

Documentinformatie

Documentnummer:	MM/VAL/432
Versie:	01
Auteur:	Mevr. 5.1.2e
Gewijzigd door:	
Beoordelaar:	Mevr. 5.1.2e
Autorisator:	5.1.2e

Samenvatting

De SARS-CoV2 PCR, die het Egen en het Ngen detecteert is vergeleken tussen de TECAN Fluent en de TECAN EVO 150. De Tecan Fluent kan op basis van de resultaten worden ingevoerd voor de coronavirus diagnostiek van de GGD afnamestraten.

Algemene projectinformatie

Algemene projectinformatie

Projectnummer:	2020-11
Verantwoordelijke stafid:	5.1.2e
Tijdspad:	Q3 2020- Q1 2021
Verificatie of validatie	Validatie

Projectteam

Naam	Functie
5.1.2e	5.1.2e

Inleiding

De coronavirus pandemie heeft ertoe geleid dat er sinds enkele maanden in zgn GGD afnamestraten bij zeer veel mensen per dag een keel/ nasofarynx swab wordt afgenomen waarop vervolgens in het laboratorium een SARS-CoV-2 PCR wordt uitgevoerd. Om dit te optimaliseren is er in een samenwerking tussen het Hubrecht instituut, Genmab, Bodegro, PAMM en Sanquin een TECAN Fluent samengesteld die in optimale omstandigheden volgens de simulaties meer dan 11.000 SARS-CoV-2 PCRs kan uitvoeren in iets meer dan 12 uur. Als de TECAN Fluent 24 uur per dag zou draaien zouden met het initieel opgestelde protocol zelfs 20.000 PCRs weggedraaid kunnen worden. Doordat de pipetteerrobot onder andere beschikt over een 384 pipetteerkop is de PCR setup vele malen sneller dan de TECAN EVO die PAMM momenteel gebruikt.

De keel/ nasofarynx swabs die in de TECAN Fluent getest worden zullen, om het proces te optimaliseren en de turn around time te verkorten, in de GGD-straat al in een lysisbuffer (Inactive Blue, IAB, waarin al een interne controle, PDV RNA, aanwezig is) gedaan worden. Onder op de afnamebuisjes staat een 2D barcode die via een scanner bij de afname van de swab gekoppeld wordt aan de CORON IT aanvraag van het onderzoek. Bij aankomst op het laboratorium kunnen de rekjes met 93 patiëntensamples (+3 controles) direct in de TECAN Fluent geladen worden. In de TECAN Fluent vindt de extractie en de PCR setup plaats, waarna de gesealde plaat in de QuantStudio 7 geplaatst wordt voor de amplificatie en detectie.

Kritische parameters en testplan

Kritische parameter	Testplan	Acceptatiecriteria
Sensitiviteit	Er wordt een verdunningsreeks getest in de huidige routine en op de Tecan Fluent	Sensitiviteit moet op basis van de geteste verdunningsreeks overeenkomen met de huidige diagnostiek.
Checkerboard analyse	Uitsluiten of verhelpen van kruiscontaminatie	De analyse moet tenminste 5x achtereenvolgens geen kruiscontaminatie vertonen
Analytische sensitiviteit/limit of detection mvb RIVM panel	Het RIVM SARS-CoV-2 sens panel (7 samples) wordt getest conform het RIVM protocol. Hiermee wordt de Limit of Detection (LOD) bepaald	Alle core samples moeten 100% overeenkomen met de uitslag van het RIVM
Analystische specificiteit	RIVM EQA panel (10 samples) wordt getest conform het RIVM protocol	Alle samples moeten 100% overeenkomen met de uitslag van het RIVM
	Bij de checkerboard analyse wordt lysisbuffer (InActive Blue) alleen als negatieve controle gebruikt	De negatieve controle moet 100% negatief worden getest.
Retrospectieve validatie	372 positieve en negatieve patiënten samples getest met de Tecan EVO 150 met verschillende cq-waardes worden getest in de Tecan Fluent.	Positieve samples met Cq <20 in de Tecan EVO 150 moeten 100% gedetecteerd worden in de Tecan Fluent.

		<p>Positieve samples met een Cq 20-30 in de Tecan Evo 150 moeten $\geq 95\%$ gedetecteerd worden in de Tecan Fluent.</p>
		<p>Positieve samples met een Cq 30-35 in de Tecan Evo 150 moeten $\geq 80\%$ gedetecteerd worden in de Tecan Fluent.</p>
		<p>Positieve samples met een Cq > 35 in de Tecan Evo 150 moeten $\geq 50\%$ gedetecteerd worden in de Tecan Fluent.</p>
		<p>$\geq 95\%$ van de negatieve samples uit de Tecan Evo 150 moeten ook in de Tecan Fluent negatief zijn.</p>
<p>Prospectieve validatie</p>	<p>Er wordt een vooraf afgesproken periode in een GGD teststraat afgenomen in de monsterbuisen geschikt voor de Tecan Fluent. Deze worden zowel in de huidige routine getest als op de Tecan Fluent. Het minimaal aantal positieve samples is 100.</p>	<p>Positieve samples met een $Cq < 20$ in de Tecan Evo 150 moeten 100% gedetecteerd worden in de Tecan Fluent.</p>
		<p>Positieve samples met een Cq 20-30 in de Tecan Evo 150 moeten $\geq 95\%$ gedetecteerd worden in de Tecan Fluent.</p>
		<p>Positieve samples met een Cq 30-35 in de Tecan Evo 150 moeten $\geq 80\%$ gedetecteerd worden in de Tecan Fluent.</p>
		<p>Positieve samples met een Cq > 35 in de Tecan Evo 150 moeten $\geq 50\%$ gedetecteerd worden in de Tecan Fluent.</p>
		<p>$\geq 98\%$ van de negatieve samples uit de Tecan Evo 150 moeten ook in de Tecan Fluent negatief zijn.</p>

Uitvoering testplan

Voor de SARS-CoV-2 diagnostiek wordt de RNA isolatie en de PCR set-up volledig uitgevoerd door de Tecan Fluent. Nadat 40 µl van de isopropanol oplossing met magnetische beads (20 x verdund in isopropanol) en 60 µl sample in een 384 DWP gepipetteerd zijn vindt de RNA isolatie plaats door middel van vier wasstappen met 70% ethanol. Voor de elutie wordt 25 µl verwarmd water gebruikt. Van de elutie oplossing wordt 7,5 µl gepipetteerd bij 7,5 µl mastermix gemengd met de primers en probes die door de multidrop van de Tecan Fluent in de 384 PCR plaat is uitgevuld. De real-time qPCR wordt vervolgens ingezet met een Quantstudio7 in een 384-wells plaat.

Sensitiviteit

Er is van een positief sample (cq 10) een aantal verdunningsreeks gemaakt. Hiervoor is de swab in IAB uitgeswabt. Daarvan zijn 2 reeksen gemaakt, één in 400 µl IAB voor de Tecan Fluent en één in 250 µl IAB waaraan 250 µl Siemens lysisbuffer werd toegevoegd voor de Tecan EVO 150. Beide verdunningsreeksen werden tot 10⁻⁶ gedetecteerd.

In de routinediagnostiek wordt 250 µl UTM uit een 3 ml afnamebuis samen met 250 µl Siemens lysisbuffer getest op de Tevan Evo 150, om dit na te bootsen is er ook 250 µl van een verdunningsreeks gemaakt met UTM met 250 µl Siemens lysisbuffer op de Tecan Evo 150 getest. Deze verdunningsreeks werd tot 10⁻⁵ gedetecteerd. Dit is waarschijnlijk te verklaren doordat door de swab van een sample met een Cq 11 uit te swabben in 250 µl IAB je een nog sterkere concentratie krijgt.

Checkerboard analyse

Rekjes worden zo in de Tecan Fluent geplaatst dat er een schaakbord in de 384-wellsplaat ontstaat met IAB met alleen PDV en IAB met PDV en een positief coronasample gehaald uit een pool gemaakt van positieve samples; de Cq hiervan van het Egen en het Ngen lag onder de 20. De negatieve samples mogen alleen voor PDV positief gevonden worden. De run moet 5x achtereenvolgens geen enkele contaminatie tonen.

Analytische sensitiviteit mbv RIVM panel

Het RIVM geeft panels uit welke verschillende soorten respiratoire virussen zitten waaronder ook enkele non-SARS Corona virussen. Dit panel wordt 1:1 verdund met IAB om de verstoring door het bewaarmedium tot een minimum te beperken.

Analytische specificiteit

Het panel van het RIVM bevat SARS-CoV-2 samples met verschillende concentraties. Hiermee wordt de limit of detection bepaald. Op basis hiervan kan worden bepaald hoeveel copiën/ μ l er gedetecteerd wordt.

Er bleek dat er bij het SENS panel storing kwam van het materiaal waarin de verdunning was gemaakt. Daarom is er besloten om in IAB zelf een verdunningsreeks te maken van de RIVM runcontrole. Dezelfde concentraties werden aangehouden als bij het originele panel.

Retrospectieve evaluatie

De aantallen samples voor de retrospectieve validatie zijn iets lager dan beschreven in het testplan omwille van de hoeveelheid beschikbare samples en de hoeveelheid werk die het kostte deze samples te verwerken.

Van 305 positieve samples (met cq verdeling: <20: 79 samples, 20-30: 85 samples, 30-35: 90 samples en >35: 51 samples) is de nasopharynx swab uit het originele medium gehaald en in 400 μ l IAB uitgeswabt.

Voor de negatieve samples zijn 372 negatieve samples gesplitst. Hierbij is 200 μ l origineel UTM medium in 200 μ l IAB gedaan.

Prospectieve evaluatie

Een week lang wordt er bij de GGD teststraat Eersel afgenomen in Micronic buisjes met 400 μ l IAB. Deze monsters worden voor de routine 1:1 gesplitst in Siemens lysisbuffer. Hiervoor wordt handmatig 250 μ l sample samengevoegd met 250 μ l Siemens lysisbuffer.

Het restant wordt getest in de Tecan Fluent, waar 60 μ l sample getest wordt. In totaal zijn er 138 positieve samples getest in de Tecan EVO 150. Hiervan konden er 125 worden gedetecteerd in de Tecan Fluent.

Resultaten testplan

Kritische parameter	Testplan	Acceptatiecriteria	Resultaat
Sensitiviteit	Er wordt een verdunningsreeks getest in de huidige routine en op de Tecan Fluent	Sensitiviteit moet op basis van de geteste verdunningsreeks overeenkomen met de huidige diagnostiek.	Beide verdunningsreeksen werden tot 10 ⁻⁶ gedetecteerd
Checkerboard analyse	Uitsluiten of verhelpen van kruiscontaminatie	De analyse moet tenminste 5x achtereenvolgens geen kruiscontaminatie vertonen	Kruiscontaminatie is verholpen en 5 checkerboard analyses achter

			elkaar toonden geen kruiscontaminatie
Analytische sensitiviteit/limit of detection mvb RIVM panel	Het RIVM SARS-CoV-2 sens panel (7 samples) wordt getest conform het RIVM protocol. Hiermee wordt de Limit of Detection (LOD) bepaald	Alle core samples moeten 100% overeenkomen met de uitslag van het RIVM	De verdunningsreeks van de RIVM runcontrole werd ingezet; alle verdunningen overeenkomend met de core samples werden gedetecteerd
Analytische specificiteit	RIVM EQA panel (10 samples) wordt getest conform het RIVM protocol	Alle samples moeten 100% overeenkomen met de uitslag van het RIVM	De samples kwamen 100% overeen
	Bij de checkerboard analyse wordt lysisbuffer (InActive Blue) alleen als negatieve controle gebruikt	De negatieve controle moet 100% negatief worden getest.	De negatieve controle werd 100% negatief getest
Retrospectieve validatie	372 positieve en negatieve patiënten samples getest met de Tecan EVO 150 met verschillende cq-waardes worden getest in de Tecan Fluent.	Positieve samples met $Cq < 20$ in de Tecan EVO 150 moeten 100% gedetecteerd worden in de Tecan Fluent.	N=79, werden 100% gedetecteerd
		Positieve samples met een Cq 20-30 in de Tecan Evo 150 moeten $\geq 95\%$ gedetecteerd worden in de Tecan Fluent.	N=85, werden 100% gedetecteerd
		Positieve samples met een Cq 30-35 in de Tecan Evo 150 moeten $\geq 80\%$ gedetecteerd worden in de Tecan Fluent.	N=90, werden 88% gedetecteerd

		Positieve samples met een $Cq > 35$ in de Tecan Evo 150 moeten $\geq 50\%$ gedetecteerd worden in de Tecan Fluent.	N= 51, werden 57% gedetecteerd
		$\geq 95\%$ van de negatieve samples uit de Tecan Fluent moeten ook in de Tecan EVO 150 negatief zijn.	N=372, werden 100% negatief getest
Prospectieve validatie	Er werd 4 dagen in een GGD teststraat afgenomen in de monsterbuizen voor de Tecan Fluent. Deze werden zowel in de Tecan Evo getest als op de Tecan Fluent. Het minimaal aantal positieve samples is 100.	Positieve samples met een $Cq < 20$ in de Tecan Evo 150 moeten 100% gedetecteerd worden in de Tecan Fluent.	N=19, werden 100% gedetecteerd
		Positieve samples met een $Cq 20-30$ in de Tecan Evo 150 moeten $\geq 95\%$ gedetecteerd worden in de Tecan Fluent.	N=91, werden 100% gedetecteerd
		Positieve samples met een $Cq 30-35$ in de Tecan Evo 150 moeten $\geq 80\%$ gedetecteerd worden in de Tecan Fluent.	N=10, werden 100% gedetecteerd
		Positieve samples met een $Cq > 35$ in de Tecan Evo 150 moeten $\geq 50\%$ gedetecteerd worden in de Tecan Fluent.	N=18, werden 39% gedetecteerd
		$\geq 98\%$ van de negatieve samples uit de Tecan Fluent moeten ook in de Tecan EVO 150 negatief zijn.	N=990, waren in 99% negatief, 1% had een afwijkende negatieve uitslag

Conclusie

De Tecan Fluent kan worden geïmplementeerd voor de coronavirus PCR diagnostiek voor samples afgenomen in GGD teststraten ondanks dat de validatie niet volledig voldoet aan de eisen van het testplan omdat de afwijkingen goed verklaarbaar zijn. Het RIVM sens panel kon niet worden ingezet zonder verdunning, maar de in lysisbuffer gemaakte verdunning die hetzelfde aantal kopieën per ml als het zwakste core sample (338 cps/ml) bevat werd bij herhaling goed gedetecteerd door de Tecan Fluent. Daarnaast werden de zwakke samples, met $cq > 35$ bij de prospectieve validatie niet 50% gedetecteerd maar 39%. Van deze samples werd echter 250/400 μ l van het sample getest op de Tecan Evo, waarbij 62,5% van het materiaal waarin de swab is uitgeswabt als input werd gebruikt, terwijl in de huidige routine 250 μ l uit een 3000 μ l afnamebuis (8%) getest wordt. De hypothese dat hierdoor meer zwakke samples worden opgepikt door de Tecan Evo 150 dan in de routine wordt ondersteund doordat bij de retrospectieve validatie wel $>50\%$ van de zwakke samples werd gedetecteerd door de Tecan Fluent.