

Moleculaire diagnostiek intestinale parasieten

-rondzendingen ten behoeve van Mdx-

Theo Schuurs, moleculair bioloog

Lid namens WMDI / NVMM

Izore, Centrum Infectieziekten Friesland, Leeuwarden



Stichting Kwaliteitsbewaking
Medische Laboratoriumdiagnostiek

Sectie Parasitologie

Huidige rondzendingen SKML-parasitologie:

- 4x per jaar rondzending t.b.v. detectie darm en bloedparasieten
- 2 feces en 2 bloedmonsters (gefixeerd materiaal)
- 92 participerende labs (2010)
 - > 79 beide panels
 - > 9 bloed panel
 - > 4 feces panel
- materiaal niet geschikt voor Moleculaire diagnostiek



Stichting Kwaliteitsbewaking
Medische Laboratoriumdiagnostiek

Sectie Parasitologie

Aanbieders kwaliteits-rondzendingen:

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

Momenteel geen rondzendingen beschikbaar voor Mdx



Stichting Kwaliteitsbewaking
Medische Laboratoriumdiagnostiek

Sectie Parasitologie

Doel: panel uitbreiden om kwaliteit moleculaire diagnostiek laboratoria te testen

Voorwaarden:

- pathogeen in feces
 - > geen gevriesdroogd materiaal
 - > geen DNA
 - > niet gefixeerd
- homogene, reproduceerbare monsters
- uitdagende loads
- vragenlijst gebruikte methoden



Stichting Kwaliteitsbewaking
Medische Laboratoriumdiagnostiek

Sectie Parasitologie

Molecular diagnostics of gastroenteritis in clinical samples; a multicenter quality control study in The Netherlands

Theo A. Schuurs*, T.N. Hoang Nguyen, A. Mirjam D. Kooistra-
Smid** and Gerda T. Noordhoek

Centre for Infectious Diseases Friesland, Leeuwarden, The Netherlands,

*e-mail: t.a.schuurs@izore.nl

**Laboratory for Infectious Diseases, Groningen, The Netherlands



Materials and Methods

Panel composition

Monster nr	Salmonella (Ct)	Campylobacter (Ct)	Giardia (Ct)	Cryptosporidium (Ct)
1	33	ud	30	ud
2	33	27	30	ud
3	27	33	30	ud
4	ud	33	30	ud
5	ud	ud	30	ud
6	30	ud	33	ud
7	30	ud	33	27
8	30	ud	27	33
9	30	ud	ud	33
10	30	ud	ud	ud
11	ud	ud	ud	ud

Nr. of participants: 20

Bacteria only: 3

Parasites only: 8

Both type of pathogens: 11

Recommendations

Bacterial targets: > Optimize amount of sample input
> Optimize DNA isolation

Parasite (Giardia) target: > avoid excessive heating during sample pre-treatment but instead mix vigorously
> Optimize PCR reaction

Polymerase Chain Reaction (PCR)

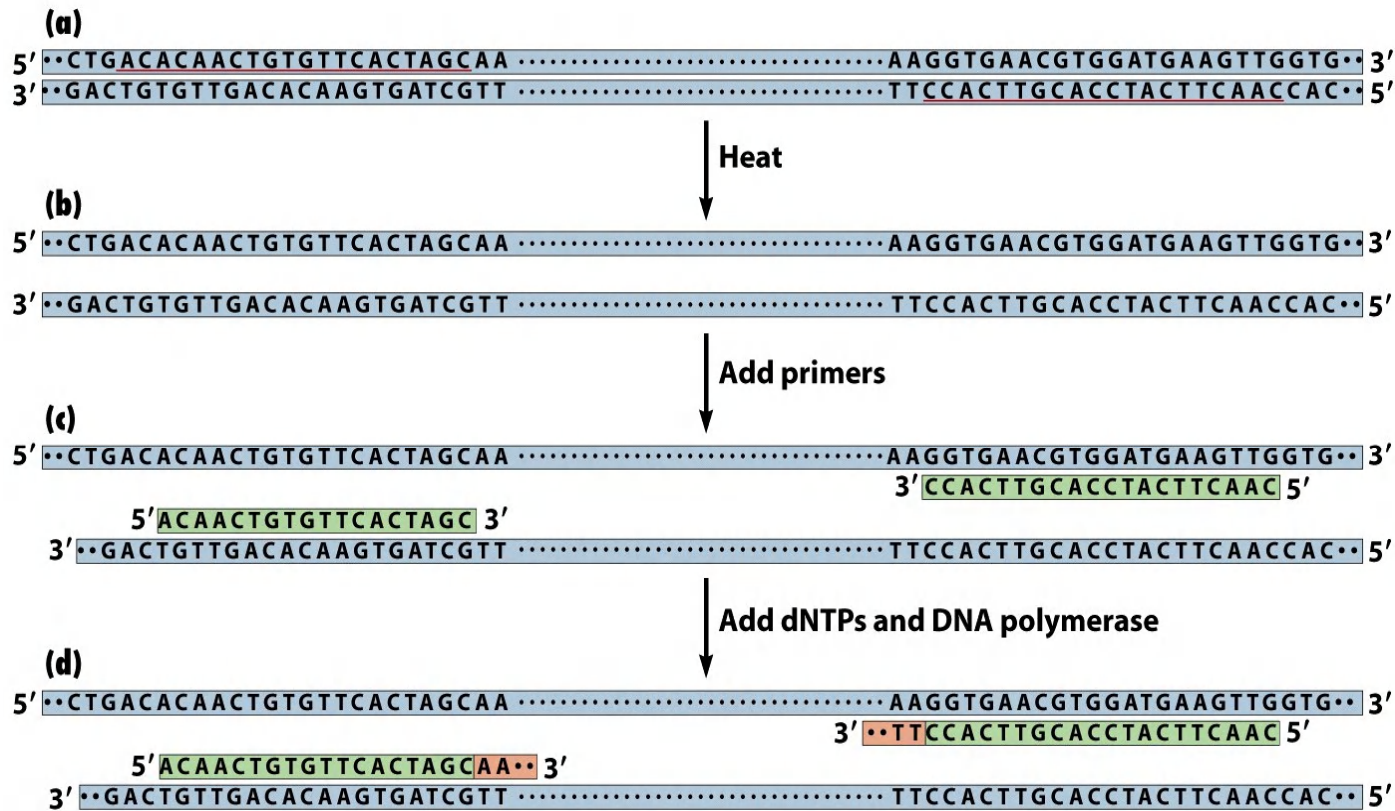


Figure 4-13
Genes and Genomics: A Short Course (3e)
 © 2007 W.H. Freeman and Company

PCR

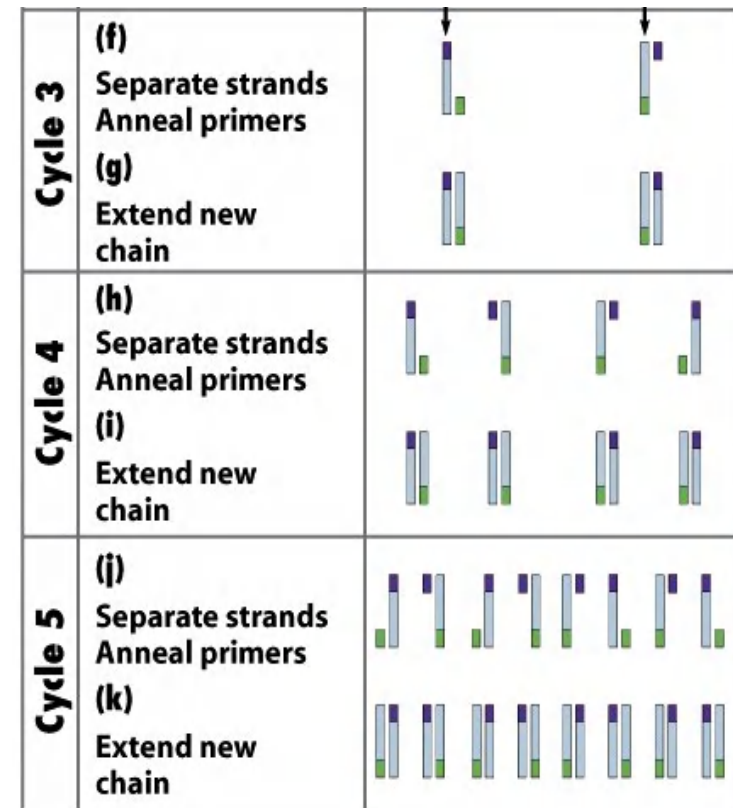
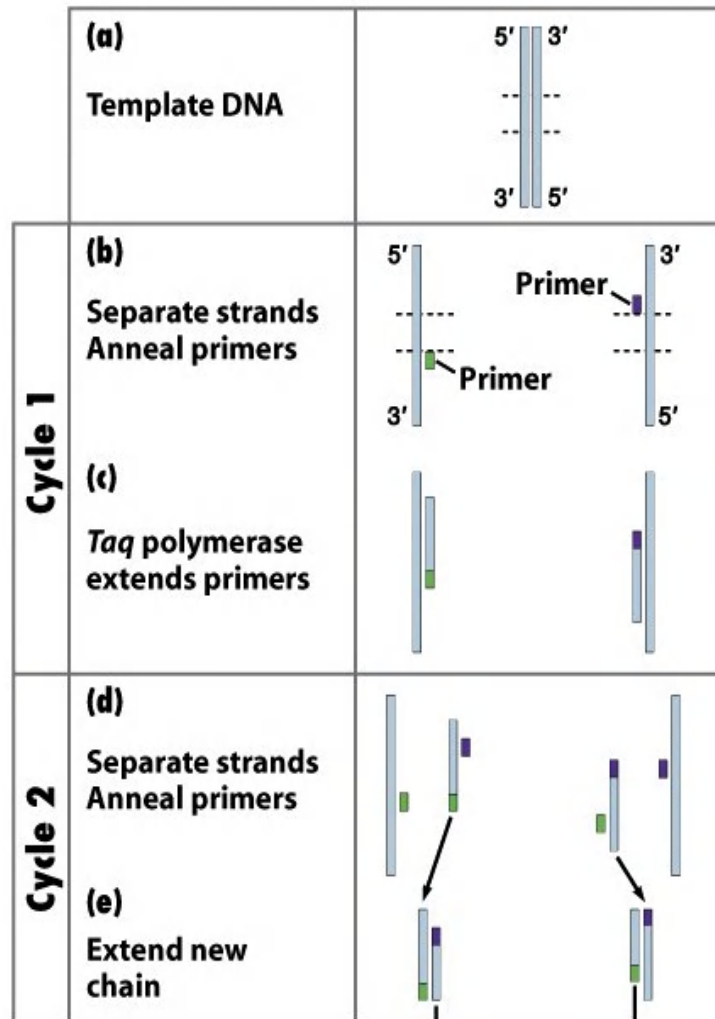
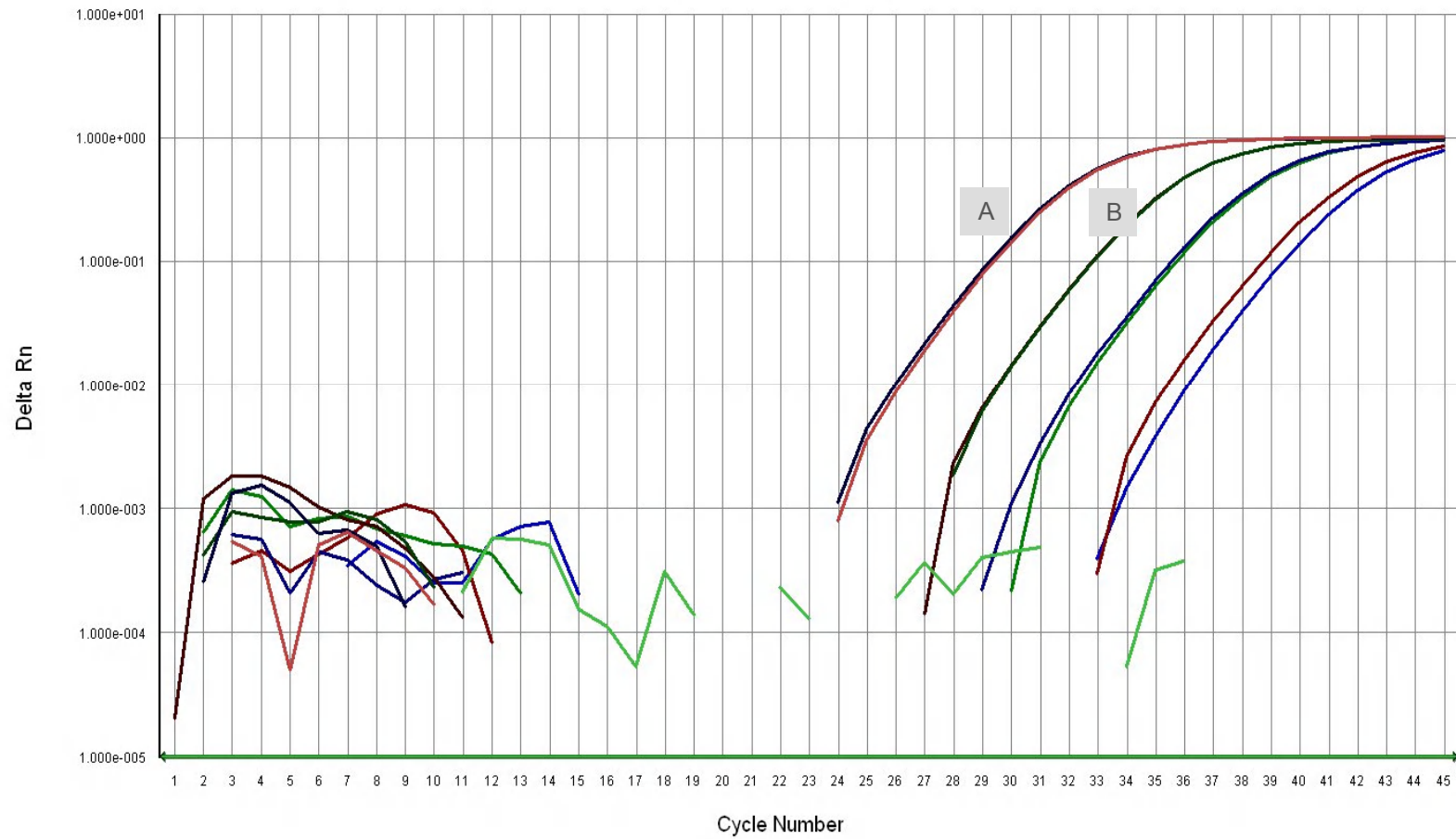


Figure 4-15
Genes and Genomics: A Short Course (3e)
 © 2007 W. H. Freeman and Company

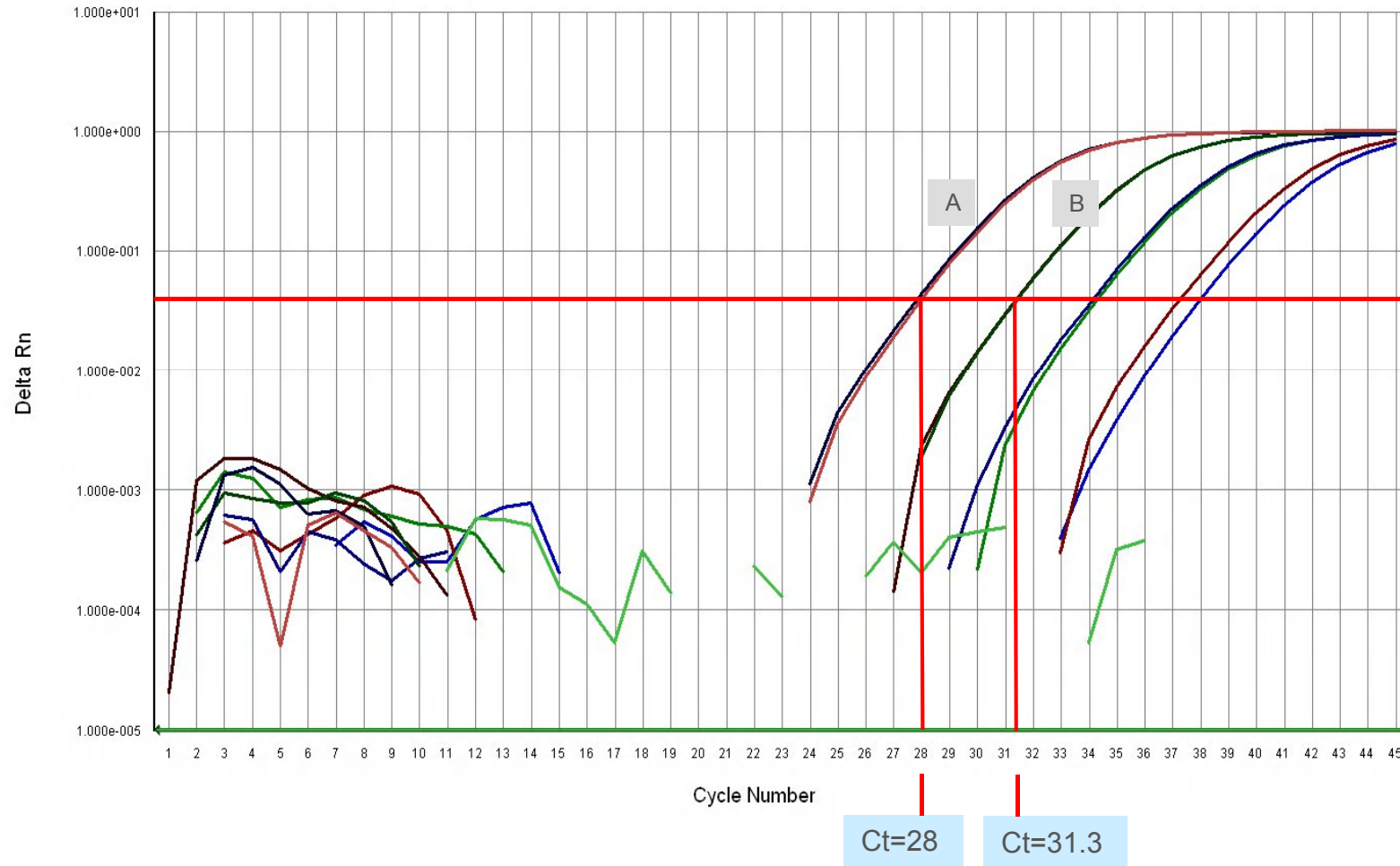
Delta Rn vs Cycle



Stichting Kwaliteitsbewaking
Medische Laboratoriumdiagnostiek

Sectie Parasitologie

Delta Rn vs Cycle



Lage Ct = veel target aanwezig = “hoge load”

Hoge Ct = weinig target aanwezig = “lage load”

Werkwijze SKML-parasitologie

- monsters afkomstig referentenlaboratoria
- gereedgemaakt voor rondzending (MMB-parasitologie, Radboud, Nijmegen)
- getest door referentenlaboratoria



Stichting Kwaliteitsbewaking
Medische Laboratoriumdiagnostiek

Sectie Parasitologie

Resultaten rondzendingen 2011 (pilot-fase):

Monster 2011.2: Giardia positief (Ct 23-28)
D. fragilis positief (Ct 31-34)

Resultaat (n=23):

- 14 Giardia + D. fragilis **P**
- 3 Giardia **P**
- 3 Giardia + D. fragilis + Blastocystis hominis **P**
- 2 Giardia + Blastocystis hominis **P**
- 1 geen parasieten “gezien”



Stichting Kwaliteitsbewaking
Medische Laboratoriumdiagnostiek

Sectie Parasitologie

Resultaten rondzendingen 2011 (pilot-fase):

Monster 2011.3: D. fragilis positief (Ct 32-37)

Resultaat (n=26):

- 21 D. fragilis **P**
- 3 geen parasieten gezien
- 1 niet ingevuld
- 1 doorgestuurd



Resultaten rondzendingen 2011 (pilot-fase):

Monster 2011.4: Cryptosporidium sp. positief (Ct29-36)

Resultaat (n=29):

22	Cryptosporidium sp. P
1	Crypto sp. + D. fragilis P
2	geen parasieten gezien
4	niet ingevuld

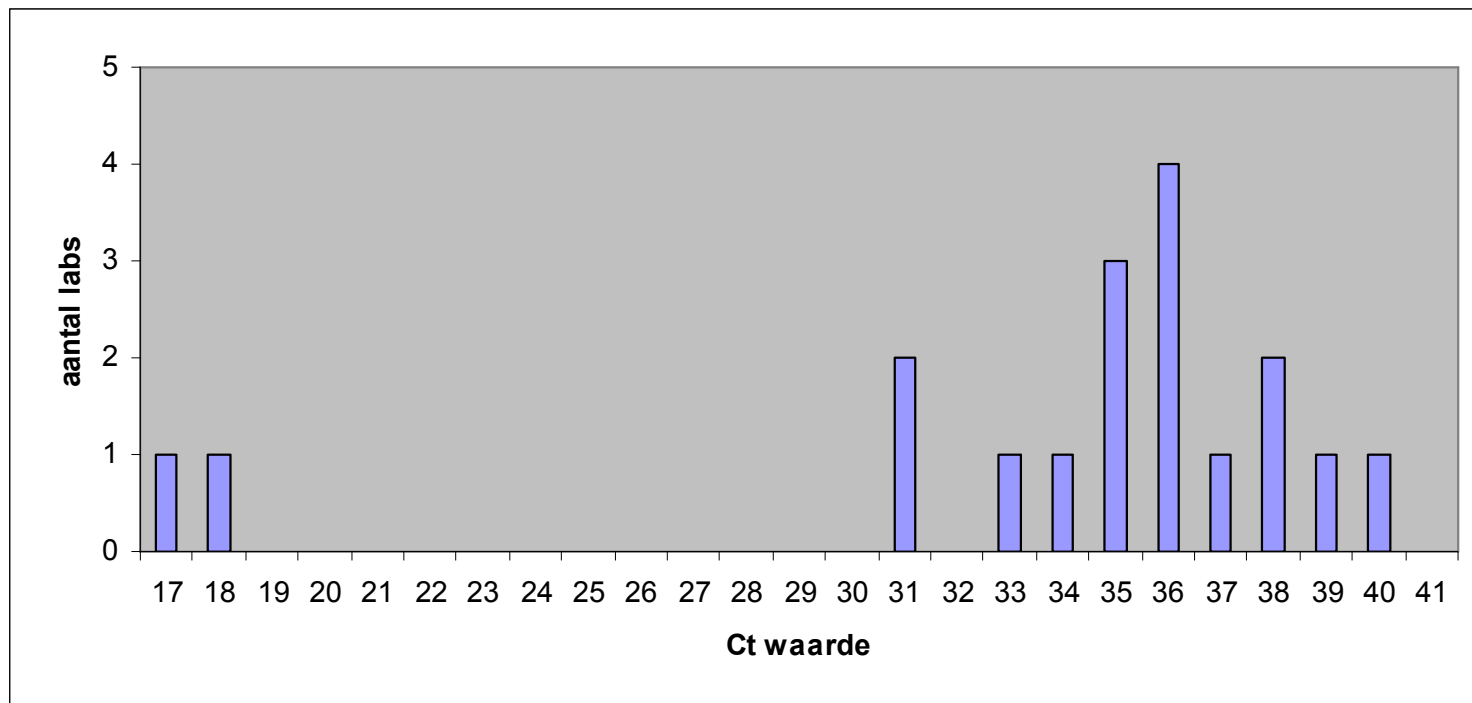


Stichting Kwaliteitsbewaking
Medische Laboratoriumdiagnostiek

Sectie Parasitologie

Resultaten rondzendingen 2011 (pilot-fase):

Monster 2011.3: D. fragilis positief

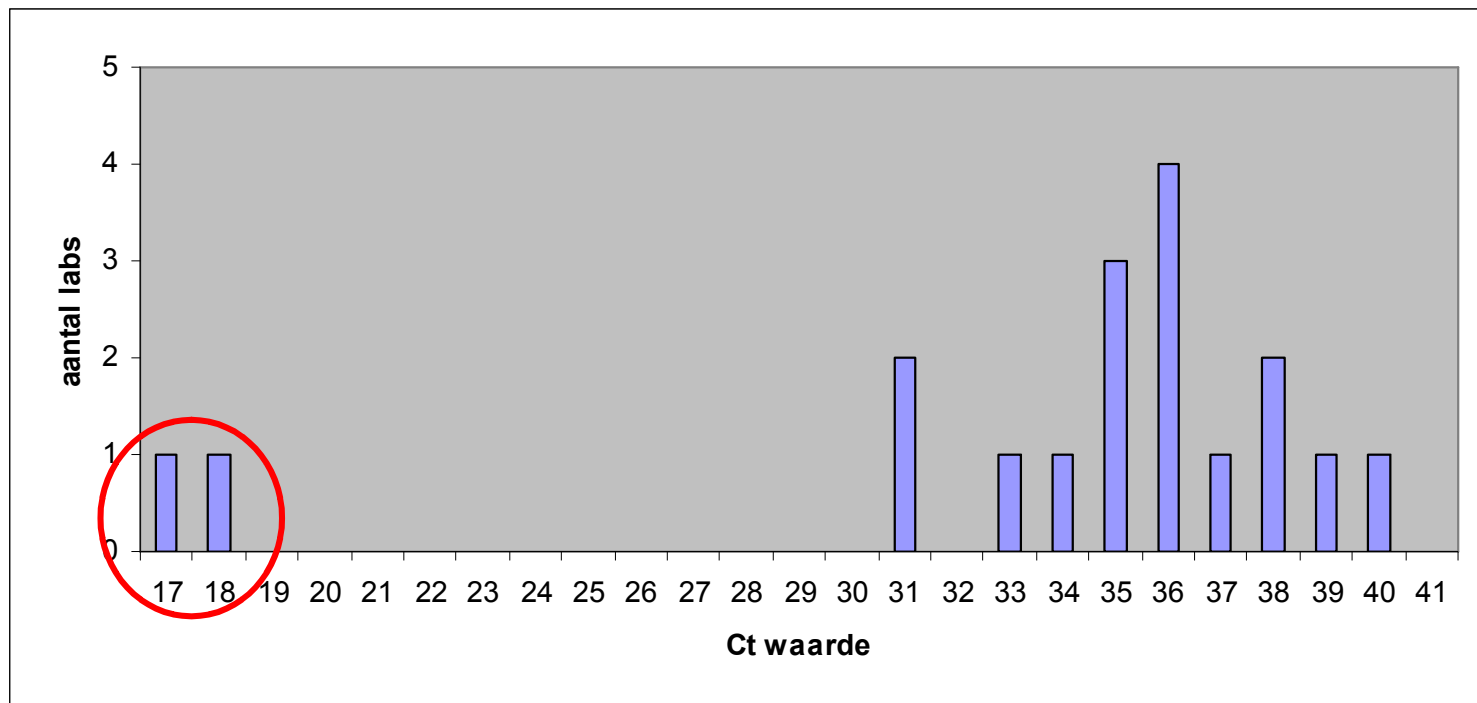


Stichting Kwaliteitsbewaking
Medische Laboratoriumdiagnostiek

Sectie Parasitologie

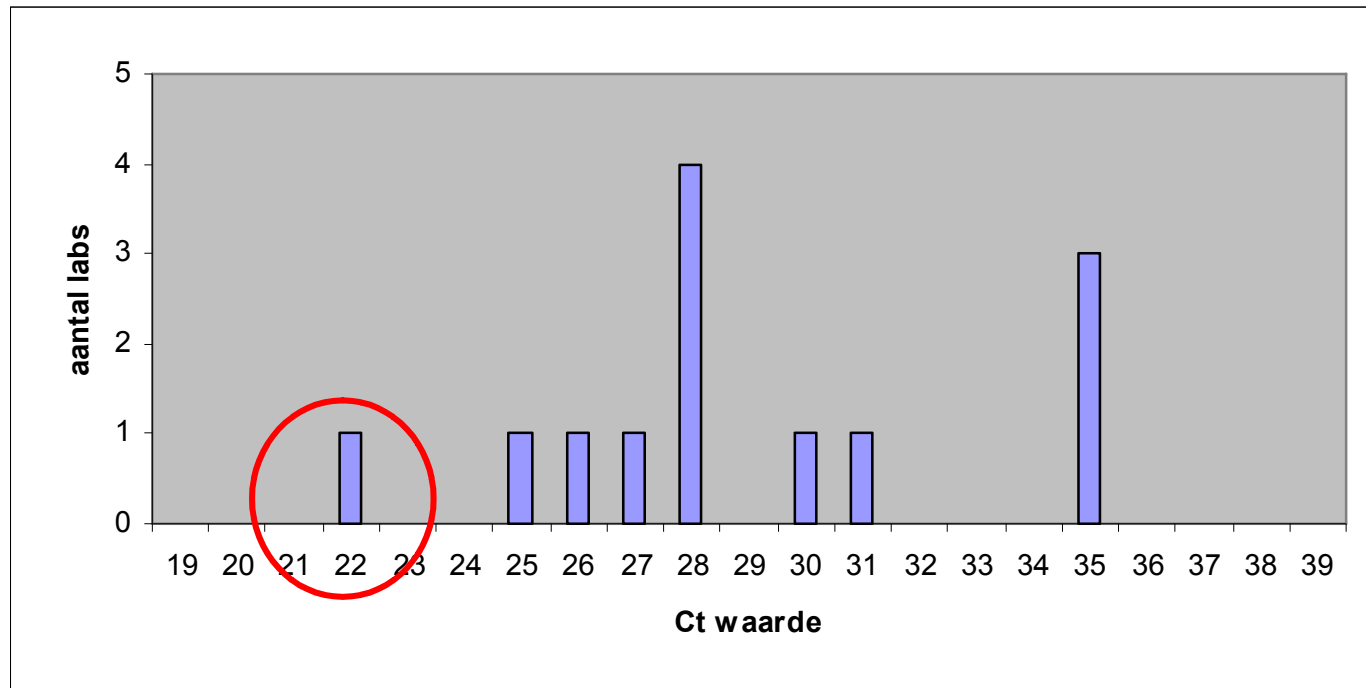
Resultaten rondzendingen 2011 (pilot-fase):

Monster 2011.3: Dientamoeba positief



Resultaten rondzendingen 2011 (pilot-fase):

Monster 2011.2: Giardia lamblia positief

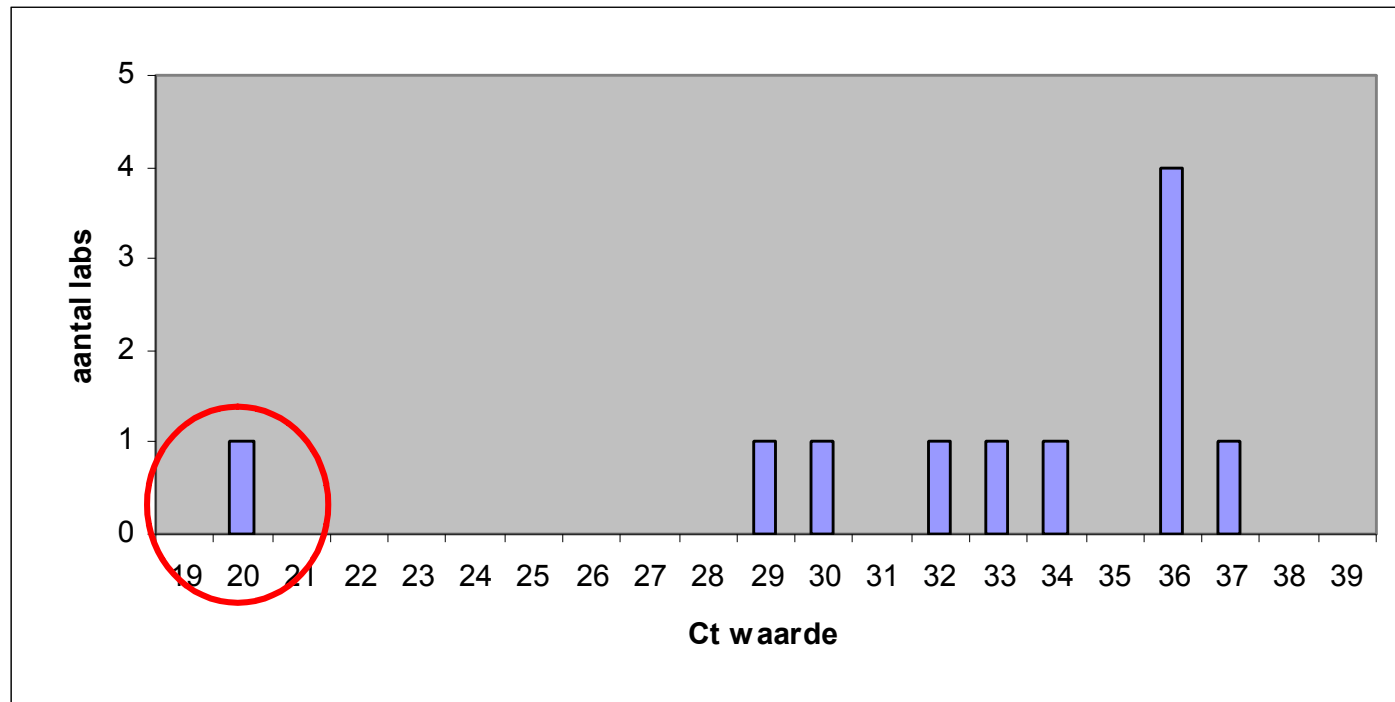


Stichting Kwaliteitsbewaking
Medische Laboratoriumdiagnostiek

Sectie Parasitologie

Resultaten rondzendingen 2011 (pilot-fase):

Monster 2011.2: Dientamoeba positief



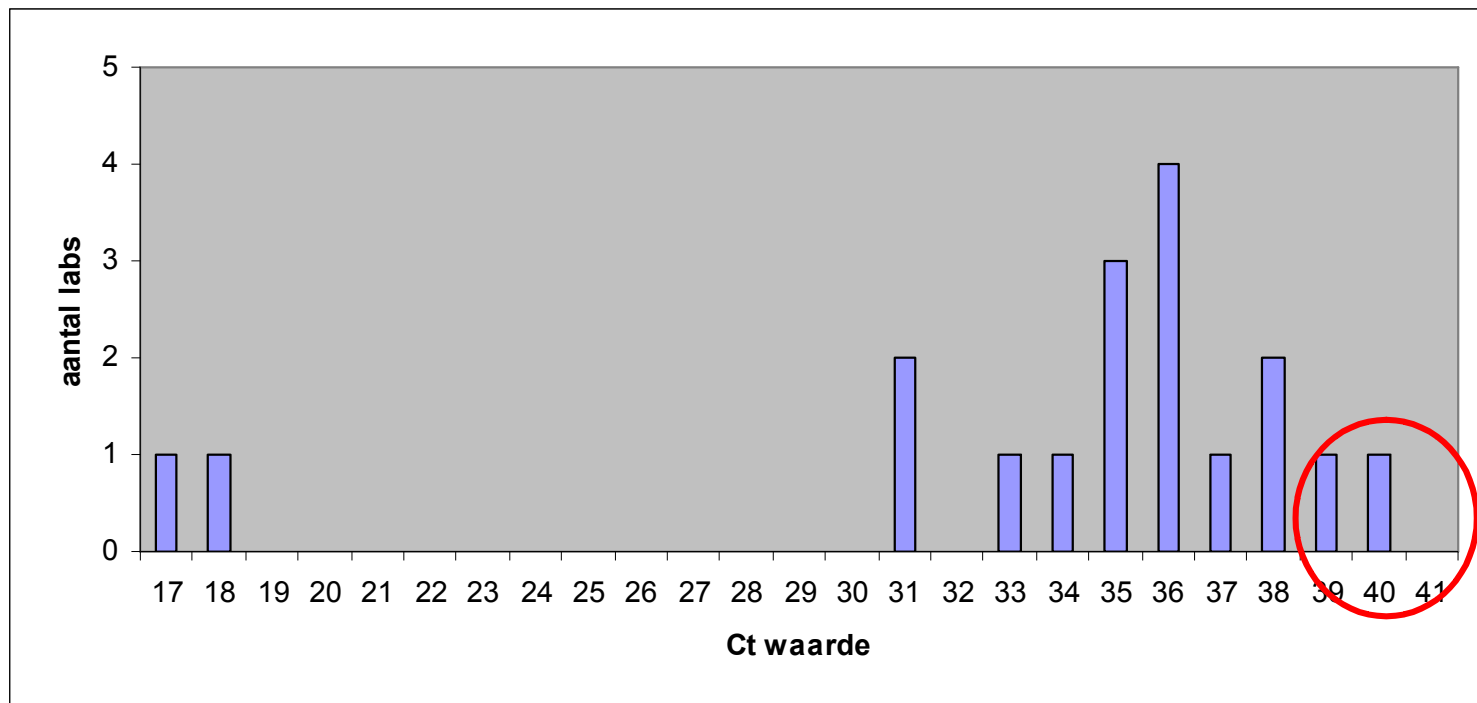
Resultaten rondzendingen 2011 (pilot-fase):

Monster 2011.2: Blastocystis hominis positief



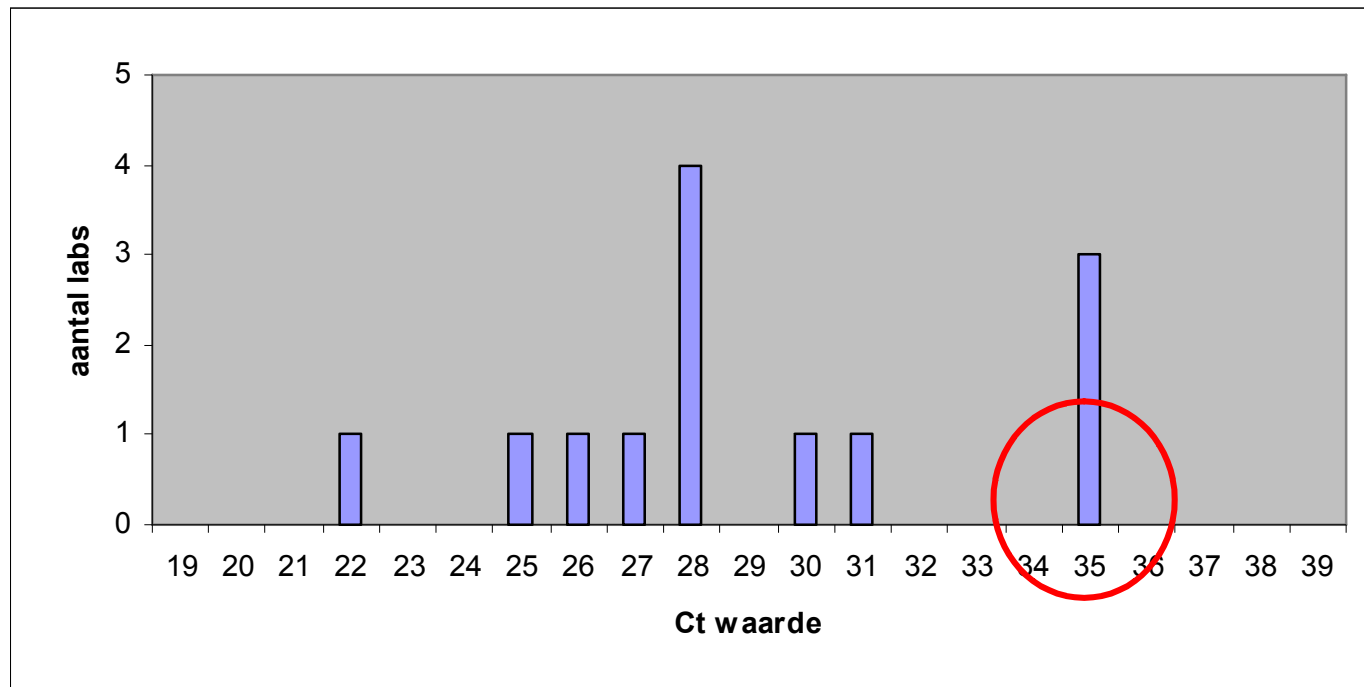
Resultaten rondzendingen 2011 (pilot-fase):

Monster 2011.3: Dientamoeba positief



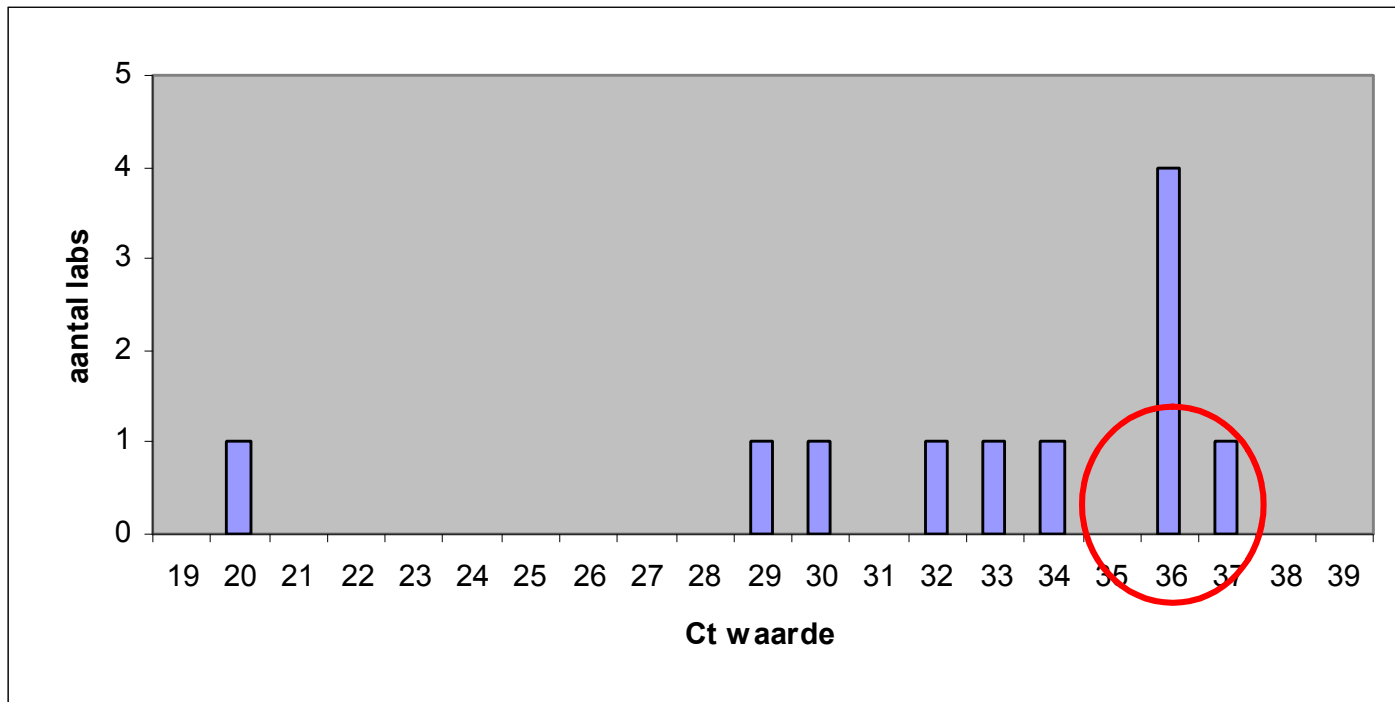
Resultaten rondzendingen 2011 (pilot-fase):

Monster 2011.2: Giardia lamblia positief



Resultaten rondzendingen 2011 (pilot-fase):

Monster 2011.2: Dientamoeba positief



Kwaliteitscontrole: variatie binnen rondzending

monster nr.	parasiet	Ct-waarde
2012.1E-1	Giardia lamblia	24.40
2012.1E-2	Giardia lamblia	25.01
2012.1E-3	Giardia lamblia	25.09
2012.1E-4	Giardia lamblia	24.44
2012.1E-5	Giardia lamblia	24.60
2012.1E-6	Giardia lamblia	24.50

Δ Ct 0.69



Stichting Kwaliteitsbewaking
Medische Laboratoriumdiagnostiek

Sectie Parasitologie

Kwaliteitscontrole: variatie binnen rondzending

monster nr.	parasiet	Ct-waarde
2012.1F-1	Entamoeba histolytica	35.10
2012.1F-2	Entamoeba histolytica	37.10
2012.1F-3	Entamoeba histolytica	36.36
2012.1F-4	Entamoeba histolytica	35.37
2012.1F-5	Entamoeba histolytica	37.74
2012.1F-6	Entamoeba histolytica	35.00

Δ Ct 2.74



Stichting Kwaliteitsbewaking
Medische Laboratoriumdiagnostiek

Sectie Parasitologie

Doelen korte termijn:

- kwaliteitscontrole uitbreiden:
 - *reproduceerbaarheid*
 - *stabiliteit*
- vragenlijst rondsturen:
 - *gebruikte methoden*
 - *targets*



Stichting Kwaliteitsbewaking
Medische Laboratoriumdiagnostiek

Sectie Parasitologie

Samenvattend:

- vanaf voorjaar 2011 gestart met pilot
- vanaf 2012.1: 2 monsters (E en F) voor Mdx.
- focus op klinische (feces) monsters
- wensen/behoefte vanuit het veld mede bepalend voor inrichten Mdx-panel
- vanaf 2013 starten met officiële Mdx-rondzending



Stichting Kwaliteitsbewaking
Medische Laboratoriumdiagnostiek

Sectie Parasitologie