

Moleculaire diagnostiek intestinale parasieten

Theo Schuurs, moleculair bioloog

Lid namens WMDI / NVMM

Izore, Centrum Infectieziekten Friesland, Leeuwarden



Rondzendingen SKML-parasitologie

- 4x per jaar rondzending t.b.v. detectie darm en bloedparasieten
- 2 feces- en 2 bloedmonsters (gefixeerd materiaal)
- 92 deelnemende laboratoria (2011)
 - > 79 beide panels
 - > 9 alleen bloed- , 4 alleen feces-panel
- materiaal niet geschikt voor moleculaire diagnostiek (Mdx)
- 2011-2012: pilotfase fecesmonsters (E en F) voor Mdx

Aanbieders kwaliteitsrondzendingen (tot voor kort)

	parasieten	gefixeerd
- UK NEQAS	ja	ja
- QCMD	nee	-
- Instand	nee	-
- SKML-para	ja	ja

2013.1: Introductie fecespanel geschikt voor Mdx

Doel: testen kwaliteit moleculaire diagnostiek darmparasieten

Voorwaarden:

- pathogeen in feces
 - > geen gevriesdroogd materiaal
 - > geen DNA
 - > niet gefixeerd
- kwalitatief hoogwaardig: reproduceerbaar, homogene en stabiele feces-monsters
- uitdagende loads
- resultaten deelnemers koppelen aan gebruikte methoden



Polymerase Chain Reaction (PCR)

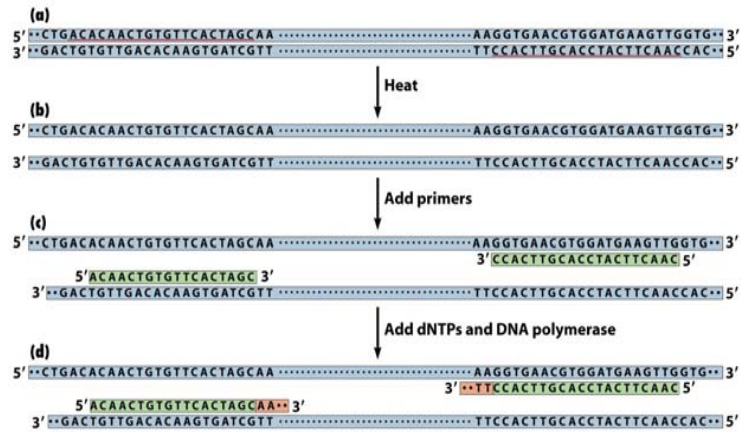


Figure 4-13
Genes and Genomics: A Short Course (3e)
© 2007 W.H. Freeman and Company

PCR

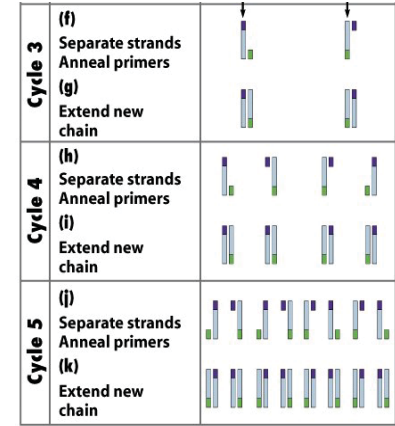
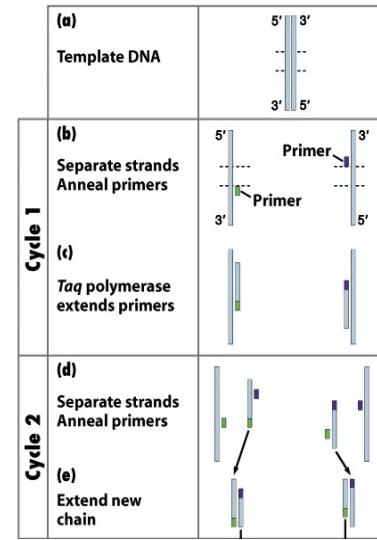
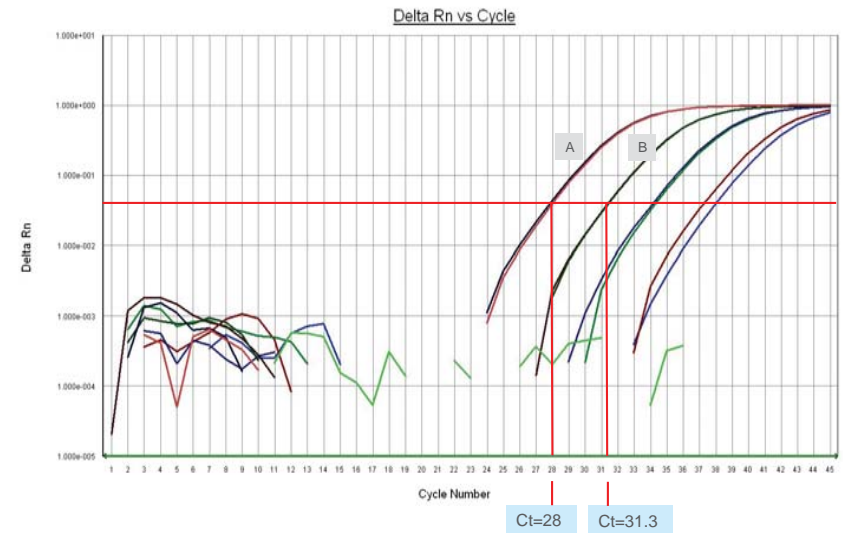
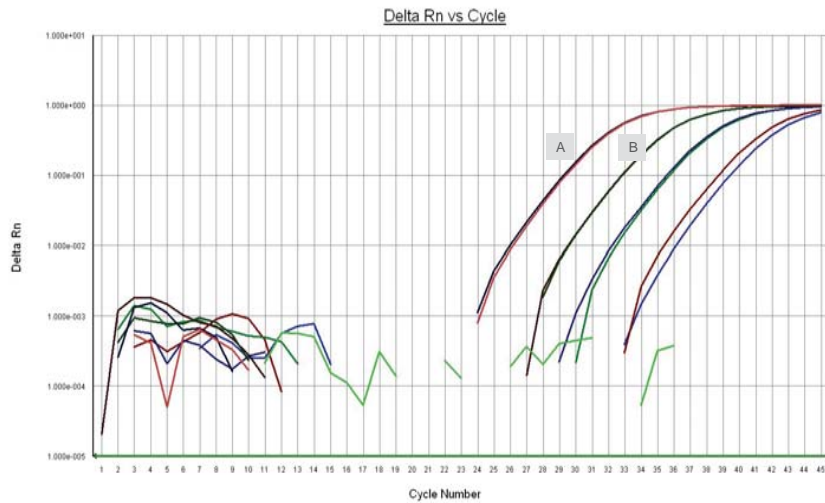


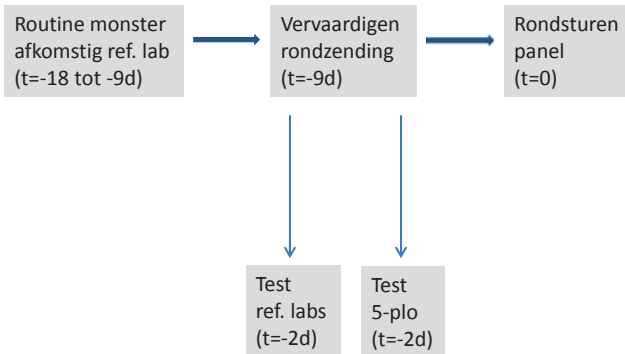
Figure 4-15
Genes and Genomics: A Short Course (3e)
© 2007 W.H. Freeman and Company



Lage Ct = veel target aanwezig = "hoge load"

Hoge Ct = weinig target aanwezig = "lage load"

Workflow monsters moleculair panel (SKML-parasitologie)



Kwaliteitscontrole: Documentatie

Nummer	Rondzending feces PCR SKML 3e en 4e rondzending 2012			
	FMB-17	FMB-20	FMB-23	FMB-24
Materiaal	feces	feces	feces	feces
Hoeveelheid				
Aangeleverd door	Izore	Izore	HZH/Erasmus	Haarlem
Klinische gegevens				
Datum bereiding	16-7-2012	26-7-2012	24-10-2012	24-10-2012
Vries dooi cyclus	Nee	Nee		
Verzonden naar ref. lab	17-7-2012	31-7-2012	24-10-2012	24-10-2012
PIN				
Datum 1e bevinding	10-7-2012			
Uitslag Microscopie			CR	EH
Uitslag PCR	GL	CR	CR	EH
CT-waarde	19,1	31,7	onb	onb
Uitgevoerd door:	HZH/EMC	HZH/EMC	HZH/EMC	HZH/EMC
Datum 5-plo	25-jul			
Uitslag 5-plo	27,6	33,6	34,6	36,7
	27,7	34,0	34,0	37,3
	27,9	34,5	35,6	37,1
	27,4	34,1	34,4	36,9
	28,2	34,6	34,1	36,4
Gem.	27,8	34,2	34,5	36,9
SD.	0,30	0,40	0,64	0,39
Uitslag PCR	GL			
Uitslag ref. lab	GL	CR	CR	EH
Gem.	24,9	31,8	28,6	33,2
SD.	2,48	2,4	5,01	3,07
CT-waarde max.	27,8	34,2	34,5	37,0
CT-waarde min.	21,1	28,5	20,2	28,4
Geschied voor rondzending	ja	ja	ja	ja
Opmerking				
Nummer rondzending	2012.3F	2012.3E	2012.4.E	2012.4.F
Datum rondzending	13-11-2012	13-11-2012	13-11-2012	13-11-2012
Casus			2012.4	2012.4
Verderingen	2012.4	2012.4	2012.4	2012.4
Aantal detecties	39	39	32	34
Aantal inzendingen op target	34	33	32	34
%	88%	87%	80%	89%
Aantal correct	39	29	32	33
%	98,2%	87,9%	100%	97,1%
CT-waarde gem	27,7	32,3	29,3	34,5
SD.	3,2	2,8	2,9	2,9
CT-waarde max.	37	40	38	41
CT-waarde min.	21	27	25	31
Overige bevindingen: al dan niet in combinatie	CR	GL		neg



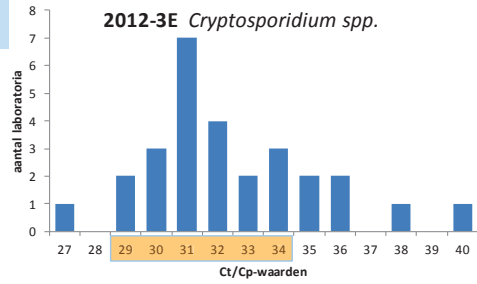
Kwaliteitscontrole: Documentatie

Nummer	Rondzending feces PCR SKML 3e en 4e rondzending 2012			
	FMB-17	FMB-20	FMB-23	FMB-24
Materiaal	feces	feces	feces	feces
Hoeveelheid				
Aangeleverd door	Izore	Izore	HZH/Erasmus	Haarlem
Klinische gegevens				
Datum bereiding	16-7-2012	26-7-2012	24-10-2012	24-10-2012
Vries dooi cyclus	Nee	Nee		
Verzonden naar ref. lab	17-7-2012	31-7-2012	24-10-2012	24-10-2012
PIN				
Datum 1e bevinding	10-7-2012			
Uitslag Microscopie			CR	EH
Uitslag PCR	GL	CR	CR	EH
CT-waarde	19,1	31,7	onb	onb
Uitgevoerd door:	HZH/EMC	HZH/EMC	HZH/EMC	HZH/EMC
Datum 5-plo	25-jul			
Uitslag 5-plo	27,6	33,6	34,6	36,7
	27,7	34,0	34,0	37,3
	27,9	34,5	35,6	37,1
	27,4	34,1	34,4	36,9
	28,2	34,6	34,1	36,4
Gem.	27,8	34,2	34,5	36,9
SD.	0,30	0,40	0,64	0,39
Uitslag PCR	GL			
Uitslag ref. lab	GL	CR	CR	EH
Gem.	24,9	31,8	28,6	33,2
SD.	2,48	2,4	5,01	3,07
CT-waarde max.	27,8	34,2	34,5	37,0
CT-waarde min.	21,1	28,5	20,2	28,4
Geschied voor rondzending	ja	ja	ja	ja
Opmerking				
Nummer rondzending	2012.3F	2012.3E	2012.4.E	2012.4.F

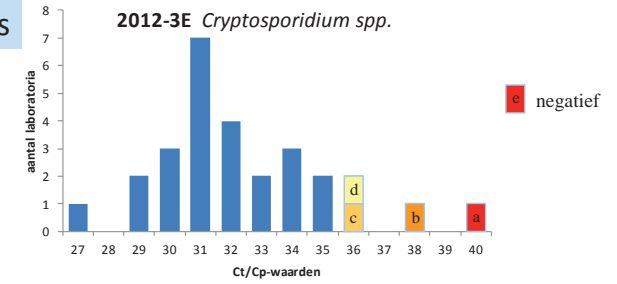
Overzicht 2012 (pilot jaar)

parasiet	n (correct)	n (totaal)	Ct/Cp	opmerkingen
2012.1E <i>G. lamblia</i>	26	-	26	
2012.1F <i>E. histolytica</i>	13	-	37	
<i>G. lamblia</i>	8	-	38	
2012.2E negatief	22	-	-	<i>B. hominis</i> (n=9)
2012.2F <i>D. fragilis</i>	24	-	32	<i>B. hominis</i> (n=9) <i>S. stercoralis</i> (n=1)
2012.3E <i>Crypto. spp.</i>	29	33	32	neg (n=1); <i>Giardia</i> (n=3)
2012.3F <i>G. lamblia</i>	31	34	28	<i>Crypto. spp.</i> (n=3)
2012.4E <i>Crypto. spp.</i>	34	35	29	neg (n=1)
2012.4F <i>E. histolytica</i>	33	34	35	neg (n=1)

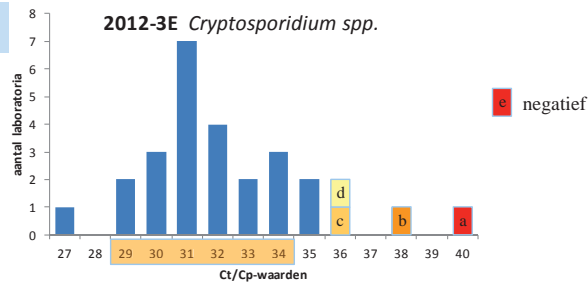
Ct/Cp-waarden deelnemers



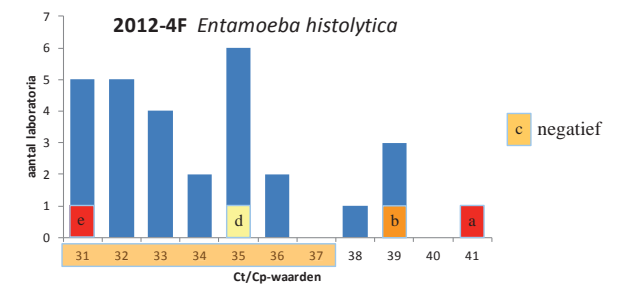
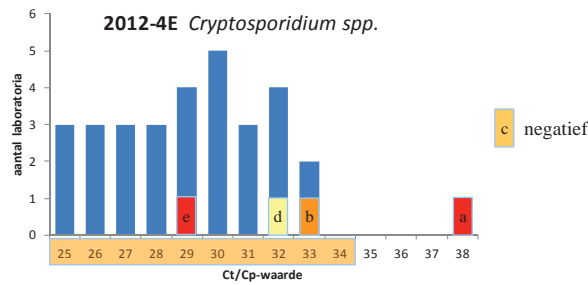
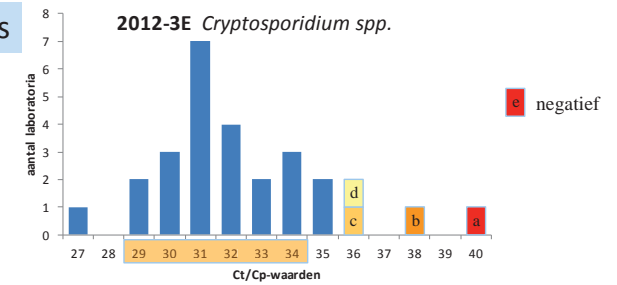
Ct/Cp-waarden deelnemers



Ct/Cp-waarden deelnemers



Ct/Cp-waarden deelnemers



Verdiepingsvragen: Gebruikte apparatuur/methoden

Gebruikte apparatuur:

- | | | |
|----------------------------|--------------------------------|------|
| 1. Biomerieux (easyMag) | + Applied Biosystem (ABI 7500) | (3x) |
| 2. Biomerieux (easyMag) | + Roche (Lightcycler) | |
| 3. Biomerieux (easyMag) | + Stratagene (MX3000) | |
| 4. Biomerieux (easyMag) | + Biorad (CFX) | (2x) |
| 5. Qiagen (QIA symphony) | + RoterGene | (3x) |
| 6. Qiagen (man. Stool kit) | + Cepheid (Smartcycler) | |
| 7. Roche (Magnapure) | + Roche (Lightcycler) | (6x) |
| 8. Roche (Magnapure) | + Applied Biosystem (ABI7500) | (2x) |
| 9. Roche (Magnapure) | + Qiagen (Rotorgene) | |

Verdiepingsvragen: Gebruikte apparatuur/methoden

Wat betreft de targets:

Giardia lamblia

- Small SubUnit ribosomaal RNA gen (volgens Verweij et al 2004 J. Clin.Microbiol 42, 1220-1223)
- Small SubUnit ribosomaal RNA gen (in house test)
- 18S ribosomaal RNA gen (in house test)
- Light Mix Kit Parasital Gastroenteritis, (TIB MOLBIOL)

Cryptosporidium spp.

- Small SubUnit ribosomaal RNA gen (volgens Fontaine & Guillot. 2002 FEMS Microbiol. Lett. 214:13-17).
- Small SubUnit ribosomaal RNA gen (in house test)
- *Cryptosporidium* -specifiek fragment van 18s RNA gen (volgens Verweij et al 2004 J. Clin.Microbiol 42, 1220-1223)
- DNAJ-like eiwit (volgens Bruijnesteijn et al. Clin Microbiol Infect 2009;15:869)
- *Cryptosporidium* oocyst wall gen (COWP) volgens Guy et al. 2003 Appl Env Microbiol 69:5178-85
- Light Mix Kit Parasital Gastroenteritis, (TIB MOLBIOL)

Verdiepingsvragen (2012-4): Gebruikte apparatuur/methoden

Wat betreft de targets:

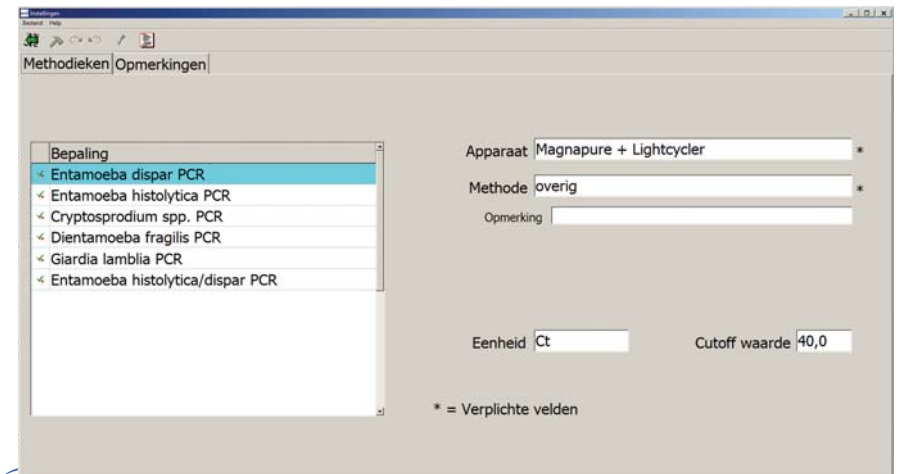
Dientamoeba fragilis

- internal transcribed spacer van 5,8S ribosomaal RNA gen (volgens Verweij et al. Mol Cell Probes 2007;21:400)
- Light Mix Kit Parasital Gastroenteritis, TIB, MOLBIOL
- Small SubUnit ribosomaal RNA gen (in house test)

Entamoeba histolytica

- Small SubUnit ribosomaal RNA gen (volgens Verweij, JJ et al 2004 J. Clin.Microbiol 42, 1220-1223)
- Small SubUnit ribosomaal RNA gen (volgens Verweij, et al 2004, J. Clin.Microbiol 42, 1220-1223, aangepast door Bergmans)
- Small SubUnit ribosomaal RNA gen (volgens Verweij, et al. 2003, Tropical Medicine and International Health 8:1153-1156)
- 18S rRNA gen (in house test)
- Small SubUnit ribosomaal RNA gen (in house test)
- Light Mix Kit Parasital Gastroenteritis, (TIB MOLBIOL)
- Galactose specific adhesin gen (in house test)

Qbase: Invoer uitslagen



Methodebibliotheek

Methodebibliotheek | Opmerkingen

Bepaling

- Entamoeba dispar PCR
- Entamoeba histolytica PCR
- Cryptosporidium spp. PCR
- Dientamoeba fragilis PCR
- Giardia lamblia PCR
- Entamoeba histolytica/dispar PCR

Apparaat: Magnapure + Lightcycler *

Methode: overig *

Opmerking:

Eenheid: Ct Cutoff waarde: 40,0

* = Verplichte velden

Qbase: Invoer uitslagen

(essentieel!)
 2) Resultaten NOOIT invoeren bij opmerkingen (punten worden alleen toegekend aan resultaten in antwoordvelden)
 3) U wordt verzocht op het instellingen scherm de cutoff waarde in te vullen. Op het resultaten scherm altijd de kwalitatieve uitslag invullen en bij een positief resultaat ook de kwantitatieve uitslag.

Resultaten

	Kwalit.	Kwant.	
Entamoeba dispar PCR	Negatief		Ct
Entamoeba histolytica PCR	Negatief		Ct
Cryptosporidium spp. PCR	Positief	36,5	Ct
Dientamoeba fragilis PCR	Negatief		Ct
Giardia lamblia PCR	Positief	32,3	Ct
Entamoeba histolytica/dispar PCR	Negatief		Ct

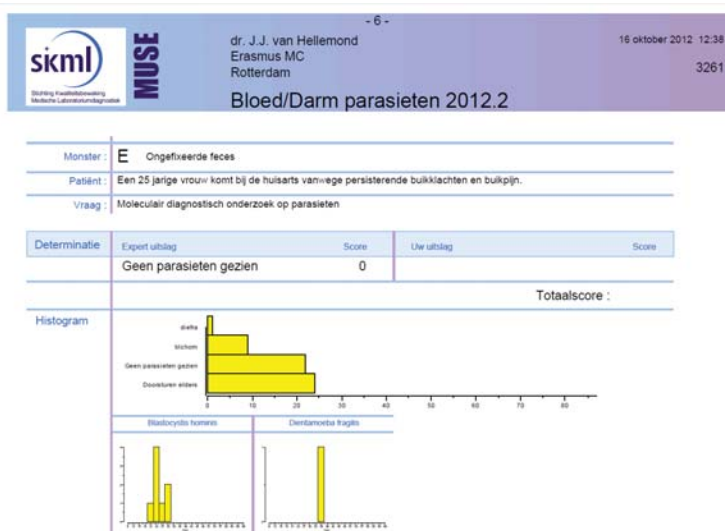
Resultaten Opmerkingen Opmerkingen rondzender

Samenvattend moleculaire rondzendingen SKML-parasitologie

Vanaf 2013.1 officieel gestart met moleculaire rondzending

- 2 klinische fecesmonsters, als aparte rondzending (4x/jaar)
- geïnvesteerd in monitoring/borging kwaliteit rondzending
- Q-base geoptimaliseerd (invoer alswel rapportage: MUSE)

Rapportage MUSE



Samenvattend moleculaire rondzendingen SKML-parasitologie

Vanaf 2013.1 officieel gestart met moleculaire rondzending

- 2 klinische fecesmonsters, als aparte rondzending (4x/jaar)
- geïnvesteerd in monitoring/borging kwaliteit rondzending
- Q-base geoptimaliseerd (invoer alswel rapportage: MUSE)

Nabije toekomst:

- koppelen resultaten aan methoden (rapportage)
- verdere optimalisatie stabiliteit fecesmonsters (studie)