akkoord 5.1.2,e 11/7/22

Uitbreiding validatie MPX PCR – E-swab versus PBS afnamemedium.

Uitgevoerd door:

5.1.2,e senior analist
Verslag en eindverantwoordelijke 5.1.2,e (MMM)
11-7-2022

Vraagstelling

Momenteel wordt een huidafname op locatie anus, keel of blaasje afgenomen met een droge Copan swab. Deze wordt op het Streeklaboratorium geëlueerd in 700 µL PBS. Daarvan wordt 50 µL 'opgekookt' (15 minuten 95◦C) en daarvan wordt 2 µL in een qPCR op MPX virus getest.

De vraagstelling is nu of er ook e-swab medium gebruikt kan worden voor de afnameswab. In dat geval wordt de swab direct bij afname in een Copan e-swab buis (roze dop) mét medium geplaatst en vindt de elutie al plaats tijdens transport naar het laboratorium. De analist haalt dan, na verwijderen van de swab, 50 µL uit het met e-swab medium en 'kookt dit op'.

De beste vergelijking tussen PBS en e-swab medium zou zijn door dubbele afname van precies dezelfde huid locatie. Dit is lastig te organiseren en daarom is er een simulatie proef uitgevoerd door e-swab medium te 'spiken' met positief PBS materiaal waarvan de Ct waarde bekend was.

Vraagstellingen:

1. Is het mogelijk om een PCR signaal te krijgen bij gebruik van e-swab medium?
2. Zo ja, is er een verschil in gevoeligheid tussen gebruik van e-swab medium tov PBS?
3. Hoe ver kan er verdund worden in e-swab medium totdat het signaal verdwijnt?

Er worden twee DNA extractie methoden met elkaar vergeleken:
A. Opkoken en B. de MP24 extractie.

Werkwijze

PBS van vijf patiënten met bekende Ct waarden van ongeveer 25 Ct is eerder opgeslagen PBS uit de vriezer gehaald. Er is 200 µL PBS toegevoegd aan 1000 µL (=1 ml) schoon e-swab medium. Dit is verdunning 1:6.
Vervolgens is door-verdund door steeds 20 µL van deze uitgangoplossing (stock) toe te voegen aan 180 µL e-swab medium (10^{-1}t/m 10^{-4}) alle materialen zijn in duplo getest in de MPX PCR.
De Ct waarden zijn vergeleken. Eén Ct waarde is een verdubbeling van aantal amplificaten, dus factor 2 stijging. Een 1:6 verdunning geeft daarom een Ct waarde stijging van $^{2}\log 6 = 2{,}58$ Ct.
Een 1:10 (factor 10) verdunning geeft een verwachte Ct waarde stijging van $^{2}\log 10 = 3{,}32$ Ct.

Resultaten en Discussie

Opkoken als extractie

De resultaten van de MPX PCR op de materialen en verdunningen van de 5 materialen zijn te zien in de tabel in Bijlage 1. De gemiddelde Ct waarden van de duplo testen zijn gebruikt voor de berekening.

Antwoorden op de vragen:
1. Er kan inderdaad een signaal gezien worden in de MPX PCR bij gebruik van e-swab medium.
2. Voor 4 patiënt materialen is er een gemiddelde Ct stijging van 4 á 5 Ct. Dit is veel hoger dan de verwachtte 2,58 Ct bij 1: 6 verdunning. Dit betekent dat er ten minste factor 4 minder sensitief gemeten wordt in e-swab medium. Bij de 5^e patiënt leek er een daling te zijn van 2 Ct in het verdunde e-swab materiaal. Hier lijkt iets niet goed gegaan te zijn.
3. Voor alle 5 patiënt materialen was er een omslag van pos naar neg bij de verdunningen 10^{-2} naar 10^{-3}.

Het is mogelijk dat opkoken minder goed werkt voor e-swab medium. Daarom moet de proef worden herhaald en uitgebreid met een MP24 extractie. Daarbij is vooral vraag 2 van belang.

MP24 extractie

Deze test moet nog worden uitgevoerd

Conclusie (voorlopig)

Het gebruik van e-swab medium geeft een verlies in sensitiviteit van ongeveer factor 4. Vooralsnog blijft de voorkeur om droge swabs te gebruiken voor de beste senitiviteit.

Bijlage 1

Tabel 1 Opkoken

Monster	Ct-waarde MPXV	gemiddelde Ct-waarde	verschil Ct PBS-eswab	Ct stijging boven verwachting
5.1.2,e onv PBS	25,09	25,09	-5,4	-2,82
5.1.2,e onv PBS	25,09			
verd 1:6	30,39	30,49		
verd 1:6	30,59			
verd 10-1	35,21	35,51		
verd 10-1	35,81			
verd 10-2	38,07	37,885		
verd 10-2	37,7			
verd 10-3	neg			
verd 10-3	neg			
verd 10-4	neg			
verd 10-4	neg			
5.1.2,e onv PBS	23,92	23,96	-4,69	-2,11
5.1.2,e onv PBS	24			
verd 1:6	28,73	28,65		
verd 1:6	28,57			
verd 10-1	33,6	33,585		
verd 10-1	33,57			
verd 10-2	36,67	36,77		
verd 10-2	36,87			
verd 10-3	neg			
verd 10-3	neg			
verd 10-4	neg			
verd 10-4	neg			
5.1.2,e onv PBS	25,25	25,3	-4,61	-2,03
5.1.2,e onv PBS	25,35			
verd 1:6	29,97	29,91		
verd 1:6	29,84			
verd 10-1	35,08	35,88		
verd 10-1	36,68			
verd 10-2	40	38,9		
verd 10-2	37,8			
verd 10-3	neg			
verd 10-3	neg			
verd 10-4	neg			
verd 10-4	neg			
5.1.2,e onv PBS	24,21	24,28	-4,36	-1,78
5.1.2,e onv PBS	24,35			

verd 1:6	28,55	28,64		
verd 1:6	28,72			
verd 10-1	32,61	32,72		
verd 10-1	32,82			
verd 10-2	40	39,03		
verd 10-2	38,05			
verd 10-3	neg			
verd 10-3	neg			
verd 10-4	neg			
verd 10-4	neg			
5.1,2,e onv PBS	29,05	28,91	2,19	4,77
5.1,2,e onv PBS	28,77			
verd 1:6	26,66	26,73		
verd 1:6	26,79			
verd 10-1	33,48	33,37		
verd 10-1	33,25			
verd 10-2	35,77	36,80		
verd 10-2	37,83			
verd 10-3	neg			
verd 10-3	neg			
verd 10-4	neg			
verd 10-4	neg			
NEC	neg			
NEC	neg			
T10	neg			
PC MPXV	31,58	31,58	31,58	31,58

De Ct waarde 40 betekent negatief; er is hier voor het gemiddelde gerekend met waarde Ct=40.