akkoord 5.1,2,e
6/7/2022

Uitbreiding validatie MPX PCR Alternatieve Extractie methode - opkoken PBS

Uitgevoerd door:

5.1,2,e

5.1,2,e

Eindverantwoordelijke: 5.1,2,e
20-6-2022

Achtergrond

De validatie van monkeypox (MPX) diagnostiek is gestart met het uitgangspunt om de droge stok te vervangen voor een stok die direct na afname in de buis Lysis buffer zou gaan. Vanwege een tekort in afname materiaal met lysisbuffer buizen is er voor de start van de validatie voor gekozen om de droge stok te elueren in PBS en dan over te pipetteren in Lysisbuffer waarna extractie volgde middels de magnapure24 (MP24) . Uit de validatie is gebleken dat dit een geschikte maar ook tijdrovende en complexe methode is.
Voor de routine diagnostiek van HSV/VZV worden de geëlueerde samples in PBS 'opgekookt' (15 minuten bij 95 ◦C) i.p.v. een lysis/MP24. Dit alternatief voor extractie hier geëvalueerd.

Werkwijze
Zie bijlage 1 voor de werkinstructies
1) Retrospectief: 16 afname materialen; hiervan waren 14 pos en 2 neg MPX monsters met MP24
2) Prospectief: dubbeldraaien van 7 patiënten met 21 afname swabs van 3 anatomische locaties

Resultaten

1) Met de 'opkook' methode is er ongeveer factor 4 (= 2 Ct) meer input wat naar verwachting een lagere Ct waarde zal opleveren. In 13/14 positieve monsters komen de kwalitatieve uitslagen overeen. Eén monster met Ct 37.16, heeft met opkoken met een Ct van 42.56, dit zou in routine als negatief beoordeeld worden.

Met opkoken worden er inderdaad lagere Ct waarden gezien. Als het dubieuze monster (rood in Tabel 1) niet wordt meegerekend dan isdat gemiddeld (absoluut) 2,4 Ct (range 0.97 tot 3.47) lager. Als dit monster wel wordt meegerekend is het absolute gemiddelde 2,6 Ct.

Tabel 1. Resultaten MP24 extractie versus opkoken.

	MP24	Opkoken	
	Ct	Ct	Delta Ct
5.1,2,e	36,94	33,41	3,53
5.1,2,e	18,81	17,84	0,97
5.1,2,e	25,14	22,31	2,83
5.1,2,e	32,67	32,07	0,6
5.1,2,e	21,01	19,07	1,94
5.1,2,e	33,73	31,37	2,36
5.1,2,e	25,28	21,81	3,47
5.1,2,e	neg	neg	

Discussie

Volgens verwachting zijn de Ct waarden met de opkook methode lager dan met de MP24 methode. Dit zou, bij perfecte efficiëntie van de PCRs ongeveer 2 Ct waarden moeten zijn. In experiment 1 is dat ook het geval. In experiment 2 is het verschil meer dan 3 Ct waarden; mogelijk zijn de cut-off lijnen niet gelijk gezet en is daarom dat verschil groter dan verwacht. In beide experimenten is de kwalitatieve uitslag 100% hetzelfde.

In de totale evaluatie zijn er 2 discrepanties gevonden, waarvan 1 dubieuze uitslag (Ct 37) die met opkoken negatief werd (Ct 42). Daarbij is er een tweede monster met opkoken geremd dat niet geremd is met extractie middels de MP24. Dit zou mogelijk tot een laag aantal extra herhalingen kunnen leiden. In beide gevallen zijn het anus afnames. In het geval van MPX worden patiënten op meerdere afname locaties getest, waardoor er een kleine kans is van gemiste diagnoses.

Het direct opkoken van de PBS monsters resulteert inderdaad in de verwachte verbetering van Ct waardes. Daarnaast zijn er (veel) minder handelingen nodig wat leidt tot een snellere doorlooptijd en een kleinere foutgevoeligheid van de MPX diagnostiek.

Conclusie

De opkookmethode als alternatief voor MP24 extractie/ lysisbuis is een zeer geschikte methode voor monkeypox diagnostiek.