat ingedompeld en vervolgens getest. Deze methode zorgt voor een grote variatie in de Ct waardes.

In het eerste experiment komen 41 samples na analyseren postitief met LabTrain. De resultaten zijn ook terug te zien in tabel 4 en figuur 8, waarbij 41 curves opkomen + PC MPXV. Met rood gemarkeerd zijn negatieve samples, waarvan verwacht werd dat deze positief zullen zijn. Het Ct waarde van CFX ligt gemiddeld 3,5 Ct`s hoger dan routine. Voor de interne controle,waar deze in de routine geremd waren zijn deze ook op Sanquin geremd of hebben een hoger Ct waarde. Alle negatieve resultaten komen overeen.

Tabel 4: Vergelijking resultaten "end-to-end test 1" MPXV PCR op Sanquin en MPX routine PCR. 41 samples zijn positief na analyse. Alle swabs die in PBS zijn gedipt, zijn negatief.

	Patientnummer	"Dummy" nummer	Ct routine PXV	Ct CFX MPXV	Routine PhHV	CFX PhHV	Verschil Routine en CFX
1	5.1.2.e	5.1.2.e	20,22	23,54	+	30,88	3,32
2	5.1.2.e	5.1.2.e	16,48	19,06	Geremd	Geremd	2,58
3	5.1.2.e	5.1.2.e	22,21	25,19	+	30,64	2,98
4	5.1.2.e	5.1.2.e	22,07	25,13	+	30,29	3,06
5	5.1.2.e	5.1.2.e	19,63	22	Geremd	34,63	2,37
6	5.1.2.e	5.1.2.e	27,01	24,68	+	30,27	-2,33
7	5.1.2.e	5.1.2.e	25,02	28,35	+	30,13	3,33
8	5.1.2.e	5.1.2.e	20,70	24,09	Geremd	30,9	3,39
9	5.1.2.e	5.1.2.e	24,77	27,95	+	30,25	3,18
10	5.1.2.e	5.1.2.e	21,43	24,13	Geremd	30,21	2,7
11	5.1.2.e	5.1.2.e	24,13	29,46	Geremd	30,34	5,33
12	5.1.2.e	5.1.2.e	32,8	36,19	+	30,44	3,39
13	5.1.2.e	5.1.2.e	18,86	22	Geremd	32,28	3,14
14	5.1.2.e	5.1.2.e	32,09	36,22	+	30,48	4,13
15	5.1.2.e	5.1.2.e	15,85	18,62	Geremd	Geremd	2,77
16	5.1.2.e	5.1.2.e	33,99	36,07	+	30,38	2,08
17	5.1.2.e	5.1.2.e	21,93	26,42	Geremd	30,03	4,49
18	5.1.2.e	5.1.2.e	19,45	22,16	Geremd	34,7	2,71
19	5.1.2.e	5.1.2.e	24,64	28,24	+	30,02	3,6
20	5.1.2.e	5.1.2.e	35,33		+	30,25	-
21	5.1.2.e	5.1.2.e	25,94	29,21	+	30,18	3,27
22	5.1.2.e	5.1.2.e	27,85	31,49	+	30,2	3,64
23	5.1.2.e	5.1.2.e	17,25	21,35	Geremd	Geremd	4,1
24	5.1.2.e	5.1.2.e	18,56	22,48	Geremd	32,09	3,92
25	5.1.2.e	5.1.2.e	16,9	19,91	Geremd	Geremd	3,01
26	5.1.2.e	5.1.2.e	15,5	19,03	Geremd	Geremd	3,53
27	5.1.2.e	5.1.2.e	24,58	28,39	+	30,16	3,81
28	5.1.2.e	5.1.2.e	29,04	32,09	+	30,44	3,05
29	5.1.2.e	5.1.2.e	19,34		+	30,18	-
30	5.1.2.e	5.1.2.e	27,77	31,35	+	30,39	3,58
31	5.1.2.e	5.1.2.e	25,2	29,67	+	30,35	4,47
32	5.1.2.e	5.1.2.e	21,14		+	30,13	-
33	5.1.2.e	5.1.2.e	19,39	23,24	+	31,21	3,85
34	5.1.2.e	5.1.2.e	19,36	23,39	+	30,63	4,03
35	5.1.2.e	5.1.2.e	18,2	21,96	+	33,75	3,76
36	5.1.2.e	5.1.2.e	21,65	25,99	+	30,47	4,34
37	5.1.2.e	5.1.2.e	23,81	26,69	+	30,1	2,88
38	5.1.2.e	5.1.2.e	23,35	27,13	+	30,03	3,78
39	5.1.2.e	5.1.2.e	17,7	20,57	+	N/A	2,87
40	5.1.2.e	5.1.2.e	22,84	27,04	+	30,12	4,2
41	5.1.2.e	5.1.2.e	17,39	20,71	Geremd	Geremd	3,32
42	5.1.2.e	5.1.2.e	35,76		+	30,14	-
43	5.1.2.e	5.1.2.e	18,34	25,31	+	30,4	6,97
44	5.1.2.e	5.1.2.e	31,86	33,28	+	30,22	1,42
45	5.1.2.e	5.1.2.e	29,22	32,84	+	30,17	3,62
46	PBS	5.1.2.e		neg		30,58	
47	PBS	5.1.2.e		neg		30,41	
48	PBS	5.1.2.e		neg		30,3	
49	PBS	5.1.2.e		neg		30,8	
50	PBS	5.1.2.e		neg		30,71	
51	PBS	5.1.2.e		neg		30,32	
52	PBS	5.1.2.e		neg		30,33	
53	PBS	5.1.2.e		neg		30,34	
54	PBS	5.1.2.e		neg		30,17	
55	PBS	5.1.2.e		neg		30,15	
56	PBS	5.1.2.e		neg		30,61	
57	PBS	5.1.2.e		neg		30,22	
58	PBS	5.1.2.e		neg		30,34	
59	PBS	5.1.2.e		neg		30,68	
60	PBS	5.1.2.e		neg		30,33	
61	PBS	5.1.2.e		neg		30,41	
62	PBS	5.1.2.e		neg		30,47	
63	PBS	5.1.2.e		neg		30,67	
64	PBS	5.1.2.e		neg		30,08	
65	PBS	5.1.2.e		neg		30,12	
66	PBS	5.1.2.e		neg		30,05	
67	PBS	5.1.2.e		neg		30,1	
68	PBS	5.1.2.e		neg		30,44	
69	PBS	5.1.2.e		neg		30,48	
70	PBS	5.1.2.e		neg		30,26	
71	PBS	5.1.2.e		neg		30,46	

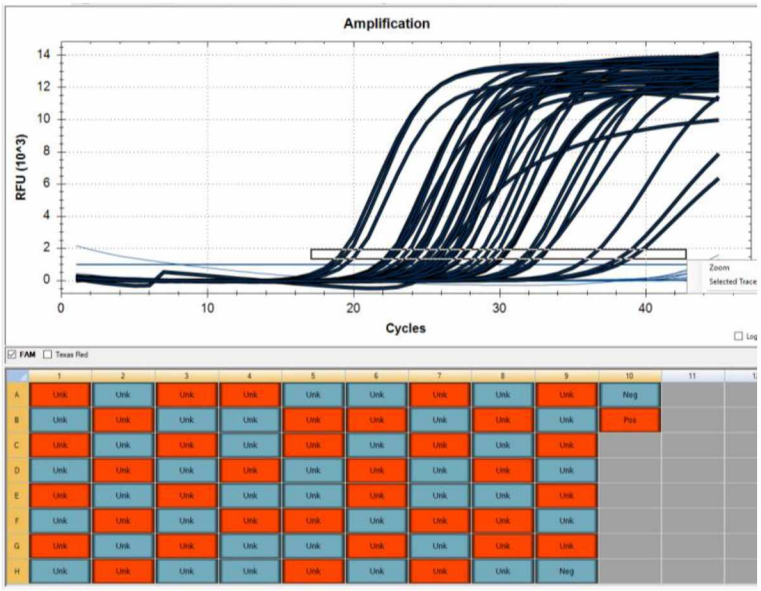


Figuur 3: Resultaat CFX curves "end-to-end test" MPXV PCR. 41 monsters + PC MPXV komen positief op en 11 negatief.

In het tweede experiment komen 34 samples na analyseren postitief met LabTrain. De resultaten zijn ook terug te zien in tabel 5 en figuur 9, waarbij 35 curves opkomen + PC MPXV. Met rood gemarkeerd zijn negatieve samples, waarvan verwacht werd dat deze positief zullen zijn. Het Ct waarde van CFX ligt gemiddeld 4 Ct`s hoger dan routine. Voor de interne controle,waar deze in de routine geremd waren zijn deze ook op Sanquin geremd of hebben een hoger Ct waarde. Alle negatieve resultaten komen overeen

Tabel 5: Vergelijking resultaten "end-to-end test 2" MPXV PCR op Sanquin en MPX routine PCR. 35 samples zijn positief na analyse. Alle swabs die in PBS zijn gedipt, zijn negatief.

	Patientnummer	"Dummy" nummer	Ct routine PXV	Ct CFX MPXV	Routine PhHV	CFX PhHV	Verschil Routine en CFX
1	5.1.2.e	5.1.2.e	20,22	23,26	+	Geremd	3,04
2	5.1.2.e	5.1.2.e	16,48	18,34	Geremd	Geremd	1,86
3	5.1.2.e	5.1.2.e	22,21	26,03	+	30.69	3,82
4	5.1.2.e	5.1.2.e	22,07	25,01	+	32.63	2,94
5	5.1.2.e	5.1.2.e	19,63	22,1	-	Geremd	2,47
6	5.1.2.e	5.1.2.e	27,01	22,07	+	Geremd	-4,94
7	5.1.2.e	5.1.2.e	25,02	27,7	+	30.62	2,68
8	5.1.2.e	5.1.2.e	20,70	24,3	-	33.25	3,6
9	5.1.2.e	5.1.2.e	24,77	28,96	+	30.28	4,19
10	5.1.2.e	5.1.2.e	21,43	24,53	-	32.16	3,1
11	5.1.2.e	5.1.2.e	24,13	25,19	-	Geremd	1,06
12	5.1.2.e	5.1.2.e	32,8	38,11	+	30.64	5,31
13	5.1.2.e	5.1.2.e	18,86	21,65	-	Geremd	2,79
14	5.1.2.e	5.1.2.e	32,09	35,38	+	30.60	3,29
15	5.1.2.e	5.1.2.e	15,85	19,39	-	Geremd	3,54
16	5.1.2.e	5.1.2.e	33,99		+	30.78	-
17	5.1.2.e	5.1.2.e	21,93	26,18	-	30.45	4,25
18	5.1.2.e	5.1.2.e	19,45	21,83	Geremd	Geremd	2,38
19	5.1.2.e	5.1.2.e	24,64	28,29	+	30.40	3,65
20	5.1.2.e	5.1.2.e	35,33	37,36	+	30.83	2,03
21	5.1.2.e	5.1.2.e	25,94	29,63	+	30.63	3,69
22	5.1.2.e	5.1.2.e	27,85	32,21	+	30.37	4,36
23	5.1.2.e	5.1.2.e	17,25	23,51	Geremd	33.29	6,26
24	5.1.2.e	5.1.2.e	18,56	23,72	Geremd	32.85	5,16
25	5.1.2.e	5.1.2.e	16,9	25,79	Geremd	30.49	8,89
26	5.1.2.e	5.1.2.e	15,5	18,77	Geremd	Geremd	3,27
27	5.1.2.e	5.1.2.e	24,58	29,5	+	30.53	4,92
28	5.1.2.e	5.1.2.e	29,04	32,01	+	30.54	2,97
29	5.1.2.e	5.1.2.e	19,34	26,89	+	30.24	7,55
30	5.1.2.e	5.1.2.e	27,77	31,07	+	30.65	3,3
31	5.1.2.e	5.1.2.e	25,2	29,38	+	30.70	4,18
32	5.1.2.e	5.1.2.e	21,14	25,27	+	31.82	4,13
33	5.1.2.e	5.1.2.e	19,39	23,31	+	Geremd	3,92
34	5.1.2.e	5.1.2.e	19,36	25,6	+	31.51	6,24
35	5.1.2.e	5.1.2.e	18,2	22,77	+	Geremd	4,57
36	5.1.2.e	5.1.2.e	21,65	26,71	+	31.67	5,06
37	PBS	5.1.2.e				30.58	
38	PBS	5.1.2.e				30.69	
39	PBS	5.1.2.e				31.03	
40	PBS	5.1.2.e				31.03	
41	PBS	5.1.2.e				29.44	
42	PBS	5.1.2.e				30.94	
43	PBS	5.1.2.e				30.77	
44	PBS	5.1.2.e				30.76	
45	PBS	5.1.2.e				30.81	
46	PBS	5.1.2.e				30.95	
47	PBS	5.1.2.e				30.52	
48	PBS	5.1.2.e				30.92	
49	PBS	5.1.2.e				30.83	
50	PBS	5.1.2.e				30.72	
51	PBS	5.1.2.e				30.57	
52	PBS	5.1.2.e				30.60	
53	PBS	5.1.2.e				30.59	
54	PBS	5.1.2.e				30.66	
55	PBS	5.1.2.e				30.74	
56	PBS	5.1.2.e				30.67	
57	PBS	5.1.2.e				30.78	
58	PBS	5.1.2.e				30.94	
59	PBS	5.1.2.e				30.65	
60	PBS	5.1.2.e				30.64	
61	PBS	5.1.2.e				30.74	
62	PBS	5.1.2.e				30.72	
63	PBS	5.1.2.e				30.96	
64	PBS	5.1.2.e				30.69	
65	PBS	5.1.2.e				30.93	
66	PBS	5.1.2.e				30.82	
67	PBS	5.1.2.e				30.77	
68	PBS	5.1.2.e				30.78	
69	PBS	5.1.2.e				30.83	
70	PBS	5.1.2.e				30.55	
71	PBS	5.1.2.e				31.02	



Figuur 4: Resultaat CFX curves "end-to-end test" MPXV PCR. 35 monsters + PC MPXV komen positief op en 35 negatief.

Conclusie/Discussie

Uit de schaakbordtesten kan geconcludeerd worden dat de pipteerrobot Myra geschikt is om door de aluminium seal op de 96 well plaat te prikken. Hiermee zijn alle protocollen geoptimaliseerd en is de threshold voor de Biorad CFX bepaald. Er heeft geen contaminatie plaatsgevonden met dit protocol. In het eerste MPX schaakbord experiment is er een kleine waaier zichtbaar (Ct>40), wat een indicatie is dat er blijvende aandacht moet zijn voor mogelijke contaminatie, een andere mogelijke verklaring is dat er wat aspecifieke probe afbraak heeft plaats gevonden. Met de schaakbordtest MPX zijn ook de twee verschillende CFX apparaten met elkaar vergeleken. CFX Zee had een gemiddelde Ct van 31,48 en CFX BioRad 5 een gemiddelde van 31,66. Hieruit kan geconcludeerd worden dat er geen verschil is tussen de twee type CFX-en zijn.

In experiment 3 & 4 is het proces vergeleken met het dubbeldraaien van monsters van de NA, in experiment 3 PBS eluaat van de droge stokken, en in experiment 4 dubbel afgenomen droge stokken uit de eerdere technische validatie. Alle uitslagen van patiënten komen overeen met uitslagen vanuit de routine en ook met uitslagen van AMC. Hierdoor wordt het eerste criteria behaald. Wel worden er op swab niveau samples gemist en hierdoor wordt het tweede gestelde criteria niet behaald. Dit is deels te verklaren op basis van de Ct waardes, gemiste MPX hebben een Ct (>35) in de routine en is vaak afnamelocatie keel, ook worden er twee met een Ct>36 wel positief op locatie Sanquin waar deze negatief waren op de NA. Een keelmonster met een Ct28 werd niet opgepikt op locatie sanquin, mogelijk is deze niet goed gepipetteerd. Deze discrepanties hadden allemaal geen invloed op de uiteindelijke uitslag de patiënt.

Het gemiddeld verschil Ct tussen routine en sanquin is gemiddeld < 1 uit experiment 3 en < 2 uit experiment 4. Alle curves zien er goed uit. Deze waardes zijn acceptabel.

Om het gehele proces van monster ontvangst tot resultaat in labtrain, zijn er stokken voorbereid door ze te dippen in PBS (neg) of in positieve PBS eluaten. Hierbij wordt het proces beoordeelt op POS/NEG uitslag, rekening houdend met de variabelen resulterend uit het protocol: schone swabs zijn in positieve eluaat gedipt die door het vries-dooi preoces zijn geweest. Een ander variabel zit in hoe lang en diep de swabs in het eluaat zijn geweest. Verder worden ze weer in 600 µl PBS verder geëlueerd. Deze variabelen hebben tot gevolg dan de positieve materiaal zijn verder verdund worden met een hogere Ct waarde tot gevolg. Ct-waardes die al hoog zijn, zijn dan zo doorverdund dat ze niet door de PCR opgepikt kunnen worden.

In de `end-to-end test 1` waren 4 positieve samples gemist, en kwamen er nog een aantal verbeterpunten naar boven.

- Na het pipeteren van de eluaten door pipeteerrobot Myra 1 van 2ml epjes naar plaat, was op de plaat druppel opgemerkt. Dit is contaminatie gevoelig en zeker niet gewenst. Mogelijk is dit een gevolg van het verhuizen van de Myra. De reserve kop van pipetteerrobot werd geplaats en opnieuw volledig gekalibreerd. Tijdens het uitvoeren van het `end-to-end test` 2 was deze probleem opgelost.
- Na afloop van de `end-to-end test 1` run was te merken dat de PCR mix op was, maar geen melding vanuit de Myra 2 was. In de plaat was ook te zien dat in een rij geen mix was. Dit komt voort uit een aanpassing in de software, omdat er door de folie van de plaat heen geprikt moet worden, dit heeft helaas ook effect op de meldingen voor de epjes. De analist moet altijd oplettend zijn om genoeg mix te plaatsen in de Myra en ook rekening houden met dood volume. Er zijn templates voor de Myra gemaakt en in de Myra werkinstructie is er duidelijk aangegeven hoeveel mix te maken en hoe de plaatsen in de Myra.

De `end-to-end test 2` was succesvol, het proces is soepel verlopen. Alle negatieven waren negatief en er waren 35/36 positief, het gemiddelde verschil tussen de resultaten van Sanquin en routine 4 Ct. Het gemiste monster had een Ct van 34 in de routine, en het is dus goed verklaarbaar door de methode toegepast.

In de “end-to-end” test komt naar voren dat het proces van begin tot eind ongeveer 5 uur in beslag kan nemen. Dit betekent dat wanneer samples op tijd op Sanquin zijn, uitslagen dezelfde dag uitgegeven kunnen worden. De doorlooptijd blijft hierdoor vergelijkbaar met de doorlooptijd die op de Nieuwe Achtergracht momenteel gehanteerd wordt.

Bijlage I

Schaakbordtest PhHV en MPXV

Tabel 1: Cq waardes van PhHV schaakbord test 1 en 2

		10x verdunning	5x verdunning
		2µl input	3µl input
Well	**Target**	**Cq**	Cq
A01	**PBS**	neg	neg
B01	**PhHV**	38.55	35.34
C01	**PBS**	neg	neg
D01	**PhHV**	34.78	34.87
E01	**PBS**	neg	neg
F01	**PhHV**	35.04	35.06
G01	**PBS**	neg	neg
H01	**PhHV**	38.26	33.53
A02	**PhHV**	neg	35.11
B02	**PBS**	neg	neg
C02	**PhHV**	34.44	34.38
D02	**PBS**	neg	neg
E02	**PhHV**	34.98	35.05
F02	**PBS**	neg	neg
G02	**PhHV**	35.97	35.24
H02	**PBS**	neg	neg
A03	**PBS**	neg	neg
B03	**PhHV**	34.33	34.99
C03	**PBS**	neg	neg
D03	**PhHV**	35.13	35.10
E03	**PBS**	neg	neg
F03	**PhHV**	35.43	34.78
G03	**PBS**	neg	neg
H03	**PhHV**	35.86	35.58
A04	**PhHV**	neg	32.73
B04	**PBS**	neg	neg
C04	**PhHV**	35.40	34.67
D04	**PBS**	neg	neg
E04	**PhHV**	34.57	35.38
F04	**PBS**	neg	neg
G04	**PhHV**	neg	38.83
H04	**PBS**	neg	neg
A05	**PBS**	neg	neg
B05	**PhHV**	34.77	36.26
C05	**PBS**	neg	neg
D05	**PhHV**	35.19	34.39
E05	**PBS**	neg	neg

F05	PhHV	39.66	34.31
G05	PBS	neg	neg
H05	PhHV	35.18	35.79
A06	PhHV	35.04	35.47
B06	PBS	neg	neg
C06	PhHV	35.81	neg
D06	PBS	neg	neg
E06	PhHV	38.64	35.04
F06	PBS	neg	neg
G06	PhHV	35.89	34.44
H06	PBS	neg	neg
A07	PBS	neg	neg
B07	PhHV	35.87	34.64
C07	PBS	neg	neg
D07	PhHV	36.32	34.73
E07	PBS	neg	neg
F07	PhHV	35.16	34.27
G07	PBS	neg	neg
H07	PhHV	35.27	neg
A08	PhHV	35.57	35.21
B08	PBS	neg	neg
C08	PhHV	34.64	neg
D08	PBS	neg	neg
E08	PhHV	neg	35.17
F08	PBS	neg	neg
G08	PhHV	36.67	38.93
H08	PBS	neg	neg
A09	PBS	neg	neg
B09	PhHV	34.01	38.75
C09	PBS	neg	neg
D09	PhHV	35.58	34.77
E09	PBS	neg	neg
F09	PhHV	34.98	35.03
G09	PBS	neg	neg
H09	PhHV	35.23	34.79
A10	PhHV	35.14	neg
B10	PBS	neg	neg
C10	PhHV	35.16	34.73
D10	PBS	neg	neg
E10	PhHV	38.70	35.63
F10	PBS	neg	neg
G10	PhHV	35.56	35.81
H10	PBS	neg	neg
A11	PBS	neg	neg
B11	PhHV	36.18	35.40
C11	PBS	neg	neg
D11	PhHV	neg	34.71

E11	**PBS**	neg	neg
F11	**PhHV**	35.54	35.25
G11	**PBS**	neg	neg
H11	**PhHV**	36.42	35.36
A12	**PhHV**	37.21	35.44
B12	**PBS**	neg	neg
C12	**PhHV**	36.27	36.01
D12	**PBS**	neg	neg
E12	**PhHV**	38.34	39.11
F12	**PBS**	neg	neg
G12	**PhHV**	neg	36.43
H12	**PBS**	neg	neg

Tabel 2 Schaakbordtest MPXV

		CFX Zee "nieuw"	CFX Biorad 5 "oud"
Well	Target	Cq	Cq
A01	PBS	neg	neg
B01	MPXV	31.47	31.60
C01	PBS	neg	neg
D01	MPXV	31.44	31.89
E01	PBS	neg	neg
F01	MPXV	31.75	31.65
G01	PBS	neg	neg
H01	MPXV	29.84	31.92
A02	MPXV	31.32	31.53
B02	PBS	neg	neg
C02	MPXV	31.56	31.82
D02	PBS	neg	neg
E02	MPXV	32.15	31.70
F02	PBS	neg	neg
G02	MPXV	31.79	31.69
H02	PBS	neg	neg
A03	PBS	neg	neg
B03	MPXV	31.53	31.53
C03	PBS	neg	neg
D03	MPXV	31.30	31.59
E03	PBS	neg	neg
F03	MPXV	31.53	31.50
G03	PBS	39.17	neg
H03	MPXV	31.59	31.65
A04	MPXV	31.50	31.82
B04	PBS	neg	neg
C04	MPXV	31.31	31.80
D04	PBS	neg	neg
E04	MPXV	31.37	31.26
F04	PBS	neg	neg
G04	MPXV	31.79	31.66
H04	PBS	neg	neg
A05	PBS	neg	neg
B05	MPXV	31.51	31.66
C05	PBS	neg	neg
D05	MPXV	31.25	31.61
E05	PBS	neg	neg
F05	MPXV	31.49	31.62

G05	PBS	neg	neg
H05	MPXV	31.50	31.67
A06	MPXV	31.54	31.65
B06	PBS	neg	neg
C06	MPXV	31.52	32.03
D06	PBS	neg	neg
E06	MPXV	31.62	31.44
F06	PBS	neg	neg
G06	MPXV	31.83	31.46
H06	PBS	neg	neg