Validatieplan TECAN Fluent in het kader van STRIP (Systematisch Testen met Robotica en Innovatie bij Pandemieën) bij Stichting PAMM, Laboratorium voor Medische Microbiologie

Periode: 18 December 2020 – 14 Januari 2021

Samenvatting

Dit validatieplan beschrijft de validatie van de SARS-CoV-2 RT-qPCR (reverse transcriptase quantitative PCR) uitgevoerd op de TECAN Fluent. Op basis van de resultaten van de validatie zal worden besloten of deze PCR in de routine diagnostiek ingezet kan gaan worden voor de detectie van coronavirus in patiënten.

Projectteam

5.1.2e	5.1.2e
5.1.2e	Klinisch moleculair bioloog
5.1.2e	Arts-microbioloog
5.1.2e	Senioranalist MSV
5.1.2e	Senioranalist MSV

Inleiding

De coronavirus pandemie heeft ertoe geleid dat er nu 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 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) gedaan worden. Onder op de afnamebuisjes staat een 2D barcode die via een handscanner 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 94 patiëntensamples (+2 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.

Dit validatieplan beschrijft via welke stappen de TECAN Fluent gevalideerd wordt voordat deze in de routine diagnostiek in gebruik genomen kan worden.

Gouden Standaard

De SARS-CoV-2 RT-qPCR zoals opgezet door PAMM (ISO15189 Laboratorium Developed Test RT-qPCR), uitgevoerd op de TECAN EVO wordt voor deze validatie als gouden standaard gebruikt.

Materialen en testmethode

Voor de afname wordt een keel/ nasofarynx swab rondgedraaid in het Micronic 0,8 mL afnamebuisje waarin reeds 400 mL lysisbuffer (Inactive Blue, Fertipro) met de interne controle PDV (Phocine distemper virus) aanwezig is.

Aan elk rek met 94 patiëntenmaterialen worden bij aankomst op het laboratorium op positie A1 de positieve (groene dop) en op positie A2 de negatieve controle (rode dop) toegevoegd. Hoewel in principe per 384 extractieplaat maar 2 controles noodzakelijk zijn is er voor gekozen in elk rekje dat in de TECAN Fluent geladen wordt deze controles toe te voegen om het risico dat door een menselijke fout er een 384-plaat zonder controles ingezet wordt te elimineren. Via Bodegro zal de CORON IT barcode gekoppeld worden aan Molis, het Laboratorium Informatie Systeem waar PAMM mee werkt.

Voor de PCR amplificatie en detectie wordt de QuantStudio 7 gebruikt (Thermo Fisher Scientific).

Multiplex RT-qPCR

Targets:

E gen (Corman *et al* Euro Surveill. 2020;25(3))

N1 (CDC Atlanta, USA 2019-Novel Coronavirus (2019-nCoV) Real-time rRT-PCR Panel)

PDV (Interne Controle): Phocine distemper virus; nieuwe naam Phocine morbillivirus

Kritische parameters en testplan (21 tot 25 december 2020)

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 achter elkaar geen kruiscontaminatie tonen
Analytische sensitiviteit/ limit of detection mbv RIVM panel	Het RIVM SARS-CoV2 panel (7 samples) wordt getest conform het RIVM protocol	Alle core samples moeten 100% overeenkomen met de uitslag van het RIVM
Analytische specificiteit	RIVM LEQA panel (10 samples) wordt getest conform het RIVM protocol	Alle sample moeten 100% overeenkomen

1.Verdunningsreeks van de positieve (SARS-CoV-2) PCR controle :

Onverdund, 10^1, 10^2, 10^3, 10^4, 10^4, 10^6, 10^7, 10^8, 10^9

Deze verdunning reeks zal na het vrijgeven van de TECAN Fluent door de firma 10x worden ingezet om de instellingen van het systeem te optimaliseren.

2.Checkerboard analyse: uitsluiten van kruis contaminatie.

Uitvullen van 96 sterk positieve (SARS-CoV-2) positieve controles (Cq waarde <25) in een 384-wells plaat waarin de positieve samples zijn omringd door negatieve samples. Deze analyse wordt 5x ingezet.

Mocht er kruiscontaminatie optreden dan wordt het systeem aangepast om dit op te lossen.

Klinische evaluatie, retrospectief (25 – 29 december 2020)

Voor de retrospectieve klinische evaluatie worden patiëntensamples (positieve met 3 vooraf gedefinieerde groepen Cq waardes en evenveel negatieve) verzameld en overgebracht in de 0,8 mL Micronic buisjes die in de TECAN Fluent kunnen worden getest. Voor elke groep (Cq-waarde ≤20; Cq waarde 20-30; Cq-waarde >30) worden 93 samples afgenomen en ingevroren vanaf 4-03-2020 tot juli 2020 teruggezocht. Ook worden uit deze periode 372 negatieve samples teruggezocht en getest. Cq-waardes >37 worden geëxcludeerd. De patiëntensamples die in de routine uit UTM 1:1 worden verdund voor de TECAN Evo worden nu uit de UTM 1:1 verdund met de Inactive blue lysisbuffer voor de TECAN Fluent. Bij samples met een hoge Cq waarde kan het zijn dat er een discrepantie is doordat de limit of detection benaderd wordt. Om deze reden wordt een detectie van ≥80% als acceptabel gedefinieerd bij Cq waardes van >30.

Positieve samples	372 patiëntensamples getest met de TECAN EVO met verschillende Cq waardes worden getest in de TECAN Fluent	+ samples met Cq≤20 in de routine moeten ≥98% gedetecteerd worden in de TECAN Fluent
		+ samples met Cq 20-30 in de routine moeten ≥90% gedetecteerd worden in de TECAN Fluent
		+ samples met Cq >30 in de routine moeten ≥80% gedetecteerd worden in de TECAN Fluent
QC testpanel (- samples)	372 patiëntensamples negatief getest met de TECAN EVO worden getest in de TECAN	≥98% negatieven moeten ook negatief getest worden in de Fluent

	Fluent	

Klinische evaluatie (n=1116), prospectief (30 december 2020 – 4 januari 2021)

Voor de prospectieve klinische evaluatie van de TECAN Fluent zullen bij 1 GGD afnamestraat keel/ nasofarynx uitstrijken worden afgenomen en direct in het afnamebuisje voor de TECAN Fluent worden uitgeswabt. Aangezien de lysisbuffer het coronavirus inactiveert kan de swab hierna zonder extra maatregelen worden weggegooid in de GGD straat. Bij aankomst op het laboratorium wordt eerst getest op de TECAN Fluent. Vervolgens wordt er 200 uL van de TECAN Fluent Inactive Blue lysisbuffer en 200 uL vloeistof uit het afnamebuisje overgepipetteerd in de 10 mL Vacuette en getest op de TECAN Evo. Doordat de samples die zo getest worden op de TECAN Evo 1:1 verdund worden (zoals nu gebruikelijk bij de TECAN Evo in de routine) is het de verwachting dat de TECAN Fluent ten minste even gevoelig is als de TECAN Evo.

Klinische samples (+)	De patiëntensamples worden parallel getest met de TECAN EVO en de TECAN Fluent	+ samples met Cq<20 in de EVO moeten ≥98% gedetecteerd worden in de TECAN Fluent
		+ samples met Cq 20-30 in de EVO moeten ≥90% gedetecteerd worden in de TECAN Fluent
		+ samples met Cq >30 in de EVO moeten ≥80% gedetecteerd worden in de TECAN Fluent
Klinische samples (-)	De patiëntensamples negatief getest met de TECAN EVO en de TECAN Fluent worden vergeleken	≥98% negatieve samples in TECAN Fluent moeten ook in TECAN Evo negatief zijn

Opschaling, alle GGD straten van de GGD Brabant – Zuidoost (5 januari – 14 januari 2021)

Indien de validatie aantoont dat de TECAN Fluent voldoet aan de vooraf bepaalde validatiecriteria kan de pipetteerrobot worden ingezet in de routine GGD diagnostiek voor het middels PCR detecteren van het coronavirus in keel/ nasofarynx uitstrijken afgenomen in GGD afnamestraten. Hiervoor dient iedereen werkzaam bij de GGD afnamestraten geïnformeerd te zijn over de gewijzigde afnamemethode middels een instructievideo. Daarnaast dient het vervoer van de samples naar het laboratorium afgestemd te worden op de laboratorium capaciteit om de tijd tussen afname en resultaat zo kort mogelijk te houden.

Back up

Tijdens de opschalingsfase zal Sanquin als back up voor de TECAN Fluent beschikbaar zijn. Hiervoor zal Sanquin de PAMM voorzien van een van tevoren afgesproken hoeveelheid afnamebuisjes die de PAMM op voorraad houdt voor mocht de TECAN Fluent uitvallen en de periode van uitval ingeschat worden op langer dan 6 uur. In dat geval dient direct contact opgenomen te worden met Sanquin en de GGD om afspraken te maken over de inzet van Sanquin. De GGD afnamestraten dienen dan zsm over te gaan op de afnamebuizen van Sanquin. De buisjes die al voor de TECAN Fluent zijn afgenomen maar nog niet zijn ingezet zullen zodra de Fluent weer operationeel is alsnog worden ingezet. Mocht de uitval te lang duren is het mogelijk na het overbrengen van het materiaal uit de Fluent buisjes in grotere buisjes deze samples op de 3 TECAN EVOs van PAMM te testen.