akkoord 5.1,2,e

6/7/2022

Uitbreiding validatie MPX PCR - Beta-globine als alternatieve interne controle.

Uitgevoerd door:

5.1,2,e (MMMi.o.)

5.1,2,e (analist)

Eindverantwoordelijke 5.1,2,e (MMM)

Introductie

Momenteel wordt er een PhHV interne PCR controle gebruikt voor de MPX PCR. Hierbij wordt er alleen gekeken naar remmende factoren in het DNA sample in de PCR reactie. Met een Beta-globine controle wordt er gekeken naar de remming van de PCR maar deze zal ook negatief worden wanneer er een onjuiste afname of DNA extractie heeft plaatsgevonden. In dit verslag wordt er gekeken of het Beta-globine gen, dat in elke menselijke celkern 2x voorkomt, een geschikte alternatieve interne controle (IC) is. Daarbij wordt er gekeken naar welke hoeveelheid herhalingen het gebruik van Beta-globine als interne controle zal geven, dus het percentage patiënten dat geen directe uitslag kan krijgen. Er worden twee DNA extractie methoden met elkaar vergeleken: de MP24 extractie en extractie d.m.v. opkoken.

Werkwijze

Van iedere patiënt zijn er drie swab afnames gedaan van de anus, de keel en van blaasjesvocht. Een monster wordt herhaalt als er niet met zekerheid een negatieve MPX uitslag kan worden gegeven. Dit is op het moment dat een monster negatief test op Beta-globine en er geen ander positief MPX monster is voor een patiënt. Dit betekent ook dat een patiënt alleen negatief kan worden bevonden indien alle monsters een positieve Beta-globine uitslag hebben.

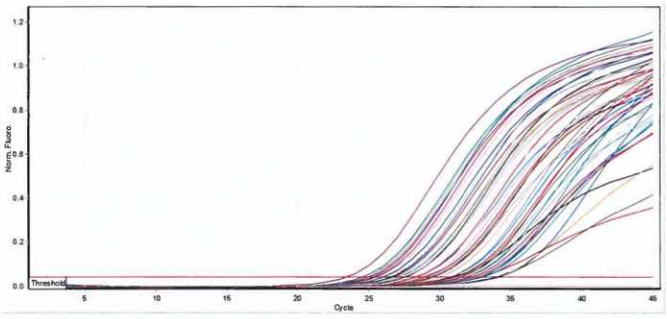
In totaal zijn er voor de MP24 extractie 139 monsters van 46 patiënten gebruikt, waarbij er één extra blaasjesvocht is afgenomen bij een patiënt. De DNA extracten uit de MP24 zijn eerst getest op MPX en daarna op Beta-globine in DNA 2-staps PCR (MOBIOL/051 β-globine).

Voor het opkoken zijn er in totaal 65 monsters gebruikt van 22 patiënten, waarbij er bij één patiënt geen blaasjesvocht is afgenomen. Deze zijn ook getest op MPX virus met PCR

Resultaten

In figuur 1 is een Rotorgene resultaat te zien van 70 Beta-globine PCR resultaten: er is een hele waaier van curves.

Figuur 1. Beta globine PCR (Oranje) eerste 70 monsters



Discussie

Uit dit onderzoek is gebleken dat het toepassen van Beta-globine PCR zou leiden tot een grote toename van herhalingen bij patiënten die negatief zijn, bij beide extractie methodes. Echter, de mate waarin dit effect zal hebben in praktijk is afhankelijk van de MPX prevalentie. Indien er op grotere schaal getest zal gaan worden, met meer kans op patiënten zonder Monkeypox infectie, zal dit in praktijk een grote impact hebben.

Testen op de aanwezigheid van het Beta-globine gen betekent dat er wordt gekeken naar de aanwezigheid van menselijke cellen, die elk 2 kopiën van dit gen per cel hebben. Dat dan de keelmonsters het beste scoren komt omdat er langs een cellaag (mucus) wordt gestreken. Toch is er dan nog steeds in ongeveer 10% van de monsters geen positief beta-globine PCR signaal. De grote hoeveelheid Beta-globine negatieve anus monsters komt mogelijk door remmende PCR factoren uit de feces. Deze anusmonsters en ook de blaasjesvocht /ulcus monsters bevatten waarschijnlijk wel veel virus en ze kunnen dan ook positief zijn voor MPX PCR. In de klinische validatie waren er ook 2 discrepante uitslagen met het AUMC (1x keel, 1x anus) die in de Beta-globine PCR negatief waren. Mogelijk is deze discrepantie daar voortgekomen door de afname kwaliteit van de dubbel afgenomen stokken (meer of minder cellen meegenomen).

Momenteel wordt PhHV toegevoegd voor de MPX als IC. Tot op heden (eind juni 2022) zijn er 484 MPX PCRs uitgevoerd waarvan er in 7 PhHV IC geremd waren, dit komt er op neer dat 1.5% van het totaal aantal monsters dat herhaald is. Uit deze validatie blijkt dat het gebruik van Beta-globine als controle tot een veel groter percentage herhalingen zal leiden, zelfs 40 – 50% van de anus swabs.

PhHV als interne controle is dus een betere methode om de kwaliteit van de extractie te bepalen. Bij twijfel over afnamekwaliteit kan er mogelijk alsnog een Beta-globine PCR ingezet worden, want daarvoor hoeft niets extra toegevoegd te worden. De gebruikte extractie methode (MP24 of opkoken) heeft geen invloed op de uitkomst van het gebruik van de Beta-Globine PCR.

Conclusie

Beta-Globine als alternatieve interne controle van PhHv is niet geschikt. Het gebruik van Beta-globine zal leiden tot een grote toename van het aantal herhalingen, en is vooral ongeschikt voor een test op anus of blaasjesvocht.

	5.1,2,e	Afnamelocatie	Beta-Globine PCR (CT)	Mpox PCR (CT)	Patient Herhalen?
Patient 1		Anus	29,81	34,4	
		Keel	34,03		
		Blaasjesvocht	23,79	24,6	
Patient 2		Anus	24,76	29,35	
		Keel	27,97		
		Blaasjesvocht	24,91	24,95	
Patient 3		Anus			Ja
		Keel	31,95		
		Blaasjesvocht	27,82		
Patient 4		Anus			Nee
		Keel	34,25		
		Blaasjesvocht		31,92	
Patient 5		Anus			Nee
		Keel	32,21		
		Blaasjesvocht	29,85	25,89	
Patient 6		Anus	27,32		Ja
		Keel			
		Blaasjesvocht			
Patient 7		Anus	33,23		
		Keel	31,93		
		Blaasjesvocht	30,07		
Patient 8		Anus			Ja
		Keel	27,84		
		Blaasjesvocht			
Patient 9		Anus	31,58		
		Keel	28,44		
		Blaasjesvocht	29,00		
Patient 10		Anus			Ja
		Keel	30,24		
		Blaasjesvocht			
Patient 11		Anus	30,67		
		Keel	28,35		
		Blaasjesvocht	25,11		
Patient 12		Anus	21,66	17,99	
		Keel	30,54	36,94	
		Blaasjesvocht	22,52	18,81	
Patient 13		Anus			Ja
		Keel	27,84		
		Blaasjesvocht	25,58		
Patient 14		Anus	29,78	25,14	
		Keel	28,53	32,67	
		Blaasjesvocht	23,41	18,74	

	5.1,2,e				
		Blaasjesvocht	24,71	19.7	
Patient 29		Anus	29,23		
		Keel	27,02		
		Blaasjesvocht	24,74		
Patient 30		Anus	25,52	21.58	
		Keel	26,64	24.93	
		Blaasjesvocht	27,15	21.71	
Patient 31		Anus			
		Keel	31,76		Ja
		Blaasjesvocht	32,67		
Patient 32		Anus	25,95	26.87	
		Keel	29,00		
		Blaasjesvocht	25,38		
Patient 33		Anus	28,49		
		Keel	32,60		
		Blaasjesvocht	30,85		
Patient 34		Anus		28.48	
		Keel	29,37	32.11	Nee
		Blaasjesvocht	28,32		
Patient 35		Anus			
		Keel	26,59		Ja
		Blaasjesvocht			
Patient 36		Anus			
		Keel	30,70		Ja
		Blaasjesvocht			
Patient 37		Anus			
		Keel	31,13	36.8	Ja
		Blaasjesvocht	31,06	26.75	
Patient 38		Anus	27,54		
		Keel	33,01	35.67	
		Blaasjesvocht	27,21	22.2	
Patient 39		Anus	27,16		
		Keel	31,39		Ja
		Blaasjesvocht			
Patient 40		Anus	27,46	20.78	
		Keel	26,38	20.75	
		Blaasjesvocht	28,87	24.74	
Patient 41		Anus	29,51	25.97	
		Keel	33,88	36.11	Ja
		Blaasjesvocht		35.12	
Patient 42		Anus		33.15	
		Keel	32,74		Nee
		Blaasjesvocht			

Patient 11	5.1,2,e	Anus			Ja
		Keel	30,62		
		Ulcus			
Patient 12		Anus	22,04	21,15	
		Keel	29,30	38,29	
		Ulcus	22,91	18,92	
Patient 13		Anus	25,37		
		Keel	30,90		
		Ulcus	33,71		
Patient 14		Anus		24,07	Nee
		Keel	26,50	25,83	
N		Ulcus	22,29	18,41	
Patient 15		Anus			Ja
		Keel	32,74		
		Ulcus	31,91		
Patient 16		Anus			Ja
		Keel	32,44		
		Ulcus	32,64		
Patient 17		Anus			Ja
		Keel			
Patient 18		Anus	27,45		Ja
		Keel	28,68		
		Ulcus			
Patient 19		Anus	23,86	18,87	Nee
		Keel			
		Ulcus	26,35	21,33	
Patient 20		Anus			Nee
		Keel	29,74	32,05	
		Ulcus	31,19	28,16	
Patient 21		Anus			Nee
		Keel	30,04		
		Ulcus	29,87	28,96	
Patient 22		Anus			Nee
		Keel	30,99	37,22	
		Ulcus	29,64	27,06	