

Moleculaire diagnostiek; darmprotozoa & *T.vaginalis*

-overzicht 2017

&

onderzoek naar variatie in gerapporteerde resultaten-

Theo Schuurs, MMM
Lid namens WMDI / NVMM

Rob Koelewijn
Jaap van Hellemond

2013: Introductie fecespanel geschikt voor Mdx

SKML-parasitologie

Karakteristieken rondzending:

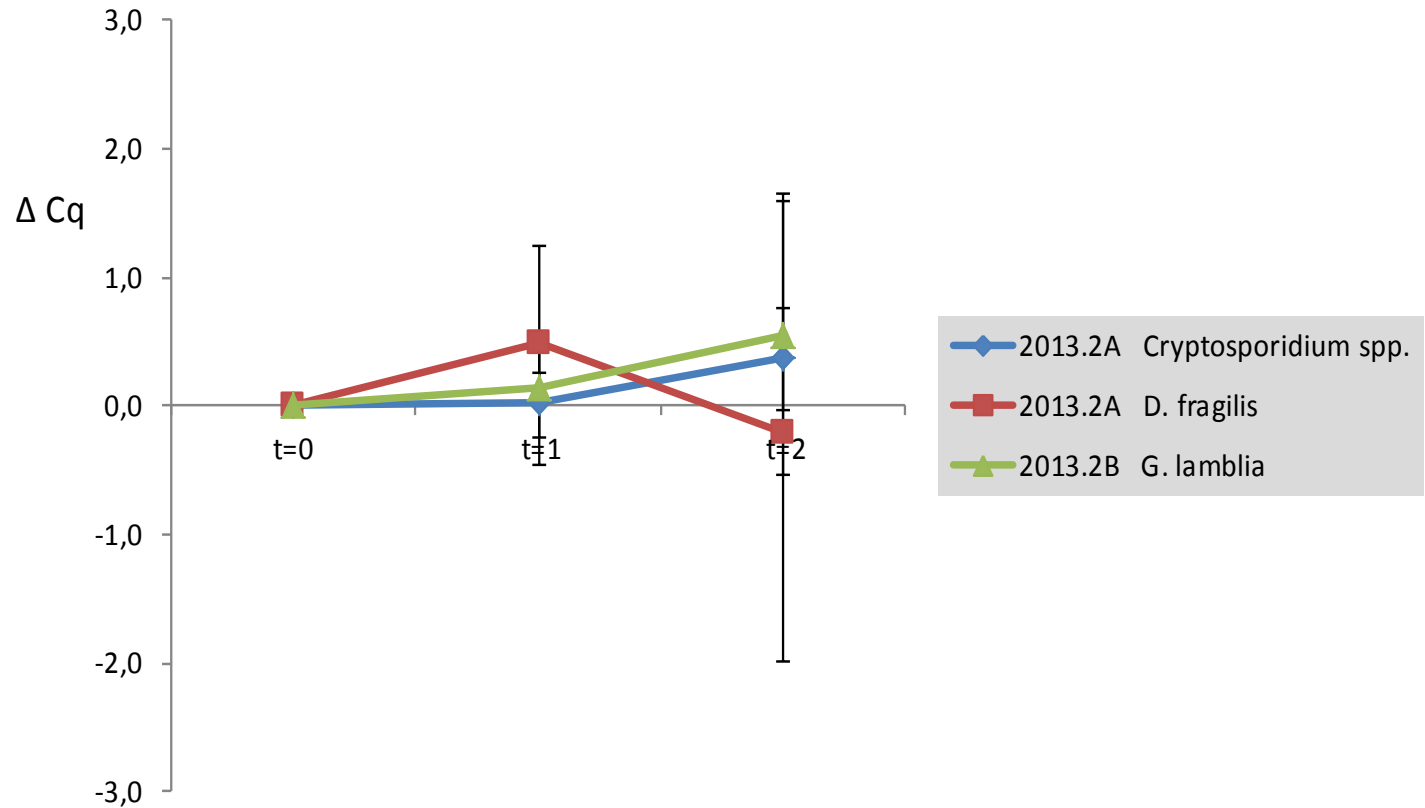
- pathogeen in feces (uniek!)
- hoge kwaliteit: reproduceerbare en stabiele feces-monsters



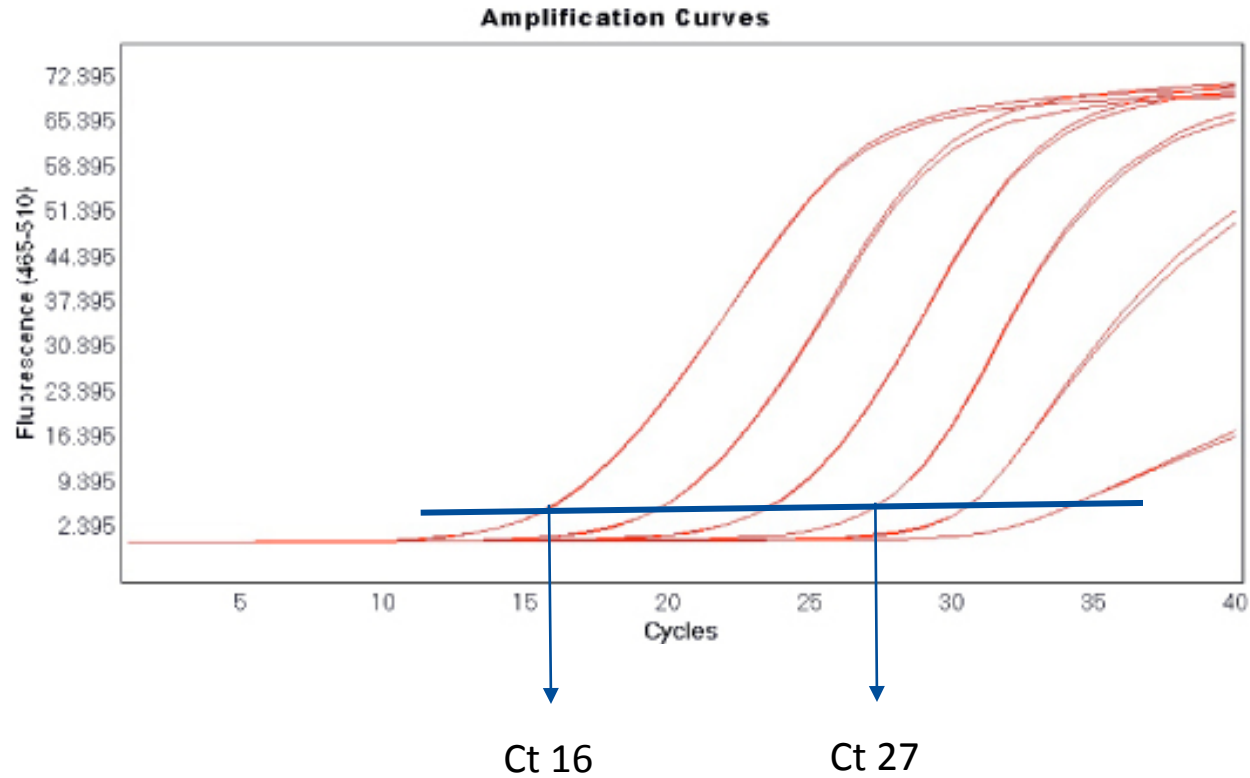
Stichting Kwaliteitsbewaking
Medische Laboratoriumdiagnostiek

Sectie Parasitologie

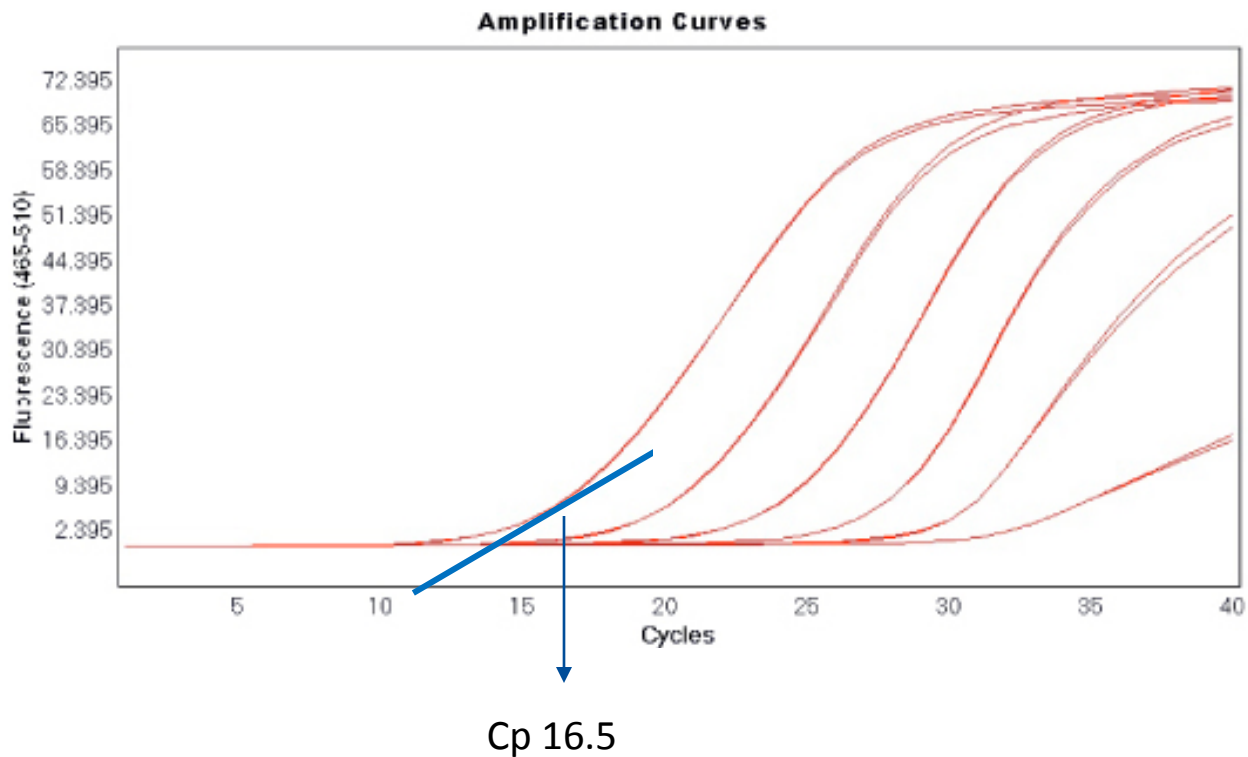
Stabiliteit monsters (na 14 dagen kamertemp.)



Ct, Cp en Cq waarden



Ct, Cp en Cq waarden



Cq waarde = verzamelnaam voor Cp en Ct

Overzicht 2017

	parasiet	correct n (%)	totaal n *	Cq	opmerkingen
2017.1A	<i>G. lamblia</i>	29 (97%)	30	27	
	<i>D. fragilis</i>	23 (100%)	23	30	
2017.1B	<i>G. lamblia</i>	30 (100%)	30	28	
	<i>D. fragilis</i>	23 (100%)	23	30	
2017.1C	<i>G. lamblia</i>	29 (97%)	30	32	
	<i>Crypto spp.</i>	30 (100%)	30	32	
	<i>E. histolytica</i>	20 (67%)	30	37	buiten mededinging
2017.2A	<i>E. histolytica</i>	23 (72%)	32	38	buiten mededinging
2017.2B	<i>G. lamblia</i>	31 (100%)	31	27	
2017.2C	<i>E. histolytica</i>	32 (100%)	32	32	(fp 1x: <i>E. dispar</i>)
2017.2D	DNA <i>E. histolytica</i>	31 (97%)	32	28	(fp 1x: <i>Crypto spp.</i>)
2017.3A	<i>G. lamblia</i>	29 (94%)	31	32	
	<i>D. fragilis</i>	25 (100%)	25	33	
2017.3B	<i>G. lamblia</i>	31 (100%)	31	27	
	<i>D. fragilis</i>	25 (100%)	25	34	
2017.3B	<i>Crypto spp.</i>	31 (100%)	31	29	

*32 deelnemende laboratoria
fp: fout-positief

Sensitiviteit 2013-2017

	<i>Giardia lamblia</i>		<i>Cryptosporidium spp</i>		<i>Entamoeba histolytica</i>		<i>Dientamoeba fragilis</i>	
		N		N		N		N
2013	98,8	85	92,0	38	77,0	26	n.d.	-
2014	96,4	84	100,0	54	83,0	52	98,0	48
2015	98,8	85	96,0	57	97,0	29	100,0	73
2016	97,5	119	100,0	30	85,2	61	98,75	80
2017	96,8	216	100,0	61	100,0	32	100,0	121
Average	97,7		97,6		88,4		99,2	

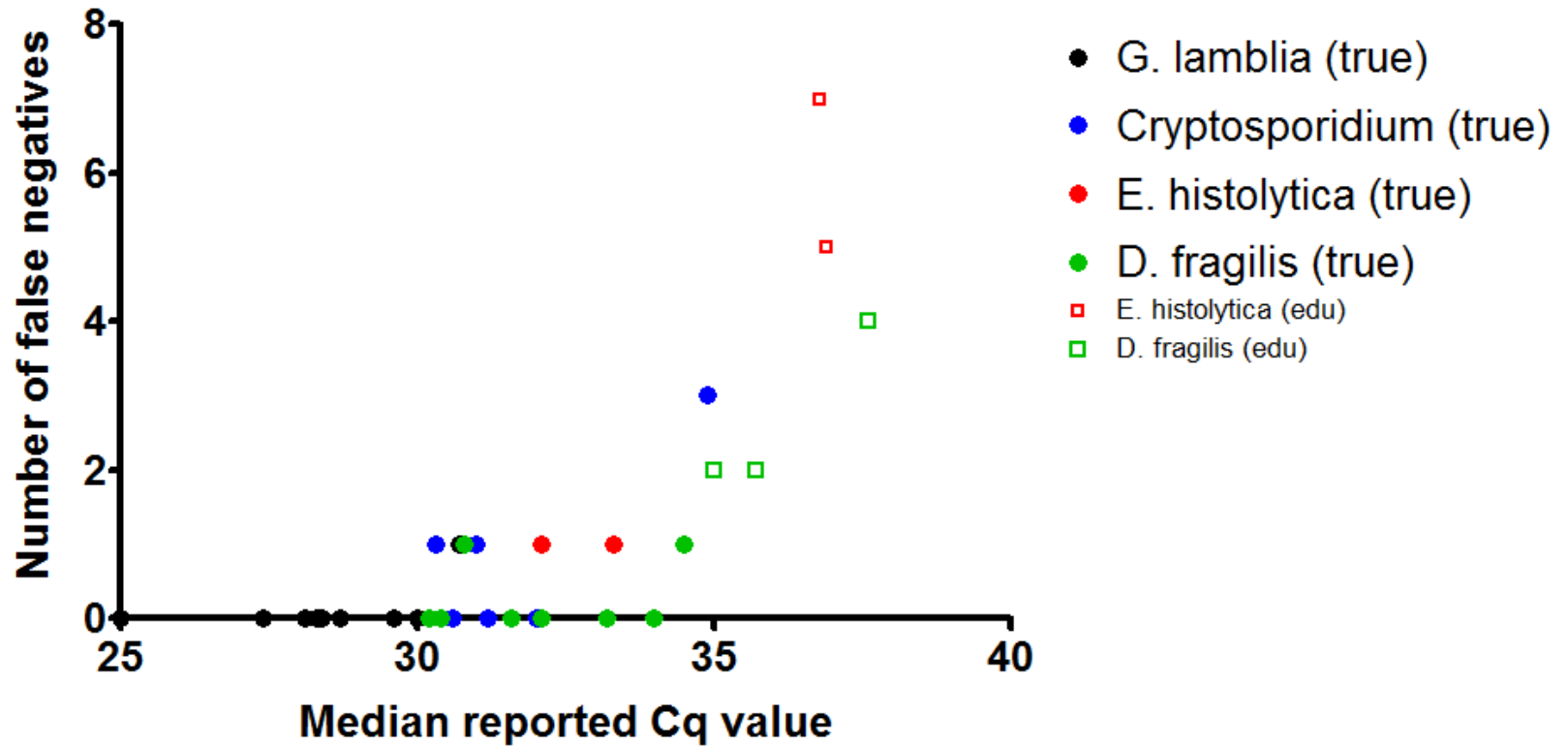
N = number of reported results (participants on samples)



Stichting Kwaliteitsbewaking
Medische Laboratoriumdiagnostiek

Sectie Parasitologie

Fout-negatieven 2013-2015



relatieve load

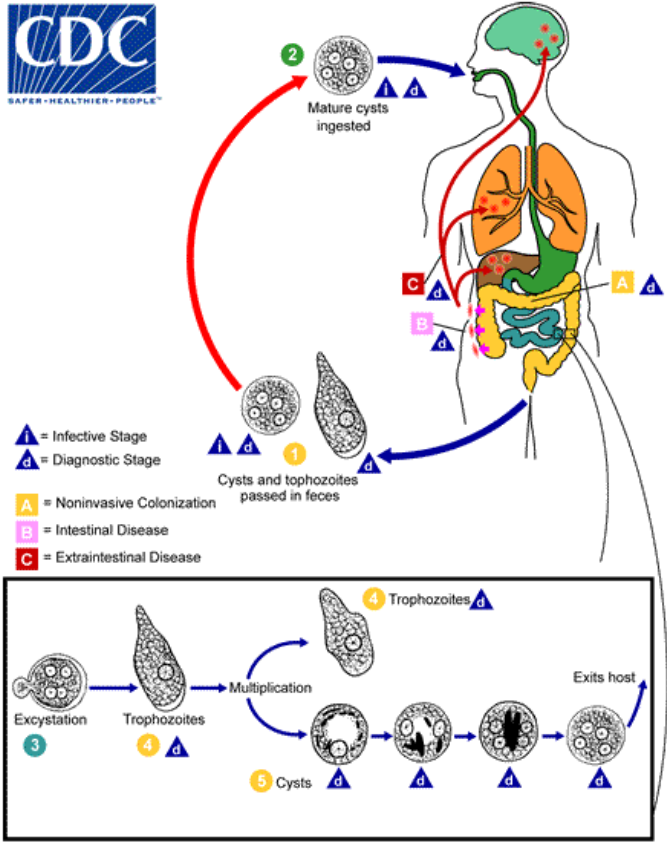
relatieve load diarreeverwekkers Izore (2012- 2016)

	<i>G.lamblia</i>	n	<i>Cryptosp. spp.</i>	n	<i>E.histolytica</i>	n	<i>D.fragilis</i>*	n
gemiddelde Cp waarde	27.8	929	31.5	401	31.0	17	26.7	80

* *D.fragilis*: alleen 2016

E. histolytica levenscyclus

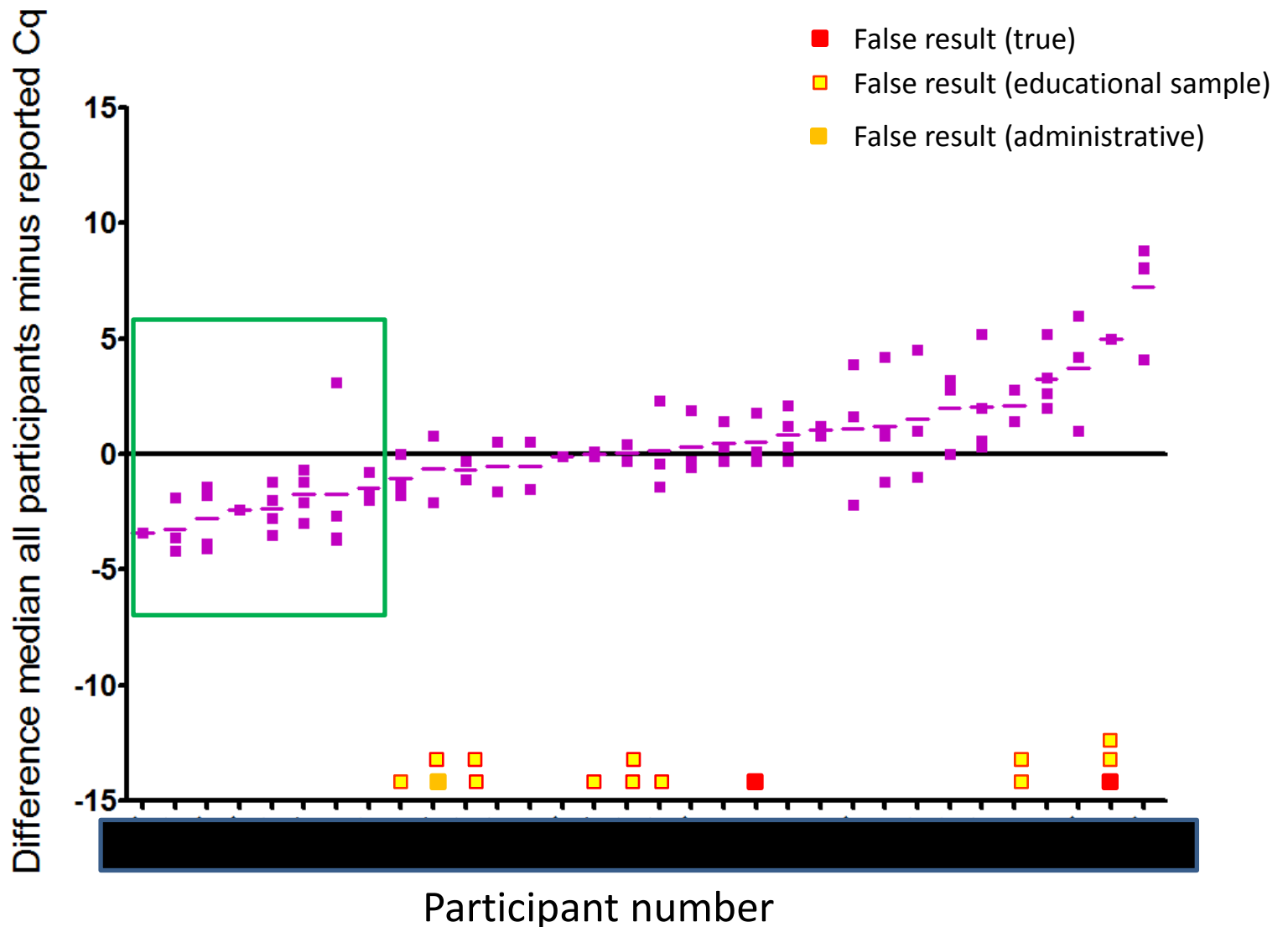
Life Cycle



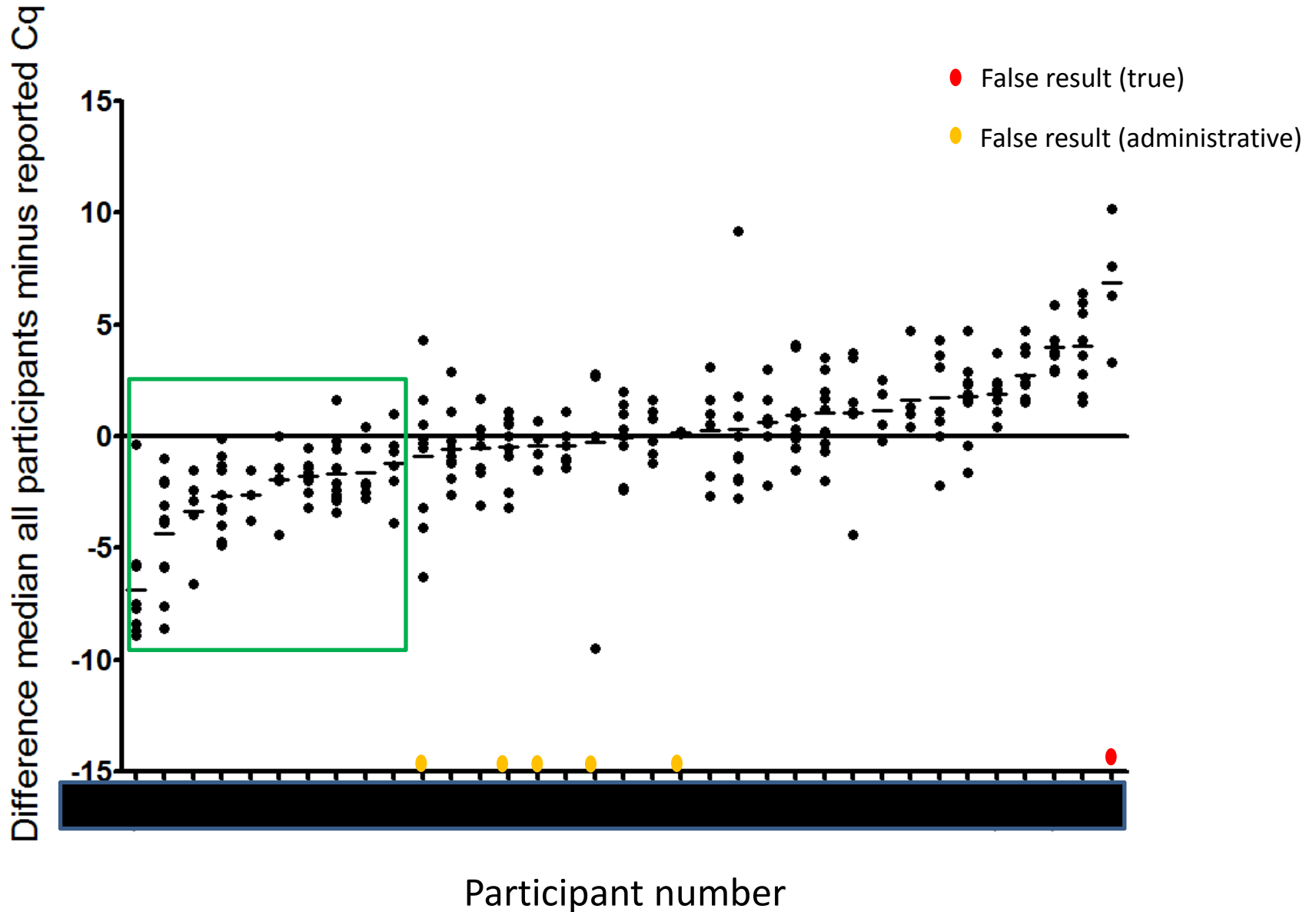
Stichting Kwaliteitsbewaking
Medische Laboratoriumdiagnostiek

Sectie Parasitologie

Cq waarden *E.histolytica* per laboratorium, 2013-2015



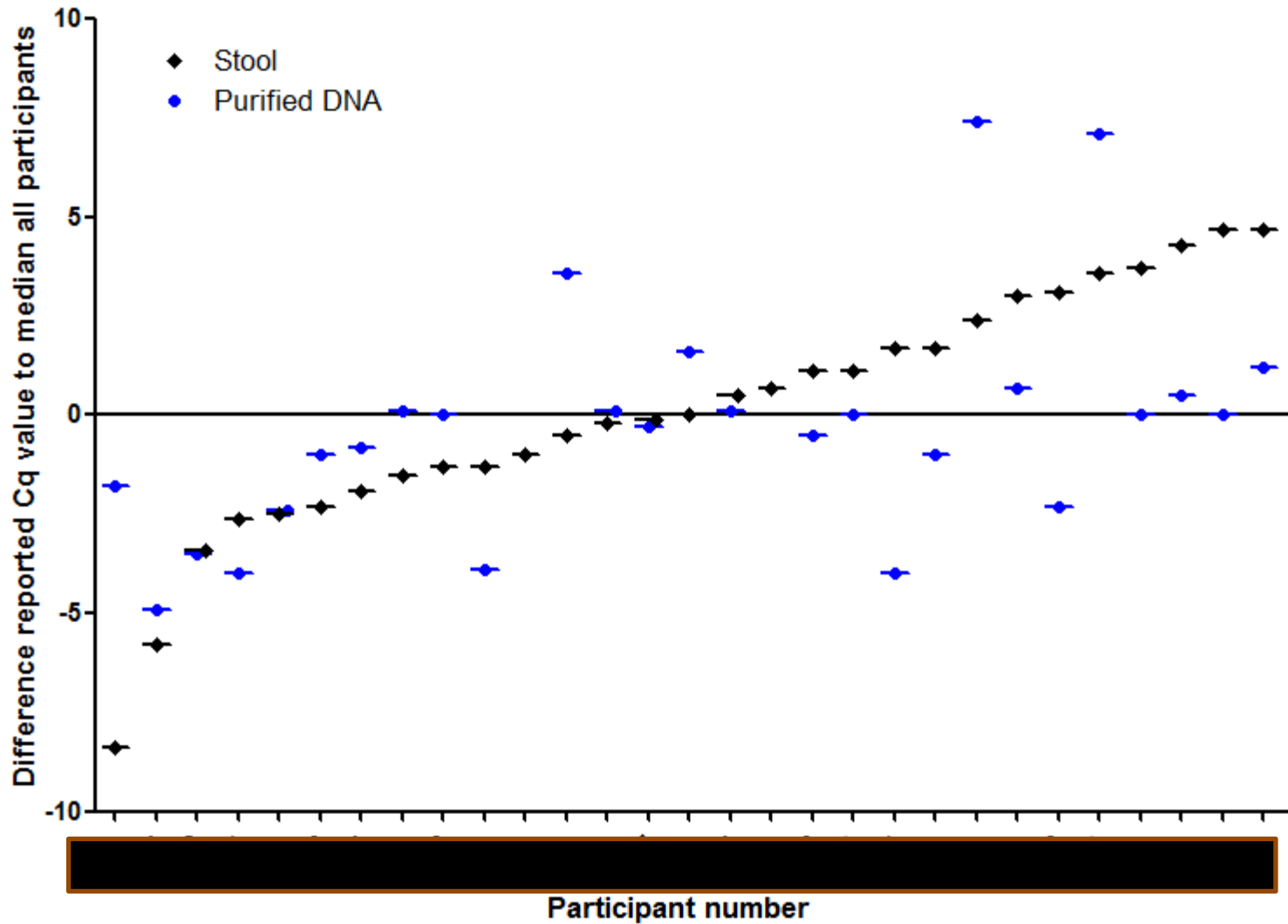
Cq waarden *G.lamblia* per laboratorium, 2013-2015



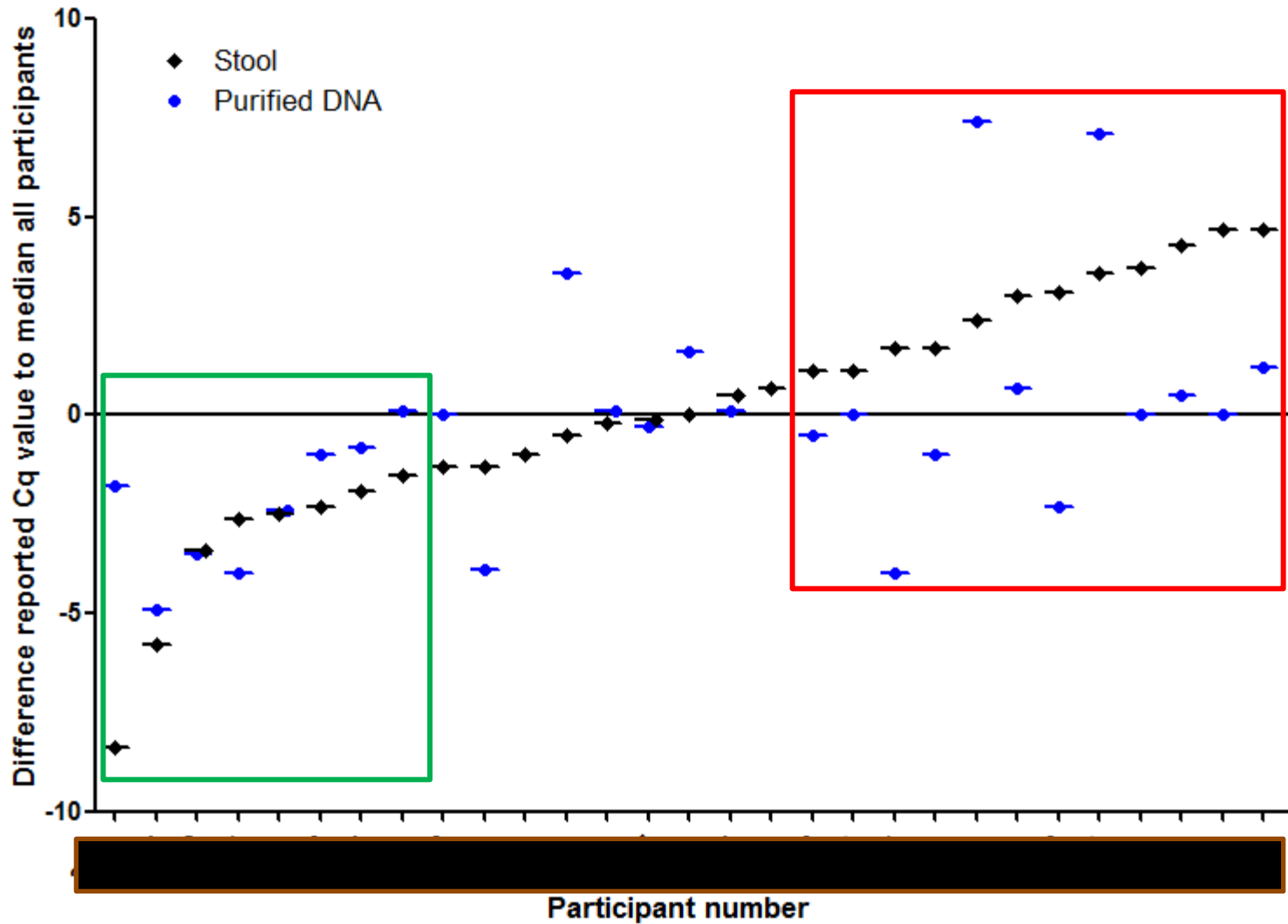
Werkwijze moleculaire diagnostiek intestinale parasieten



G.lamblia uitslagen feces en gezuiverd DNA



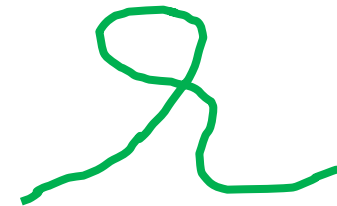
G.lamblia uitslagen feces en gezuiverd DNA



Werkwijze moleculaire diagnostiek intestinale parasieten



G.lamblia :



Werkwijze moleculaire diagnostiek intestinale parasieten

voorbehandeling
feces

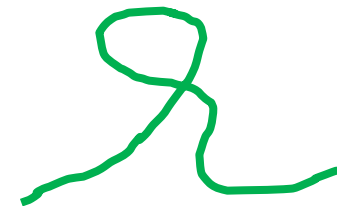
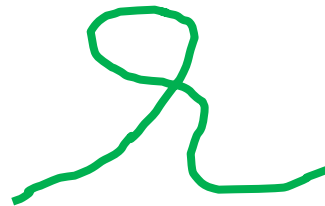


DNA
isolatie



target
amplificatie

G.lamblia :



Verdiepingsvragen voorbehandeling feces

Verdiepingsvragen voorbehandeling feces:

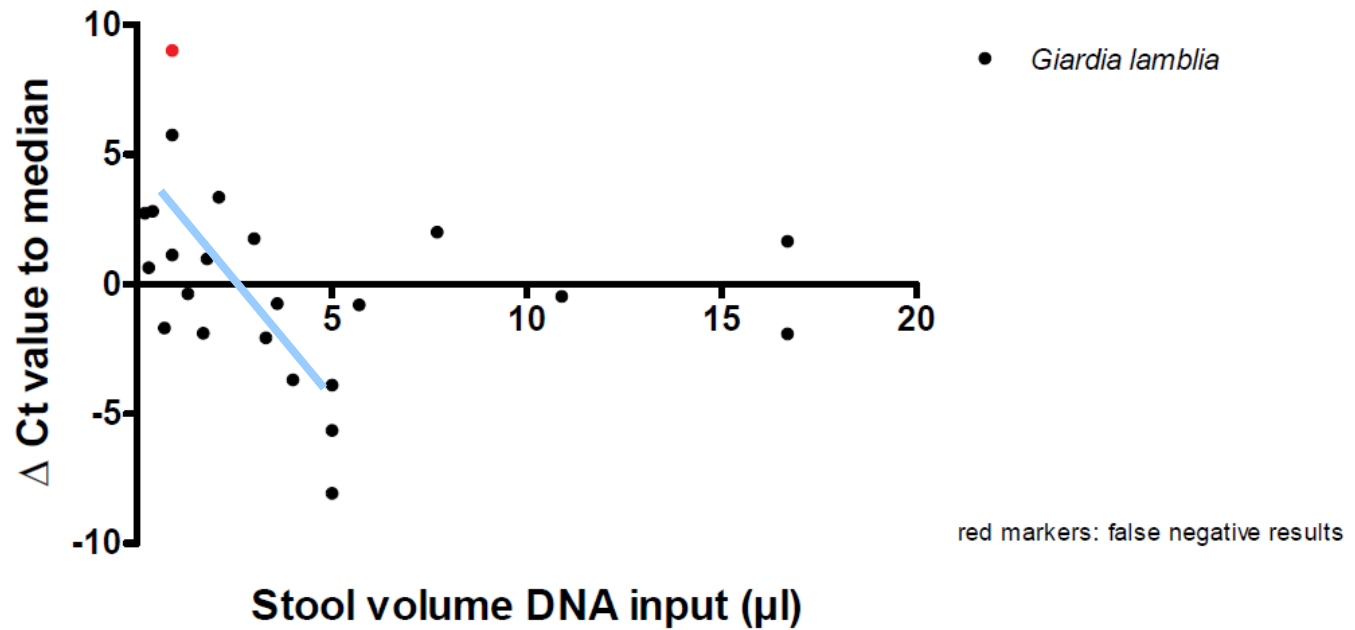
- toevoegen lysisbuffer voor DNA isolatie?
- vries-dooi stap?
- overige voorbehandelingsstappen?
- volume feces in PCR



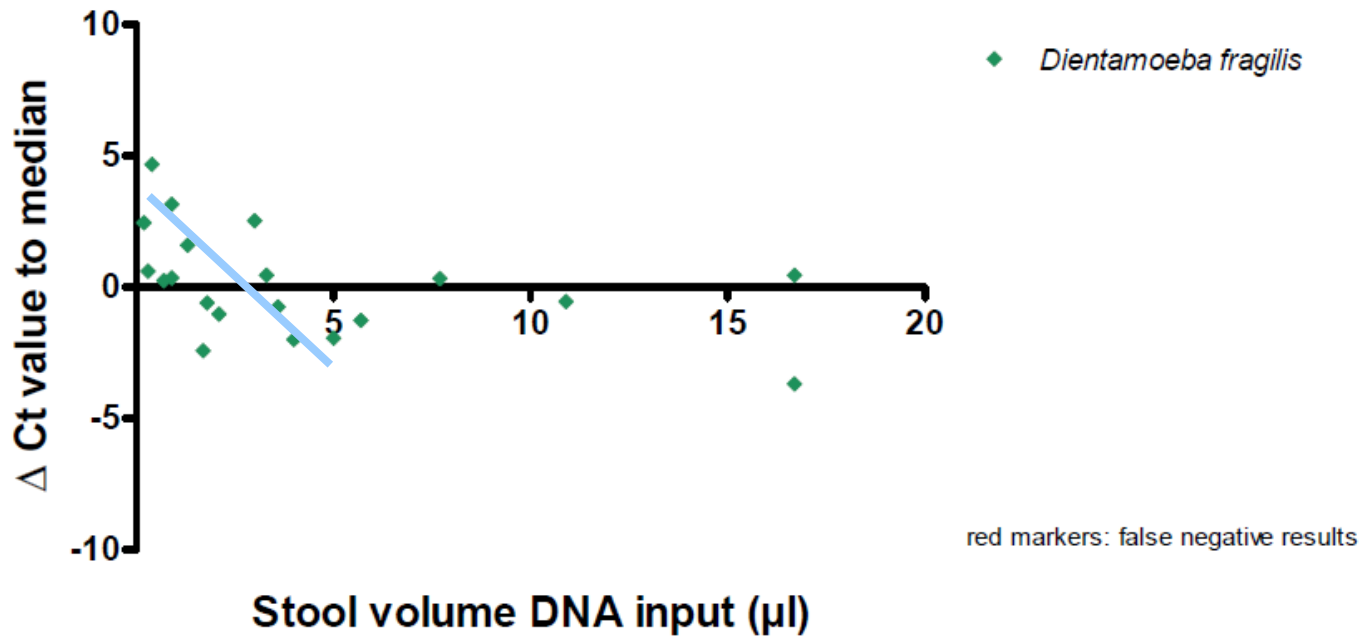
Verdiepingsvragen voorbehandeling feces

Andere manier voor behandeling DNA-extract	extra "of-board" proteolyse behandeling	lysisbuffer toevoegen voorafgaande aan DNA extractie	Vries-dooi cyclus	Volume feces in PCR
ja	nee	ja	ja	0,2
nee	nee	ja	ja	0,3
nee	ja	ja	nee	0,4
nee	nee	ja	ja	0,7
nee	nee	ja	nee	0,9
nee	nee	ja	ja	0,9
nee	nee	ja	ja	1,3
nee	nee	ja	ja	1,7
nee	nee	ja	ja	1,8
ja	nee	ja	nee	2,1
nee	nee	ja	nee	3
nee	nee	ja	ja	3,3
ja	nee	ja	ja	3,6
ja	nee	ja	nee	4
nee	nee	nee	nee	5
nee	nee	ja	ja	5
nee	nee	nee	ja	5
nee	nee	ja	nee	5,7
nee	nee	ja	nee	7,7
nee	nee	ja	ja	10,9
ja	nee	nee	nee	16,7
nee	nee	ja	ja	16,7

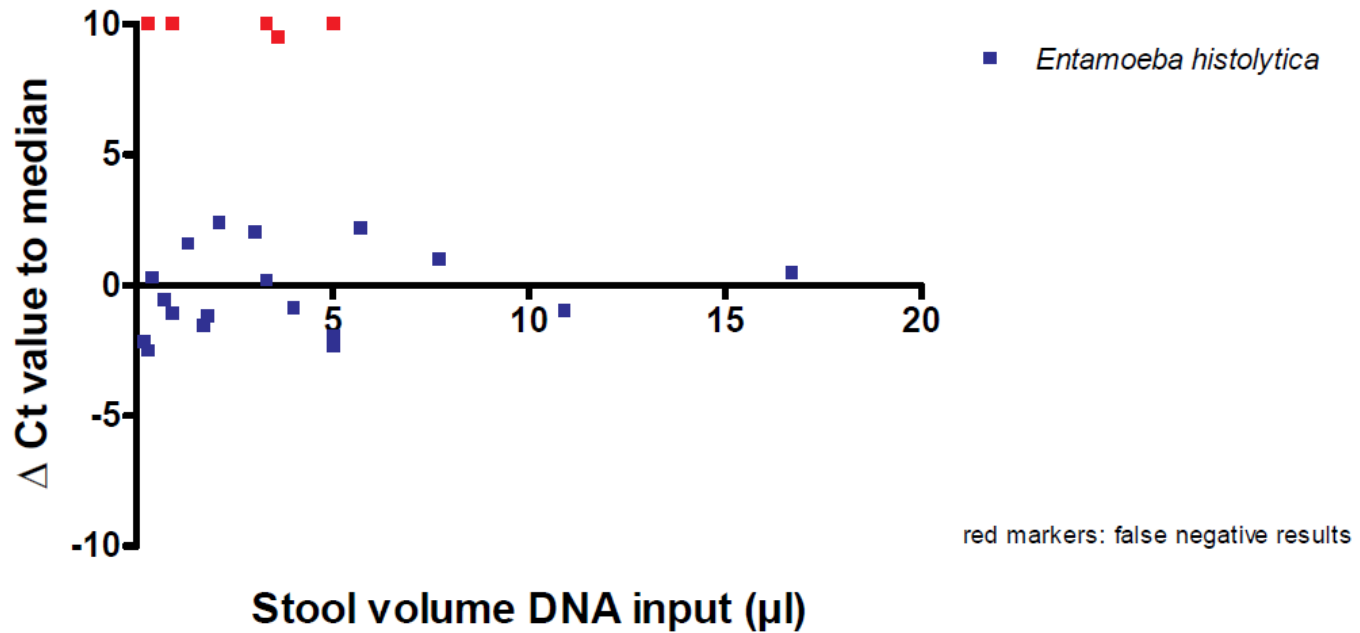
G.lamblia : input PCR



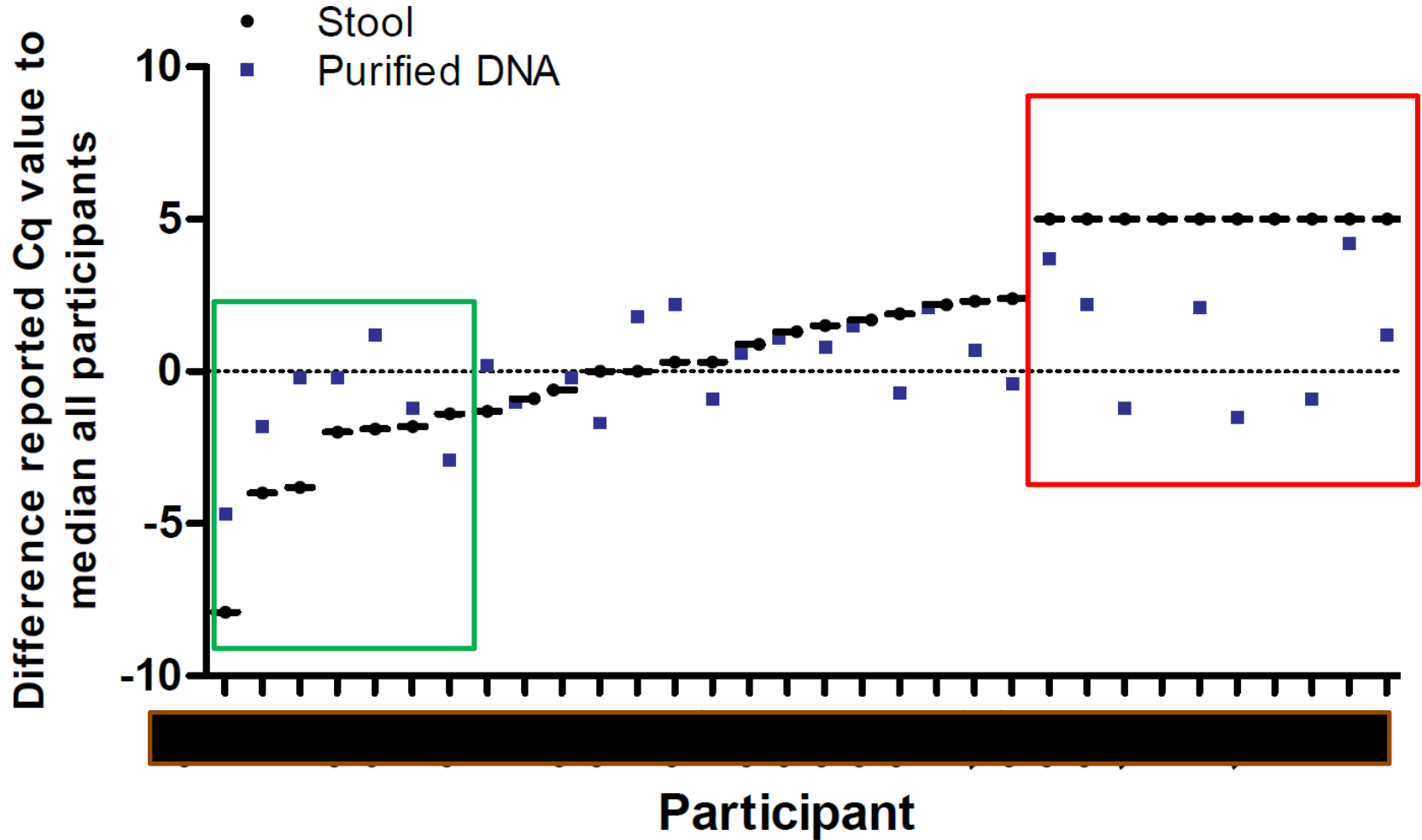
D. fragilis : input PCR



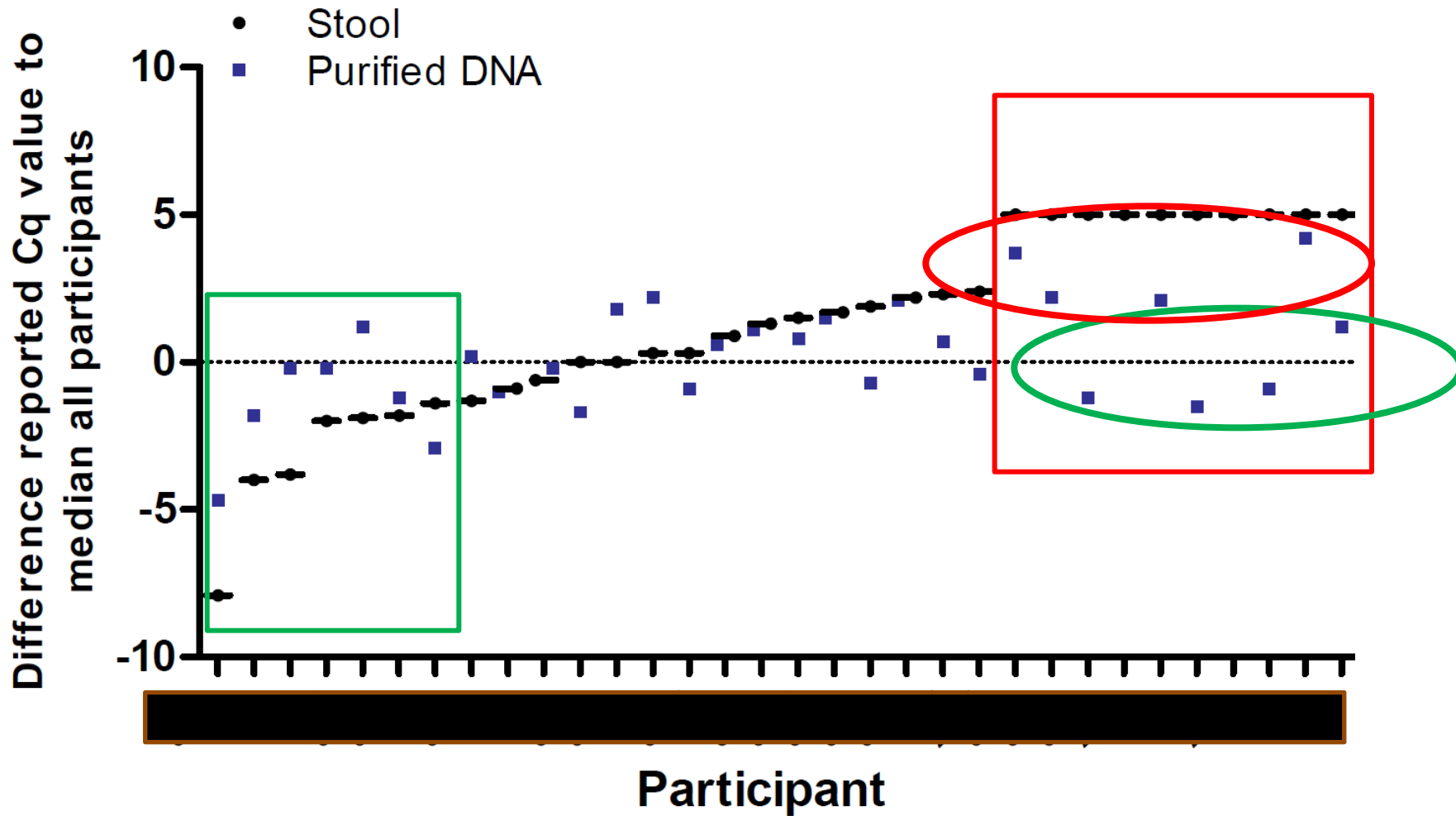
E. histolytica : input PCR



E. histolytica uitslagen feces en gezuiverd DNA



E. histolytica uitslagen feces en gezuiverd DNA



E.histolytica : overzicht resultaten en methoden

15.2B	16.1B	16.3A	17.1C	17.2A	17.2C	17.2D	DNA	17.3A	conclusie rondzendingen	voorbehandeling	extractie	PCR
-3,5	0,9	0,0	-2,5	-1,4	1,7	-2,9	-1,7					
0					1,4	2,1	0,5					
-3,4												
1		0,6	7,5	2,3	-4	0,7	0,4					
8	0,9	7,0			5,1	1,2	-1,9					
-3	-1,3	-1,8	-1,3	-0,9	-0	-1	-2,7					
1,4	2,5	0,7	1,5	0,9	-2	0,6	0,4					
-4,1	-1,1	-1,0	-1,2	-2,0	-6	-0,2	0					
0	-2,1		-0,4	0,3	-3	2,2	-1,7					
0,3	3,4	-2,4			-0	-1,5	5,5					
5					2,1	4,2	0,1					
			1,1	-4,0	-0	-1,8	-4,6					
-1,1	-2,6	-1,5	-0,9	-3,8	-2	-0,2	-3,1					
	-0,5	1,1			3,6	-0,9	3,9					
0,1	-4,3	0,0	0,5	-0,6	0,6	-0,2	1,2					
2	0,4											
2,3		-1,1					-0,7					
1	4,3	-0,2					1,7					
-0,6	-1,8	-2,1		2,4	-2	-0,4	-2					
-1,5	-0,7	-1,2	-1,2	0,0	4	1,8	0,3					
-1,6												
-0,3	-2,5				0,1	-1,2						
		-6,0			-5	3,7	0,3					
0,8	-3,0	1,9		-1,3	-3	0,2	-0,5					
	0,0	-4,6	-5,5	-7,9	-1	-4,7	-5,2					
1	1,6	3,2		1,3	1,2	1,1						
0,6	1,1	3,3	1,9	-1,9	1,4	1,2	-0,2					
		-1,2		-1,8	1,6	-1,2	0,9					
			-0,8		-2	2,2						
-2,7	0,5	-2,2	0,4	0,0	-2	-1,7	-3,6					
0,3	0,0	2,0	3,1	1,7	-3	1,5	0,5					
-1,6												
-2,4	-1,0	1,1	-1,8	0,3	4,5	-0,9	0					
1	3,3	3,9	2,4	2,2	1,8	2,1	-0,1					
	0,3	0,8		1,9	2,4	-0,7						
		0,2	2,4	1,5	1,6	0,8	6					

E.histolytica : overzicht resultaten en methoden

15.2B	16.1B	16.3A	17.1C	17.2A	17.2C	17.2D	DNA	17.3A	conclusie rondzendingen	voorbehandeling	extractie	PCR
-3,5	0,9	0,0	-2,5	-1,4	1,7	-2,9	-1,7					
0					1,4	2,1	0,5		matige PCR	geen gegevens	Magnapure	Verweij (2004)
-3,4												
1		0,6	7,5	2,3	-4	0,7	0,4					
8	0,9	7,0			5,1	1,2	-1,9		variabel beeld, echter PCR lijkt OK	geen gegevens	Magnapure	Verweij (2004)
-3	-1,3	-1,8	-1,3	-0,9	-0	-1	-2,7					
1,4	2,5	0,7	1,5	0,9	-2	0,6	0,4					
-4,1	-1,1	-1,0	-1,2	-2,0	-6	-0,2	0					
0	-2,1		-0,4	0,3	-3	2,2	-1,7					
0,3	3,4	-2,4				-0	-1,5	5,5	zeer variabel beeld slechte PCR	meest input feces van allemaal: speelt remming een rol?	MagnaPure	Verweij (2004)
5					2,1	4,2	0,1					
			1,1	-4,0	-0	-1,8	-4,6					
-1,1	-2,6	-1,5	-0,9	-3,8	-2	-0,2	-3,1					
	-0,5	1,1			3,6	-0,9	3,9		goede PCR	op twee na minst input feces, daarom missers bij lage load?	Magnapure	Verweij (2004) TIB MOLBIOL
0,1	-4,3	0,0	0,5	-0,6	0,6	-0,2	1,2					
2	0,4											
2,3		-1,1					-0,7		geen DNA getest			
1	4,3	-0,2					1,7					
-0,6	-1,8	-2,1		2,4	-2	-0,4	-2					
-1,5	-0,7	-1,2	-1,2	0,0	4	1,8	0,3					
-1,6												
-0,3	-2,5				0,1	-1,2			goede PCR	op een na minst input feces, daarom missers bij lage load?	QiaSymphony	geen gegevens
		-6,0			-5	3,7	0,3		positief beeld, echter slechte PCR	geen gegevens	Magnapure	TIB MOLBIOL
0,8	-3,0	1,9		-1,3	-3	0,2	-0,5					
	0,0	-4,6	-5,5	-7,9	-1	-4,7	-5,2					
1	1,6	3,2		1,3	1,2	1,1						
0,6	1,1	3,3	1,9	-1,9	1,4	1,2	-0,2					
		-1,2		-1,8	1,6	-1,2	0,9					
			-0,8		-2	2,2						
-2,7	0,5	-2,2	0,4	0,0	-2	-1,7	-3,6					
0,3	0,0	2,0	3,1	1,7	-3	1,5	0,5					
-1,6												
-2,4	-1,0	1,1	-1,8	0,3	4,5	-0,9	0					
1	3,3	3,9	2,4	2,2	1,8	2,1	-0,1					
		0,3	0,8		1,9	2,4	-0,7					
		0,2	2,4	1,5	1,6	0,8	6					

E.histolytica : overzicht resultaten en methoden

15.2B	16.1B	16.3A	17.1C	17.2A	17.2C	17.2D	DNA	17.3A	conclusie rondzendingen	voorbehandeling	extractie	PCR
-3,5	0,9	0,0	-2,5	-1,4	1,7	-2,9	-1,7					
0					1,4	2,1	0,5					
-3,4												
1		0,6	7,5	2,3	-4	0,7	0,4					
8	0,9	7,0			5,1	1,2	-1,9					
-3	-1,3	-1,8	-1,3	-0,9	-0	-1	-2,7					
1,4	2,5	0,7	1,5	0,9	-2	0,6	0,4					
-4,1	-1,1	-1,0	-1,2	-2,0	-6	-0,2	0		goede PCR	lage input	Magnapure	Verweij (2004)
0	-2,1		-0,4	0,3	-3	2,2	-1,7					
0,3	3,4	-2,4				-0	-1,5	5,5				
5						2,1	4,2	0,1				
			1,1	-4,0	-0	-1,8	-4,6		goede PCR	geen gegevens	QiaSymphony	Verweij (2004)
-1,1	-2,6	-1,5	-0,9	-3,8	-2	-0,2	-3,1		goede PCR	geen gegevens	EasyMag	Verweij (2004)
	-0,5	1,1			3,6	-0,9	3,9					
0,1	-4,3	0,0	0,5	-0,6	0,6	-0,2	1,2					
2	0,4											
2,3		-1,1					-0,7					
1	4,3	-0,2					1,7					
-0,6	-1,8	-2,1			2,4	-2	-0,4	-2				
-1,5	-0,7	-1,2	-1,2	0,0	4	1,8	0,3					
-1,6												
-0,3	-2,5				0,1	-1,2						
		-6,0			-5	3,7	0,3					
0,8	-3,0	1,9		-1,3	-3	0,2	-0,5					
	0,0	-4,6	-5,5	-7,9	-1	-4,7	-5,2		uitstekende PCR	optimale hh feces input	Magnapure	galactose specific adhesion
1	1,6	3,2		1,3	1,2	1,1						
0,6	1,1	3,3	1,9	-1,9	1,4	1,2	-0,2					
		-1,2		-1,8	1,6	-1,2	0,9					
			-0,8		-2	2,2						
-2,7	0,5	-2,2	0,4	0,0	-2	-1,7	-3,6					
0,3	0,0	2,0	3,1	1,7	-3	1,5	0,5					
-1,6												
-2,4	-1,0	1,1	-1,8	0,3	4,5	-0,9	0					
1	3,3	3,9	2,4	2,2	1,8	2,1	-0,1					
	0,3	0,8		1,9	2,4	-0,7						
		0,2	2,4	1,5	1,6	0,8	6					

Samenvattend: moleculaire rondzendingen feces protozoa

- enorme variatie in gerapporteerde Cq waarden
- laboratoria met lage Cq waarden rapporteren minder fout-negatieven
- matige labscores zijn individueel terug te voeren op verminderd sensitieve PCR en/of DNA isolatie (incl. voorbehandeling)
- *Giardia*: matige labscores gerelateerd aan verminderde input in PCR
- *E.histolytica*: variabel beeld, individuele oorzaken van matige scores



Samenvattend: moleculaire rondzendingen feces protozoa

- enorme variatie in gerapporteerde Cq waarden
- laboratoria met lage Cq waarden rapporteren minder fout-negatieven
- matige labscores zijn individueel terug te voeren op verminderd sensitieve PCR en/of DNA isolatie (incl. voorbehandeling)
- *Giardia*: matige labscores gerelateerd aan verminderde input in PCR
- *E.histolytica*: variabel beeld, individuele oorzaken van matige scores

Neem contact op voor individuele lab-specifieke resultaten!



Harmonization of PCR-based detection of intestinal pathogens: experiences from the Dutch external quality assessment scheme on molecular diagnosis of protozoa in stool samples.

Schuurs TA, Koelewijn R, Brienen EAT, Kortbeek T, Mank TG, Mulder B, Stelma FF, van Lieshout L, van Hellemond JJ.

Clin Chem Lab Med. 2018 Feb 16. pii: /j/cclm.ahead-of-print/cclm-2017-1057/cclm-2017-1057.xml. doi: 10.1515/cclm-2017-1057. [Epub ahead of print]

PMID:

29451859



Stichting Kwaliteitsbewaking
Medische Laboratoriumdiagnostiek

Sectie Parasitologie