akkoord 5.1,2,e
20/7/22

Uitbreiding validatie MPX PCR - Duplex mix Monkeypox + PhHV

Uitgevoerd door:
5.1,2,e analist
5.1,2,e analist
5.1,2,e analist

Eindverantwoordelijke: 5.1,2,e (MMM)
Datum: 19-7-22

Achtergrond
Sinds de diagnostiek van Monkeypox van start is gegaan, worden alle samples ingezet in 2 verschillende PCR mixen: Monkeypox mix (MPXV mix) en een interne controle PhHV mix. Met het toenemende aantal Monkeypox monsters per dag, neemt de hoeveelheid Rotorgenes die nodig zijn toe wat deels voor de overige routine testen in de weg zit. Om de hoeveelheid Rotorgenes te verminderen, wordt in dit experiment gekeken naar een duplex mix van Monkeypox en PhHV. Met een duplex MPX + PhHV mix kun je 2 keer zo veel testen in 1 Rotorgene kwijt.

Vraagstelling
Is het gebruik van een duplex MPX + PhHV PCR mix even sensitief als het gebruik van aparte mixen voor MPX en PhHV in de monkeypox PCR diagnostiek?

Acceptatiecriteria
1. De meerderheid van de positieve monsters (>50%) moet in de duplex mix een even hoge of lagere Ct waarde hebben ten opzichte van de routine mix.
2. Alle patiënt uitslagen (pos/neg) dienen overeen te komen.

Werkwijze
Voor dit experiment zijn in totaal 37 monsters uit de routine nogmaals getest, ditmaal in een MPXV+ PhHV duplex mix in plaats van losse mixen voor MPXV en PhHV. Er zijn 12 monsters (4 anus, 4 keel en 4 ulcus = 4 patiënten) nogmaals getest op de dag dat ze ook voor routine waren getest. De overige 25 monsters (8 anus, 8 keel en 9 ulcus = 8 patiënten, waarvan 1 met dubbele ulcus afname) zijn 1 dag later getest en hebben een vries-dooi stap ondergaan. Ook was er 1 routine monster (ulcus) uitgezocht met een Ct rond de 25. Hiervan is een 10-stapsverdunningsreeks gemaakt en in duplo ingezet. In de duplex mix wordt 3 µL monster gebruikt in plaats van 2 µL zoals in de routine mix, dus factor 1,5 meer input.

De duplex MPX + PhHV mix is gemaakt volgens Tabel 1.
Alle monsters zijn opgekookt volgens SOP/MOBIOL/063 Monkeypox en ingezet in de duplex mix (20 µL mix + 3 µL monster + 2 µL PhHV) met het programma DNA 2-staps PCR.
De resultaten zijn verwerkt volgens SOP/MOBIOL/063 Monkeypox.

Tabel 1: Mixschema MPXV + PhHV duplex mix

Mastermix MPXV generic	1x (µL)
Rnase-free H20	3,625
2x Platinum Q-PCR supermix (Invitrogen)	12,5
MgCl2 (50 mM)	1,25
MPXV generic 10 uM Primermix	0,5
PhHV primermix	1,25
MPXV generic probe (10 uM)	0,25
PhHV probe (20 ng/µL)	0,625
Mix volume	20
Monster	3
PhHV	2
Totaal	25

Resultaten

De resultaten van de monsters in routine mix en duplex mix zijn te zien in Tabel 2. De Ct waardes van beide mixen komen goed overeen. Bij 1,5 x meer input (3 µL monster in plaats van 2 µL) is de verwachting dat de Ct waarde daalt met iets minder dan 1Ct.
In de meeste gevallen is het verschil inderdaad kleiner dan 1 Ct in het voordeel van de duplex mix. De duplex mix heeft dan een lagere Ct dan de routine mix. In 2 gevallen is de Ct waarde voor de duplex mix meer dan 1 Ct lager dan de routine mix. Ook geeft de duplex mix 3 extra monsters dubieus positief ten opzichte van de routine mix. Voor de uitslagen die de patiënten krijgen maakt dit maar in 1 van de gevallen uit, daar was de uitslag dubieus (Tabel 2).

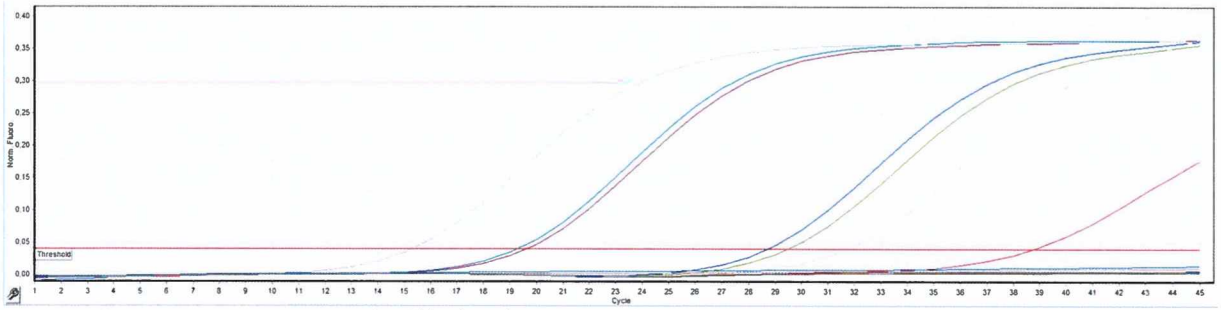
Tabel 2: Ct waardes uit de routine in vergelijking met de Ct waardes van de nieuwe duplex-mix.
Uitslag (pos, neg, dub) per patiënt is ook weergegeven. Monsters 1 t/m 12 zijn op de dag zelf nogmaals getest, monsters 13 t/m 37 één dag later dan routine. Rood gemarkeerd zijn de afwijkingen van de duplex mix ten opzichte van de routine, geel gemarkeerd zijn verschillen >1 Ct ten gunste van de duplex mix.

			Duplex mix			Routine			Verschil MPX Ct
	Werklijst	Materiaal	Ct MPXV	Ct PhHV	Uitslag	Ct MPXV	Ct PhHV	Uitslag	Routine - duplex mix
1	5.1,2,e	anus		25,57			26,28		
2	5.1,2,e	keel	29,48	25,38	pos	30,44	26,22	pos	0,96
3	5.1,2,e	ulcus	19,29	25,8		19,54	26,24		0,25
4	5.1,2,e	anus		25,51			26,38		
5	5.1,2,e	keel	28,71	25,31	pos	29,17	26,43	pos	0,46
6	5.1,2,e	ulcus	19,63	25,8		19,97	26,22		0,34
7	5.1,2,e	anus	38,75	25,52		35,28	26,32		-3,47
8	5.1,2,e	keel	31,76	25,6	pos	32,45	26,41	pos	0,69
9	5.1,2,e	ulcus	15,30	28,9		15,94	26,06		0,64
10	5.1,2,e	anus		25,38			26,39		
11	5.1,2,e	keel		25,42	neg		26,34	neg	
12	5.1,2,e	ulcus		25,42			26,53		
13	5.1,2,e	anus		25,49			26,08		
14	5.1,2,e	keel		25,5	neg		25,98	neg	
15	5.1,2,e	µL cus		25,53			26,19		
16	5.1,2,e	µL cus		25,25			26,12		

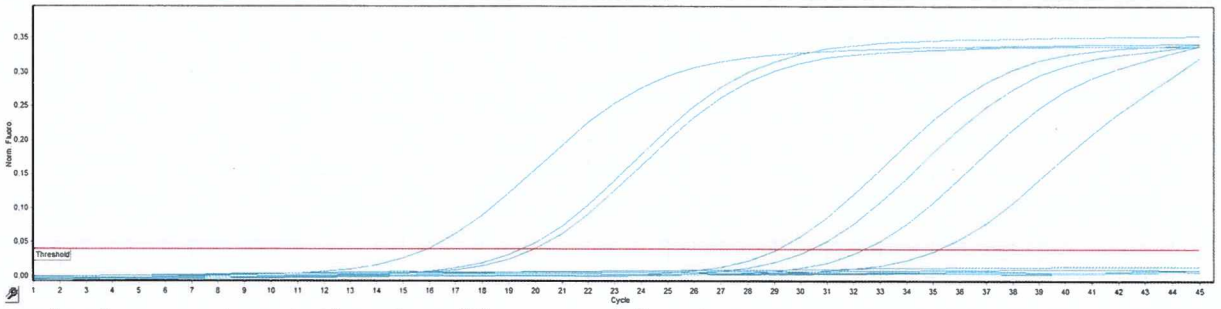
17	5.1,2,e	anus		25,5			25,91		
18	5.1,2,e	keel		25,62	neg		26,04	neg	
19	5.1,2,e	ulcus		25,54			25,92		
20	5.1,2,e	anus		25,68			26,07		
21	5.1,2,e	keel	37,49	25,41	pos		26,16	pos	NVT
22	5.1,2,e	ulcus	18,51	26,6		19,75	26,05		1,24
23	5.1,2,e	anus	34,48	24,99		29,87	26,14		-4,61
24	5.1,2,e	keel		25,5	pos		26,16	pos	
25	5.1,2,e	ulcus	14,30	29,89		16,33	25,94		2,03
26	5.1,2,e	anus	18,03	27,22		19,65	25,68		1,62
27	5.1,2,e	keel	37,51	25,43	pos		26,07	pos	NVT
28	5.1,2,e	ulcus		25,19			26,07		
29	5.1,2,e	anus		25,46			26,14		
30	5.1,2,e	keel		25,45	neg		25,92	neg	
31	5.1,2,e	ulcus		25,48			26,25		
32	5.1,2,e	anus		25,45			25,77		
33	5.1,2,e	keel		25,44	dub		26,17	neg	
34	5.1,2,e	ulcus	37,81	25,57			26,23		NVT
35	5.1,2,e	anus		25,57			26,14		
36	5.1,2,e	keel		25,61	pos		26,02	pos	
37	5.1,2,e	ulcus	24,62	25,35		25,91	26,05		1,29

In Figuur 1 zijn RotorGene voorbeelden te zien van de subsets van de PCR testen. Er is geen duidelijk verschil tussen de 'verse' monsters (van dezelfde dag) en de monsters die een dag eerder waren getest in de routine dan in de duplex PCR.

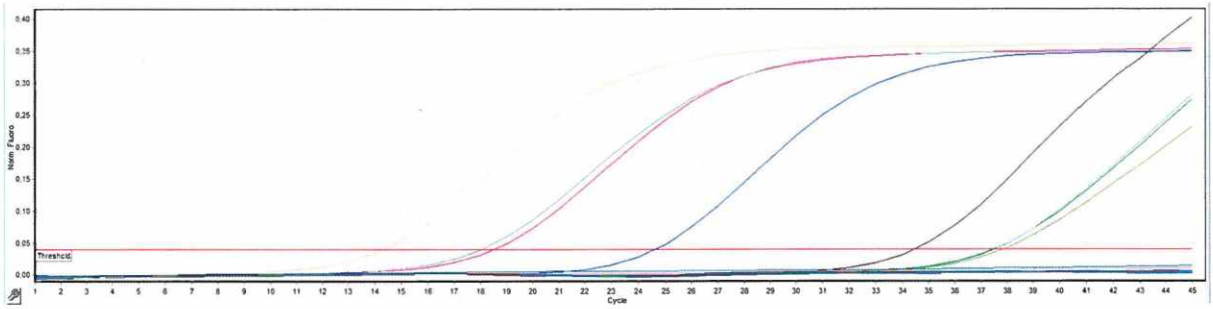
Figuur 1: Curves van de monsters getest in routine mix (b, d) en in duplex mix (a, c). Monsters zijn op dezelfde dag 2x getest (a,b) of met 1 dag verschil (c,d)



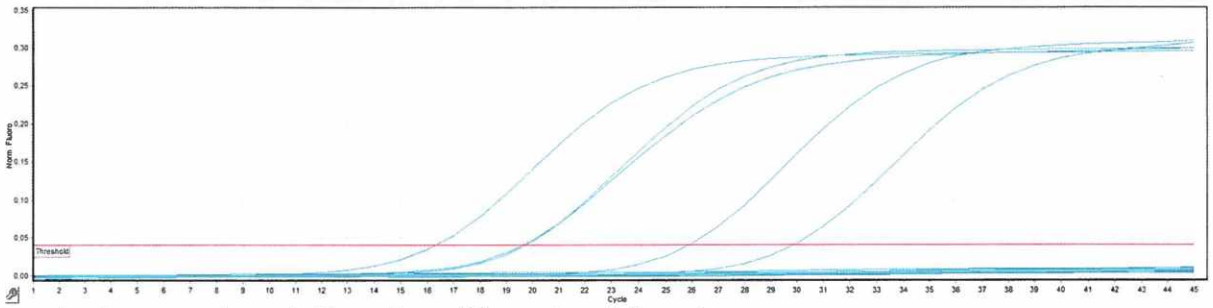
a. Curves monsters getest op dezelfde dag als routine in duplex mix



b. Curves monsters getest in routine, zelfde monsters als figuur 1a



c. Curves monsters getest 1 dag later als routine in duplex mix



d. Curves monsters getest in routine, zelfde monsters als figuur 1c

Criterium 1: In de routine waren er 12 MPX positieve materialen. In de duplex mix was er in 10/ 12 (83%) een lagere Ct waarde dan in de routine en daarmee een betere prestatie. Er zijn 2 monsters met een hogere Ct waarde in de duplex PCR: 5.1,2,e met 3,47 Ct 5.1,2,e met 4,61 Ct. Het eerstgenoemde monster had een Ct>36 en dat kan altijd sterk afwijken. Het 2e monster lijkt een uitbijter en heeft een onverwacht resultaat.

-Er wordt voldaan aan criterium 1.

Criterium 2: Van de 12 geteste patiënten hadden er 11 (dezelfde pos/neg uitslag. Eén patiënt zou herhaald moeten worden waarbij niet duidelijk is of die negatief zou blijven zoals in de routine of alsnog (zwak) positief zou zijn. Daarmee kan deze niet meegeteld worden en hebben de overige 11/11 patiënten dezelfde uitslag.

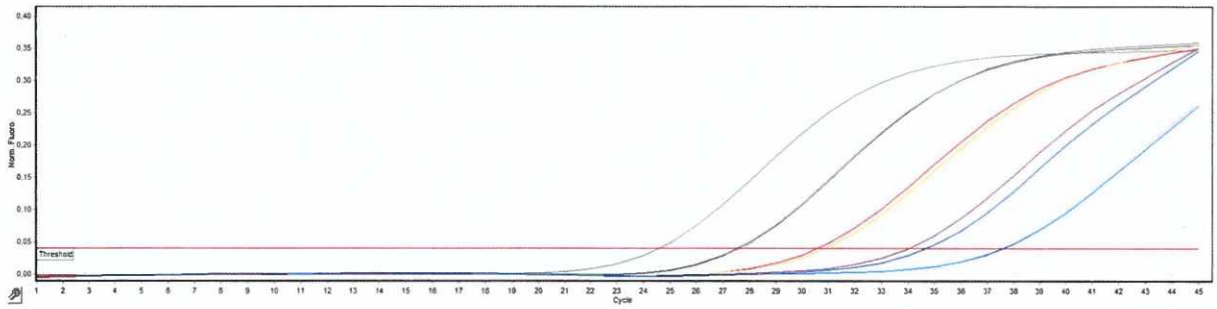
-Er wordt voldaan aan criterium 2.

Verdunningsreeks.

Het onverdunde monster van de 10-stapsverdunningsreeks heeft een vergelijkbare Ct waarde in de routine mix en de duplex MPX+PhHV mix (Tabel 3). Ook in de rest van de verdunningsstappen komt het monster op tot de laagst geteste verdunning 10^4. Bij een factor 10 verdunning is ereen verwachte stijging van 3,32 Ct. Elke verdunningsstap verschilt inderdaad gemiddeld 3,0 tot 3,6 Ct zoals verwacht bij een 10-stapsverdunningsreeks. De curves zijn te zien in Figuur 2.

Tabel 3: Ct waardes van de 10-stapsverdunningsreeks van 1 monster uit routine. 10^0 is het onverdunde monster

		10^0	10^1	10^2	10^3	10^4
5.1,2,e	routine	24,59				
5.1,2,e	duplex	24,61	27,62	30,59	34,69	37,53
5.1,2,e	duplex	24,59	27,55	30,89	34,01	37,62



Figuur 2: Curves 10-stapsverdunningsreeks in duplo van één positief monster getest in duplex MPX + PhHV mix

Discussie

De PBS monsters die getest zijn in de duplex MPX +PhHV mix komen goed overeen met de resultaten uit de routine single MPX PCR. De verwachte stijging van bijna 1 Ct door de input verhoging wordt ook gezien.

Er zijn 5 discrepanties gevonden gebaseerd op de Ct waardes. Voor 2 monsters was het verschil tussen routine mix en duplex mix groter dan 1 Ct ten nadele van de duplex mix. Voor de uiteindelijke uitslag van de patiënt maakte dit niet uit, deze blijft hetzelfde. Verder kwamen er in de duplex mix 3 monsters zwak op die in de routine negatief waren. Deze 3 hadden allen een Ct >36 en zouden dubieus gevonden worden. In 2 van deze gevallen had dat ook geen invloed op de uiteindelijke uitslag voor de patiënt. Het andere monster zou herhaald worden.

De verdunningsreeks laat mooie duplo resultaten zien en volgens verwachting is elke verdunningsstap gemiddeld ruim 3 Ct hoger dan de vorige.

Conclusie

Er wordt voldaan aan de acceptatiecriteria.

De MPXV-PhHV duplex mix is een goede alternatieve mix voor de huidige routine mix.

Deze zou in praktijk zorgen voor een dubbele capaciteit aan MPX testen die gedaan kunnen worden.