

Moleculaire diagnostiek; darmparasieten & Trichomonas -overzicht 2016-

Theo Schuurs, moleculair bioloog

Lid namens WMDI / NVMM

Rob Koelewijn

Jaap van Hellemond

2013: Introductie fecespanel geschikt voor Mdx

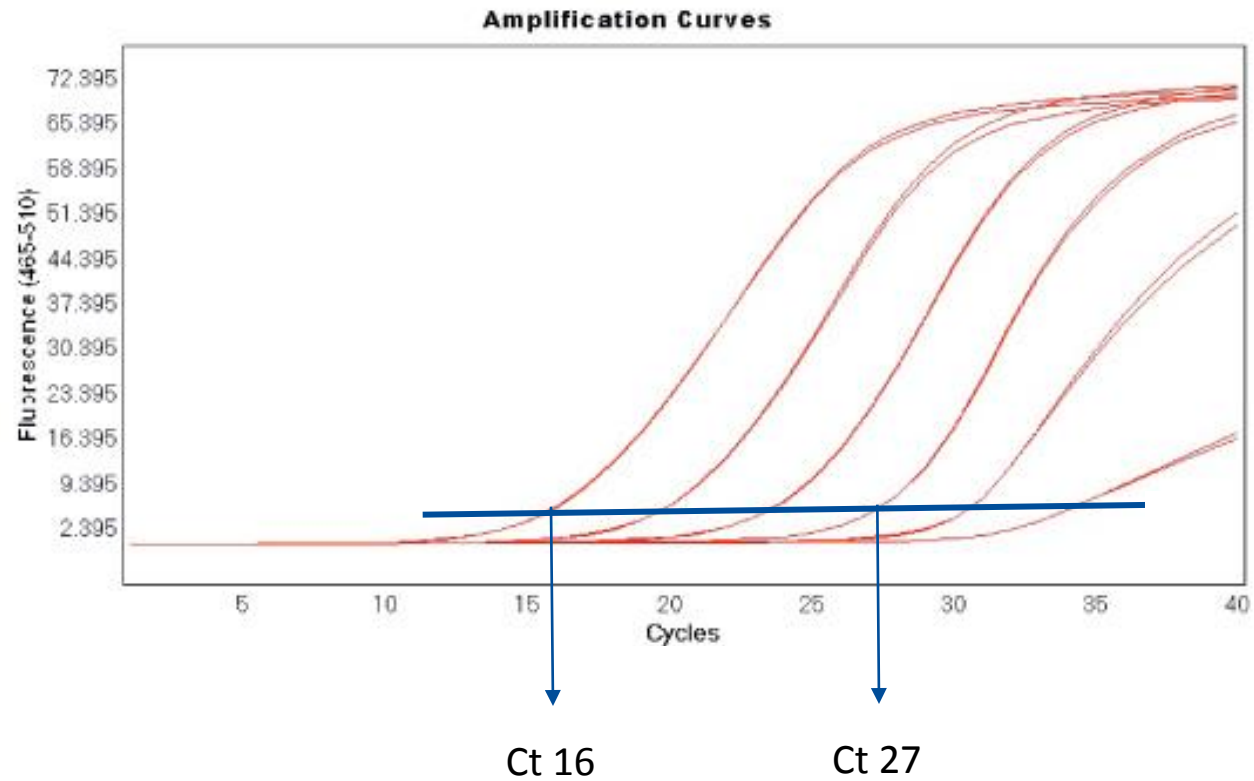
SKML-parasitologie

Karakteristieken rondzending:

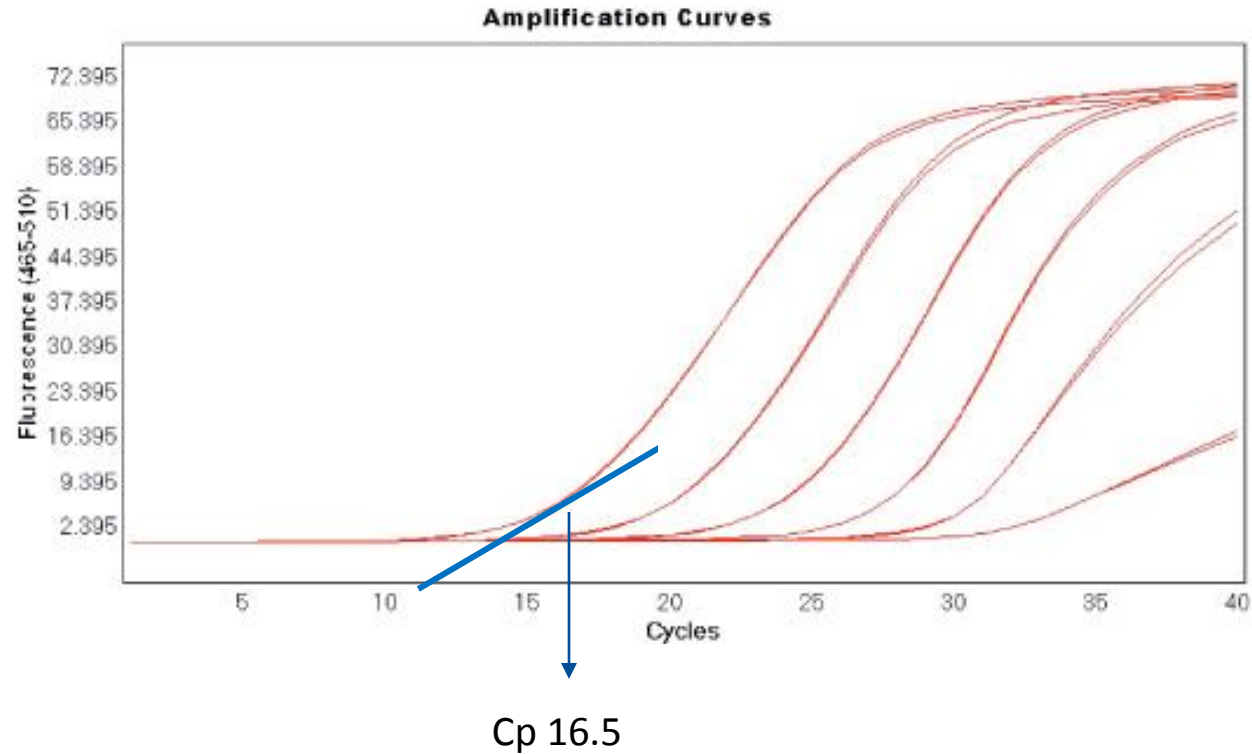
- pathogeen in feces
 - > geen gevriesdroogd materiaal
 - > geen DNA
 - > niet gefixeerd
- hoge kwaliteit: reproduceerbare en stabiele feces-monsters
- uitdagende loads geschikt voor moleculaire diagnostiek



Ct waarden



Cp waarden



Cq waarde = verzamelnaam voor Cp en Ct

Overzicht 2016

	parasiet	correct n (%)	totaal n *	Cq	opmerkingen
2016.1A	<i>G. lamblia</i>	29 (100%)	29	25	
	<i>D. fragilis</i>	27 (100%)	27	32	
2016.1B	<i>E. histolytica</i>	25 (83%)	30	33	(5x fn) (2x fp: <i>G. lamblia</i>)
2016.1C	<i>D. fragilis</i>	26 (96%)	27	34	(1x fn)
2016.2A	<i>G. lamblia</i>	30 (100%)	30	29	
	<i>D. fragilis</i>	26 (100%)	26	33	
2016.2B	<i>D. fragilis</i>	26 (100%)	26	30	
2016.2C	<i>G. lamblia</i>	27 (90%)	30	34	(3x fn)
2016.3A	<i>E. histolytica</i>	27 (87%)	31	35	(4x fn) (1x fp: <i>D. fragilis</i>)
2016.3B	<i>Crypto spp.</i>	29 (97%)	30	31	(1x fn) (1x fp: <i>D. fragilis</i>)
2016.3C	<i>G. lamblia</i>	30 (100%)	30	28	(3x fp: <i>D. fragilis</i>)

*32 deelnemende laboratoria

fn: fout-negatief

fp: fout-positief



Stichting Kwaliteitsbewaking
Medische Laboratoriumdiagnostiek

Sectie Parasitologie

Sensitiviteit 2013-2015

	<i>G.lamblia</i>	N	<i>Crypto spp.</i>	N	<i>E.histolytica</i>	N	<i>D.fragilis</i>	N
2013	99%	85	92%	38	77%	26	nd	-
2014	96%	84	100%	54	83%	52	98%	48
2015	98%	85	96%	57	97%	29	100%	73

n = number of reported results (participants on samples)

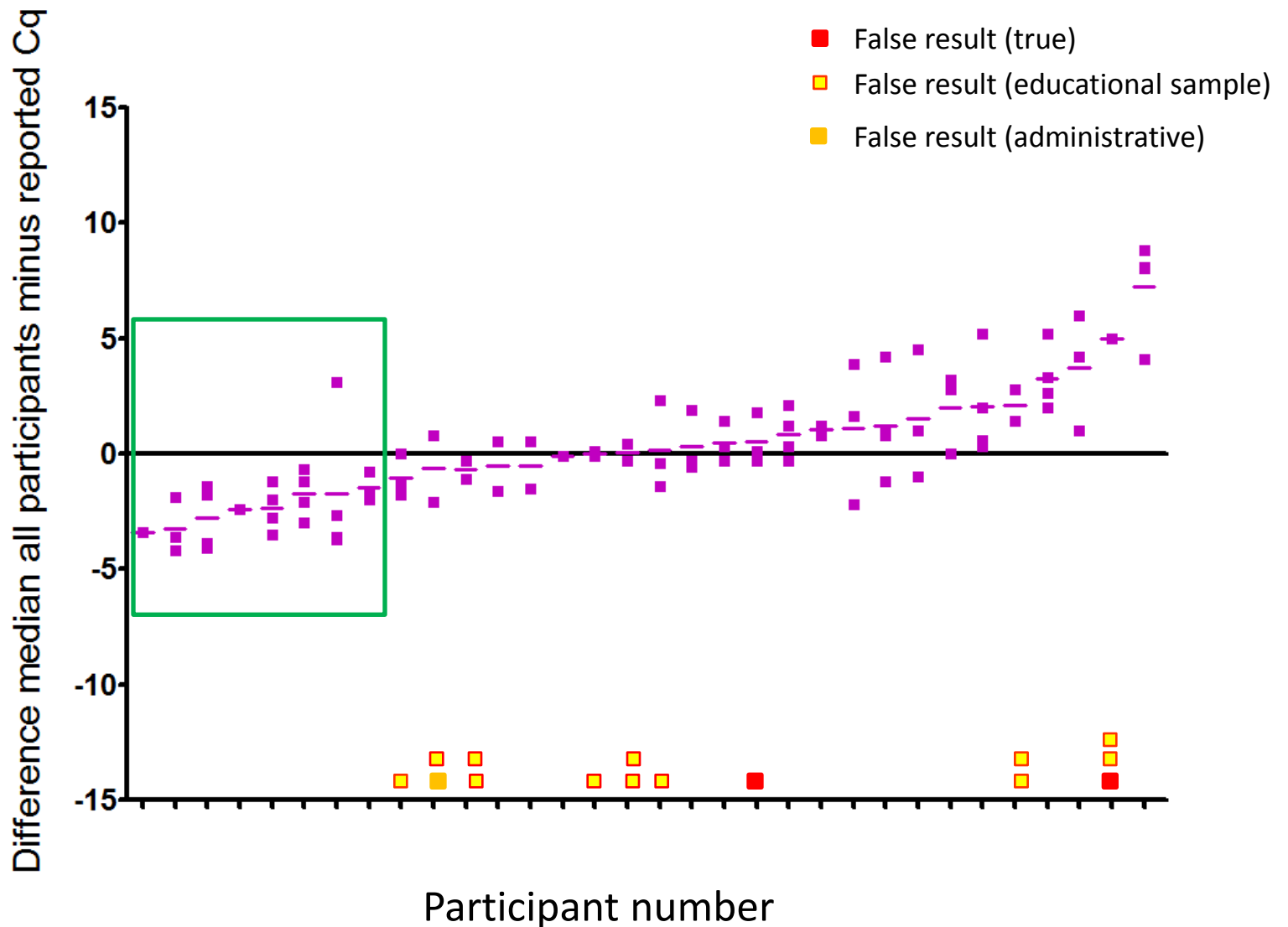
E.histolytica
2016: 85%

relatieve load diarreeverwekkers Izore (2012- 2016)

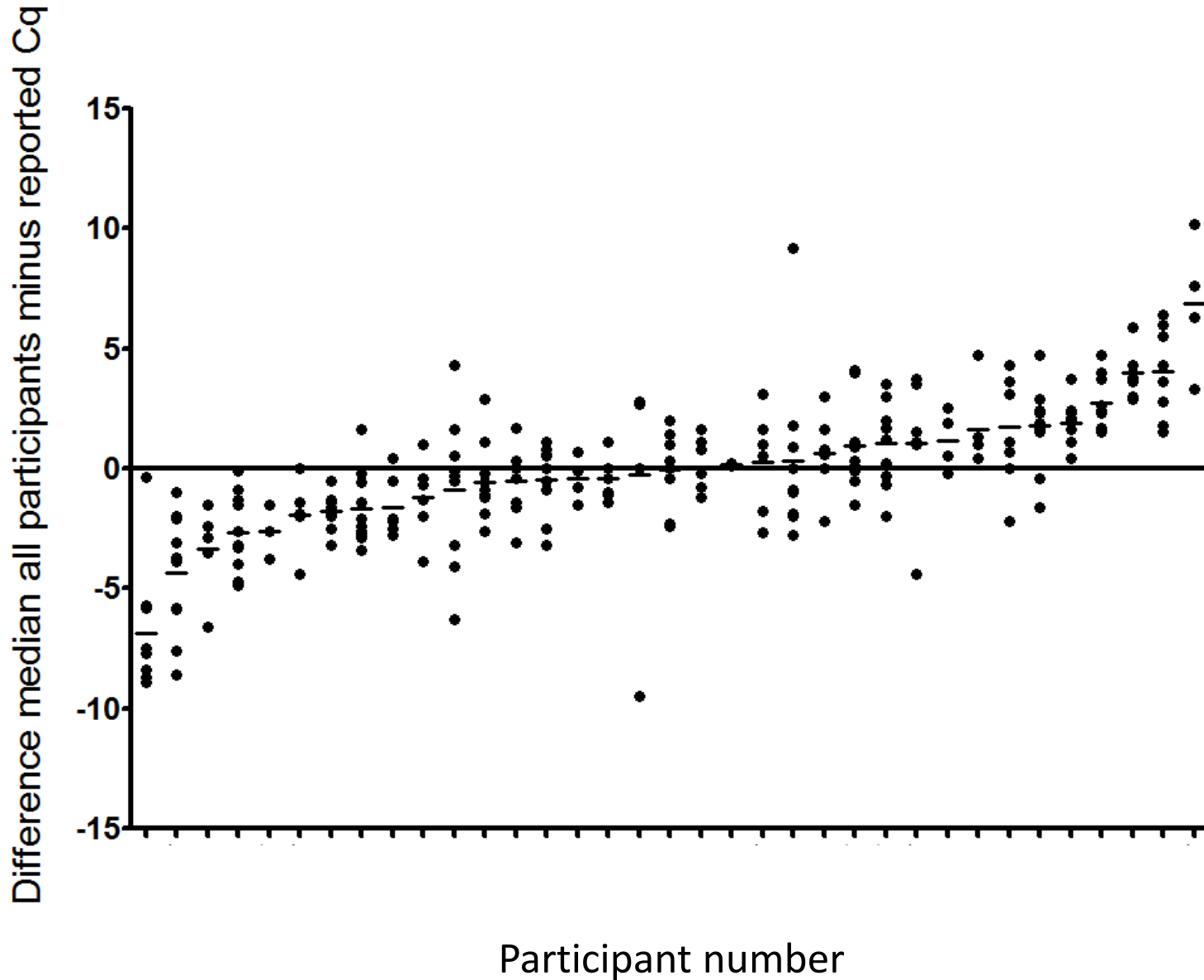
	<i>G.lamblia</i>	n	<i>Cryptosp. spp.</i>	n	<i>E.histolytica</i>	n	<i>D.fragilis</i>*	n
gemiddelde Cp waarde	27.8	929	31.5	401	31.0	17	26.7	80

* *D.fragilis*: alleen 2016

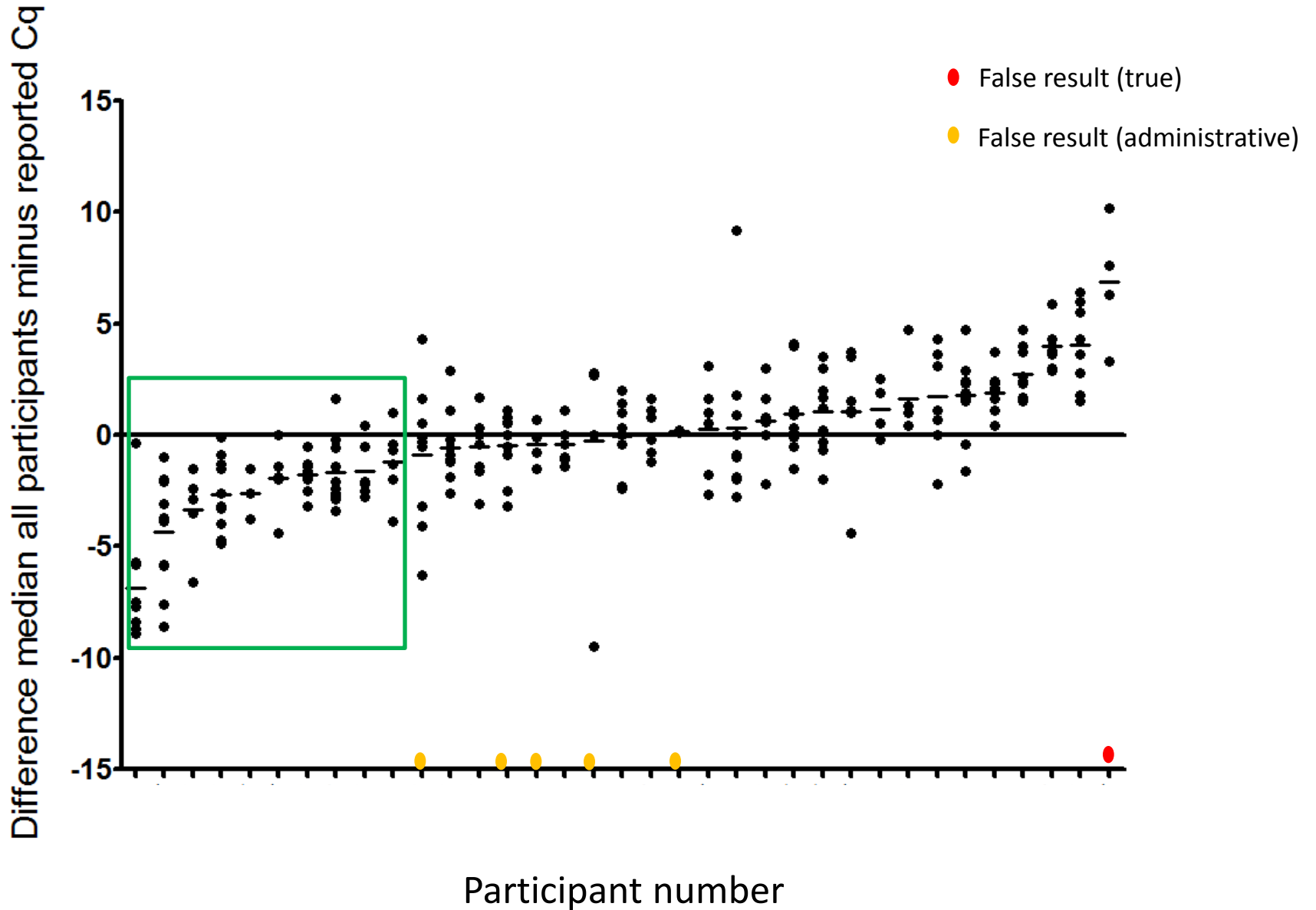
Cq waarden *E.histolytica* per laboratorium, 2013-2015



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



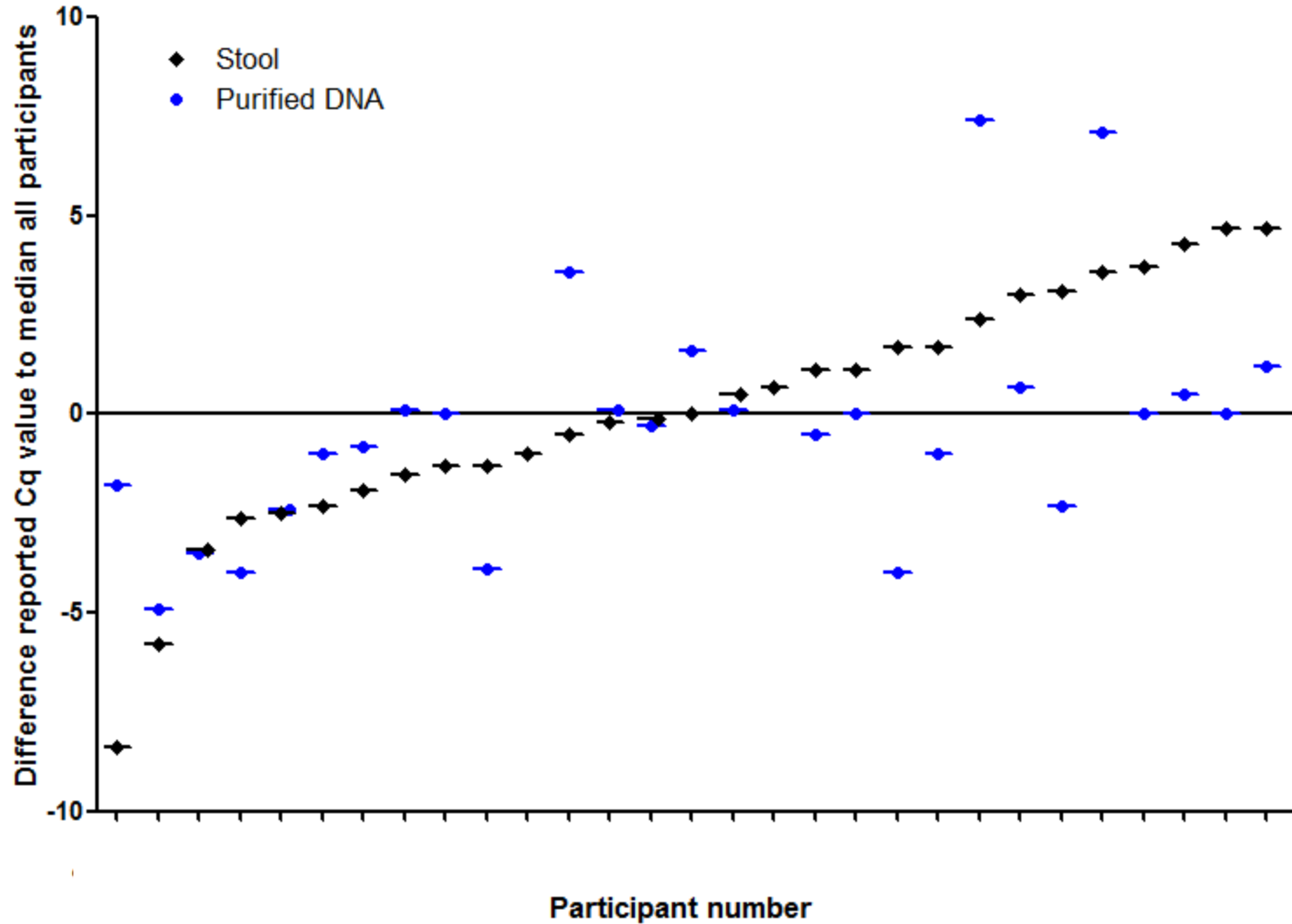
Cq waarden *G.lamblia* per laboratorium, 2013-2015



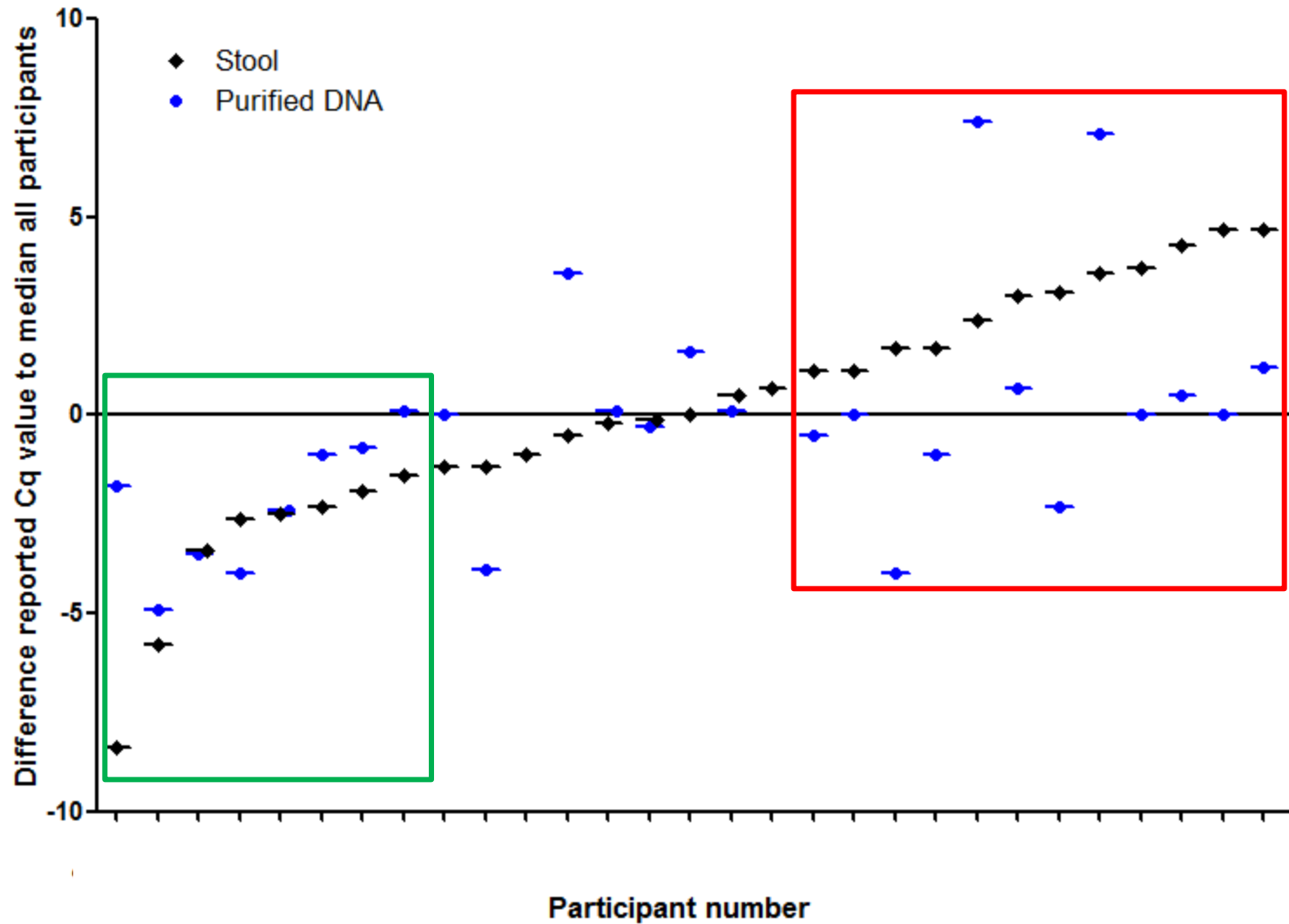
Werkwijze moleculaire diagnostiek intestinale parasieten



G.lamblia uitslagen feces en gezuiverd DNA



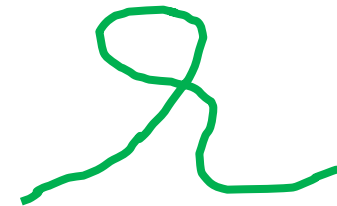
G.lamblia uitslagen feces en gezuiverd DNA



Werkwijze moleculaire diagnostiek intestinale parasieten



G.lamblia :



Werkwijze moleculaire diagnostiek intestinale parasieten

voorbehandeling
feces

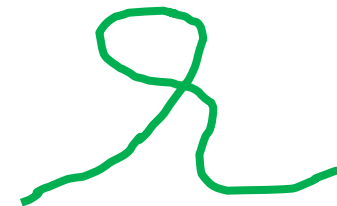
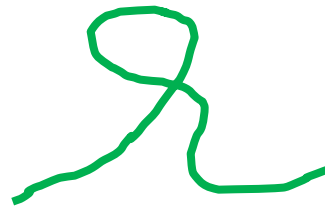


DNA
isolatie



target
amplificatie

G.lamblia :



Verdiepingsvragen voorbehandeling feces

Verdiepingsvragen voorbehandeling feces:

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



G.lamblia : 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

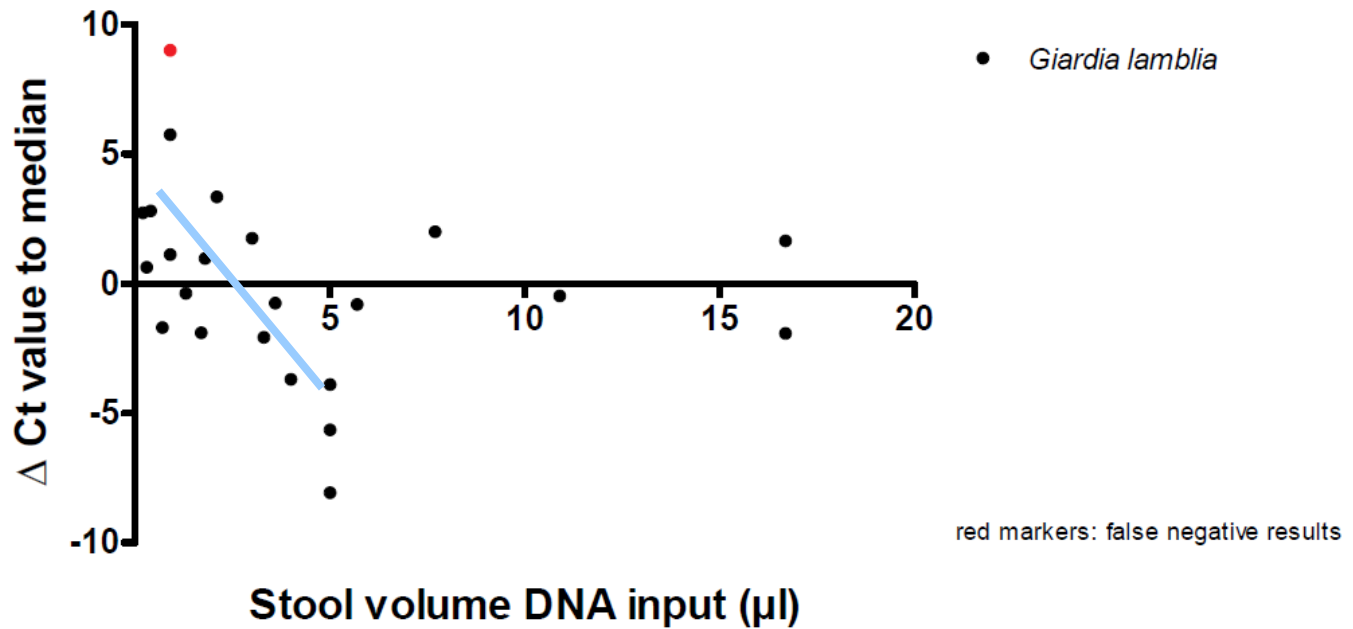
G.lamblia : voorbehandeling feces

ptp	2016.1A		GL		2016.2C		GL		2016.3C		GL		Andere manier voor behandeling DNA-extract	extra "of-board" proteolyse behandeling	lysisbuffer toevoegen voorafgaande aan DNA extractie	Vries-dooi cyclus	Volume feces in PCR
	GL		GL		GL		GL		GL								
	Δ gem	Δ med	Δ gem	Δ med	Δ gem	Δ med	Δ gem	Δ med	Δ gem	Δ med							
	4,2	4,3	3,4	3,0	-1,2	-1,2	5,2	4,8				ja	nee	ja	ja	0,2	
	2,8	2,9	0,0	-0,4	0,5	0,5	-0,1	-0,5				nee	nee	ja	ja	0,3	
	2,2	2,3	3,2	2,8	3,5	3,5	3,0	2,6				nee	ja	ja	nee	0,4	
	-2,8	-2,8	1,4	1,0	-2,1	-2,1	-2,5	-2,9				nee	nee	ja	ja	0,7	
	2,8	2,9	0,4	0,0	-0,9	-0,9	2,9	2,5				nee	nee	ja	nee	0,9	
	6,9	7,0					4,9	4,5				nee	nee	ja	ja	0,9	
	-0,1	0,0	-2,0	-2,4	0,6	0,6	0,7	0,3				nee	nee	ja	ja	1,3	
	-2,3	-2,3	-1,4	-1,8	0,3	0,3	-3,4	-3,8				nee	nee	ja	ja	1,7	
			1,4	1,0	0,9	0,9	1,4	1,0				nee	nee	ja	ja	1,8	
	2,9	3,0	2,5	2,1	4,5	4,5	4,2	3,8				ja	nee	ja	nee	2,1	
	2,9	3,0	1,3	0,9	-0,3	-0,3	3,8	3,4				nee	nee	ja	nee	3	
	1,5	1,6	-0,6	-1,0	-6,5	-6,5	-2,0	-2,4				nee	nee	ja	ja	3,3	
	-1,7	-1,7	-2,2	-2,6	2,1	2,1	-0,4	-0,8				ja	nee	ja	ja	3,6	
	-2,7	-2,7				-34,9	-4,3	-4,7				ja	nee	ja	nee	4	
	-3,7	-3,7	-3,4	-3,8	-5,3	-5,3	-2,4	-2,8				nee	nee	nee	nee	5	
	-6,7	-6,7	-1,9	-2,3	-4,3	-4,3	-8,9	-9,3				nee	nee	ja	ja	5	
	-7,8	-7,8	-9,5	-9,9	-8,2	-8,2	-6,0	-6,4				nee	nee	nee	ja	5	
	-1,7	-1,7	2,7	2,3	-3,1	-3,1	-0,3	-0,7				nee	nee	ja	nee	5,7	
	1,5	1,6	1,6	1,2	2,0	2,0	3,6	3,2				nee	nee	ja	nee	7,7	
	0,0	0,1	-0,8	-1,2	-1,5	-1,5	1,1	0,7				nee	nee	ja	ja	10,9	
	-2,7	-2,7	-3,1	-3,5	-0,3	-0,3	-0,8	-1,2				ja	nee	nee	nee	16,7	
	2,2	2,3	3,7	3,3	1,0	1,0	0,4	0,0				nee	nee	ja	ja	16,7	

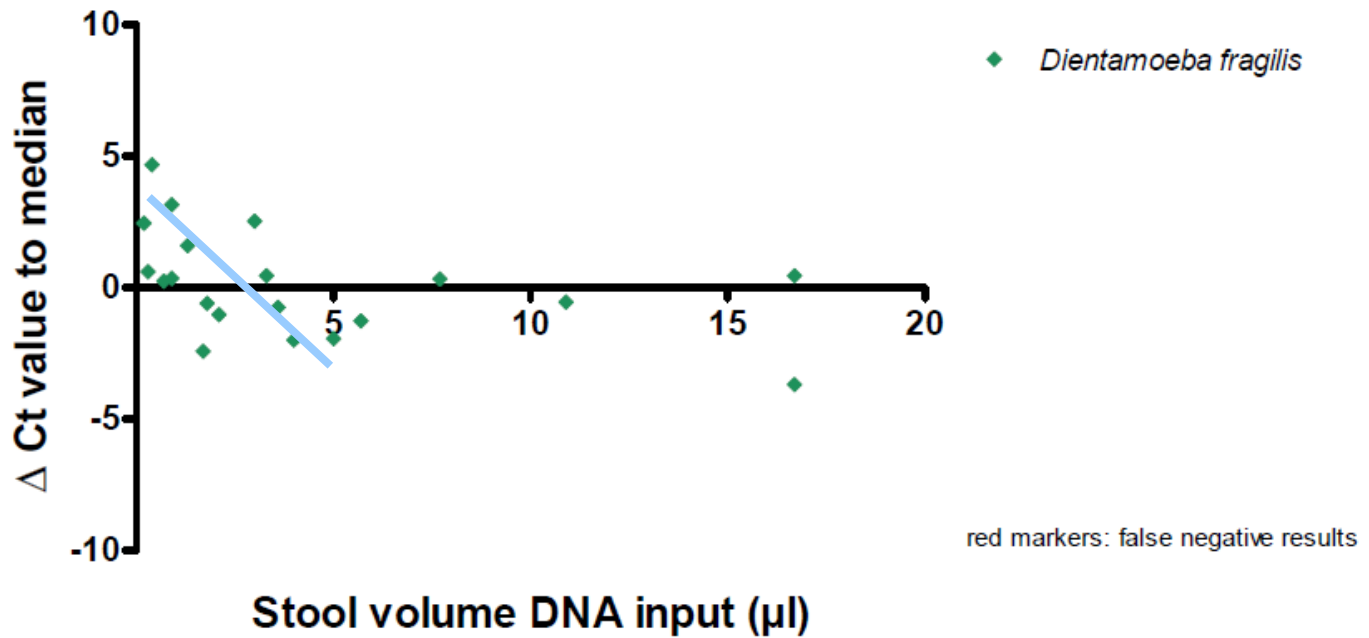
G.lamblia : voorbehandeling feces

ptp	2016.1A		GL		2016.2C		GL		2016.3C		GL		Andere manier voor behandeling DNA-extract	extra "of-board" proteolyse behandeling	lysisbuffer toevoegen voorafgaande aan DNA extractie	Vries-dooi cyclus	Volume feces in PCR
	GL		GL		GL		GL		GL								
	Δ gem	Δ med	Δ gem	Δ med	Δ gem	Δ med	Δ gem	Δ med	Δ gem	Δ med							
	4,2	4,3	3,4	3,0	-1,2	-1,2	5,2	4,8	ja	nee	ja	ja	nee	ja	ja	0,2	
	2,8	2,9	0,0	-0,4	0,5	0,5	-0,1	-0,5	nee	nee	ja	ja	nee	ja	nee	0,3	
	2,2	2,3	3,2	2,8	3,5	3,5	3,0	2,6	nee	ja	ja	nee	nee	nee	nee	0,4	
	-2,8	-2,8	1,4	1,0	-2,1	-2,1	-2,5	-2,9	nee	nee	ja	ja	nee	ja	ja	0,7	
	2,8	2,9	0,4	0,0	-0,9	-0,9	2,9	2,5	nee	nee	ja	nee	nee	nee	nee	0,9	
	6,9	7,0					4,9	4,5	nee	nee	ja	ja	nee	ja	ja	0,9	
	-0,1	0,0	-2,0	-2,4	0,6	0,6	0,7	0,3	nee	nee	ja	ja	nee	ja	ja	1,3	
	-2,3	-2,3	-1,4	-1,8	0,3	0,3	-3,4	-3,8	nee	nee	ja	ja	nee	ja	ja	1,7	
			1,4	1,0	0,9	0,9	1,4	1,0	nee	nee	ja	ja	nee	ja	ja	1,8	
	2,9	3,0	2,5	2,1	4,5	4,5	4,2	3,8	ja	nee	ja	nee	nee	nee	nee	2,1	
	2,9	3,0	1,3	0,9	-0,3	-0,3	3,8	3,4	nee	nee	ja	nee	nee	nee	nee	3	
	1,5	1,6	-0,6	-1,0	-6,5	-6,5	-2,0	-2,4	nee	nee	ja	ja	nee	ja	ja	3,3	
	-1,7	-1,7	-2,2	-2,6	2,1	2,1	-0,4	-0,8	ja	nee	ja	ja	nee	ja	ja	3,6	
	-2,7	-2,7				-34,9	-4,3	-4,7	ja	nee	ja	nee	nee	nee	nee	4	
	-3,7	-3,7	-3,4	-3,8	-5,3	-5,3	-2,4	-2,8	nee	nee	nee	nee	nee	nee	nee	5	
	-6,7	-6,7	-1,9	-2,3	-4,3	-4,3	-8,9	-9,3	nee	nee	ja	ja	nee	ja	ja	5	
	-7,8	-7,8	-9,5	-9,9	-8,2	-8,2	-6,0	-6,4	nee	nee	nee	ja	nee	ja	ja	5	
	-1,7	-1,7	2,7	2,3	-3,1	-3,1	-0,3	-0,7	nee	nee	ja	nee	nee	nee	nee	5,7	
	1,5	1,6	1,6	1,2	2,0	2,0	3,6	3,2	nee	nee	ja	nee	nee	nee	nee	7,7	
	0,0	0,1	-0,8	-1,2	-1,5	-1,5	1,1	0,7	nee	nee	ja	ja	nee	ja	ja	10,9	
	-2,7	-2,7	-3,1	-3,5	-0,3	-0,3	-0,8	-1,2	ja	nee	nee	nee	nee	nee	nee	16,7	
	2,2	2,3	3,7	3,3	1,0	1,0	0,4	0,0	nee	nee	ja	ja	nee	ja	ja	16,7	

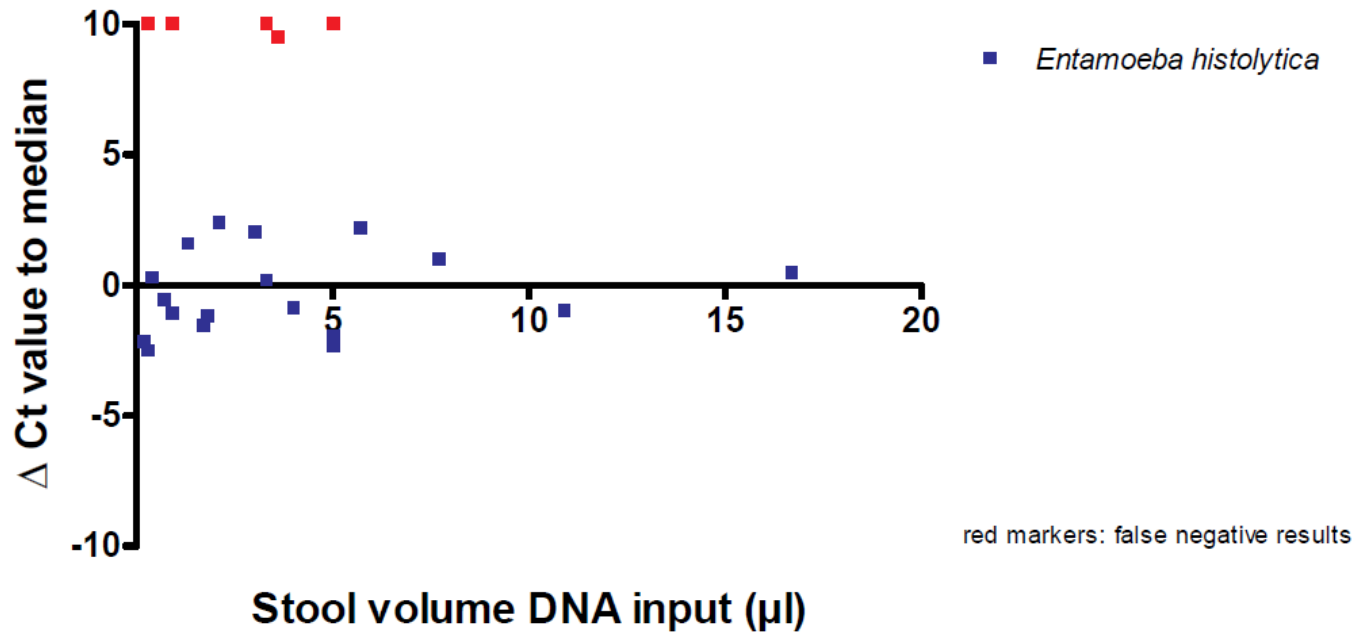
G.lamblia : input PCR



D. fragilis : input PCR



E. histolytica : input PCR



Samenvattend moleculaire rondzendingen feces-parasieten

Huidig:

- 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

2017:

- gezuiverd DNA rondsturen (voorrang *E.histolytica*)



Stichting Kwaliteitsbewaking
Medische Laboratoriumdiagnostiek

Sectie Parasitologie

overzicht *Trichomonas vaginalis* 2016

	parasiet	correct n (%)	totaal n	Cq (spreiding)	opmerkingen
2016.1A	negatief	31 (100%)	31	-	
2016.1B	<i>T. vaginalis</i>	19 (61%)	31	37 (33-40)	(11x fout neg.)
2016.1C	<i>T. vaginalis.</i>	27 (87%)	31	36 (30-40)	(3x fout neg.)
2016.2A	<i>T. vaginalis</i>	25 (86%)	29	34 (32-38)	(4x fout neg.)
2016.2B	<i>T. vaginalis</i>	26 (90%)	29	35 (28-40)	(3x fout neg.)
2016.2C	negatief	29	29	-	

overzicht *Trichomonas vaginalis* 2016

2016.1A	2016.1B				2016.1C				2016.2A				2016.2B				2016.2C
	TV	Δ gem ref	Δ gem	Δ med	TV	Δ gem ref	Δ gem	Δ med	TV	Δ gem ref	Δ gem	Δ med	TV	Δ gem ref	Δ gem	Δ med	
neg	37,3	2,0	-0,2	0,0	35,9	1,5	0,3	0,0	32,2	-1,9	-2,3	-1,8	32,3	-2,2	-2,6	-2,2	neg
neg	neg				neg				neg				neg				neg
neg	35,8	0,5	-1,7	-1,5	34,2	-0,2	-1,4	-1,7	33	-1,1	-1,5	-1,0	33,6	-0,9	-1,3	-0,9	neg
neg	mis				mis				pos				pos				neg
neg	pos				pos				pos				pos				neg
neg	neg				pos				37,6	3,2	2,0	1,7	37	2,5	2,1	2,5	neg
neg	neg				neg				neg				neg				neg
neg	neg				37,6	3,2	2,0	1,7	37,6	3,5	3,1	3,6	39,5	5,0	4,6	5,0	neg
neg	neg				37,7	3,3	2,1	1,8	pos				pos				neg
neg	neg				neg				neg				28,2	-6,3	-6,7	-6,3	neg
neg	32,9	-2,4	-4,6	-4,4	30,2	-4,2	-5,4	-5,7	neg				34	-0,5	-0,9	-0,5	neg
neg	36,5	1,2	-1,0	-0,8	35,9	1,5	0,3	0,0	33	-1,1	-1,5	-1,0	33,4	-1,1	-1,5	-1,1	neg
neg	neg				35,0	0,6	-0,6	-0,9	33,6	-0,5	-0,9	-0,4	37,1	2,6	2,2	2,6	neg
neg	37,2	1,9	-0,3	-0,1	40	5,6	4,4	4,1	34	-0,1	-0,5	0,0	neg				neg
neg	39,4	4,1	1,9	2,1	36,5	2,1	0,9	0,6	neg				35,5	1,0	0,6	1,0	neg
neg	36,9	1,6	-0,6	-0,4	35,8	1,4	0,2	-0,1	33,8	-0,3	-0,7	-0,2	38,1	3,6	3,2	3,6	neg
neg	39,2	3,9	1,7	1,9	35,9	1,5	0,3	0,0	35,3	1,2	0,8	1,3	pos				neg
neg	neg				pos				neg				pos				neg
neg	pos				pos				pos				pos				neg
neg	neg				35,4	1,0	-0,2	-0,5	35,8	1,7	1,3	1,8	36	1,5	1,1	1,5	neg
neg	40	4,7	2,5	2,7	37,6	3,2	2,0	1,7	35,2	1,1	0,7	1,2	36,2	1,7	1,3	1,7	neg
neg	neg				36,0	1,6	0,4	0,1	33,4	-0,7	-1,1	-0,6	33,6	-0,9	-1,3	-0,9	neg
neg	37,6	2,3	0,1	0,3	34,4	0,0	-1,2	-1,5	34	-0,1	-0,5	0,0	32	-2,5	-2,9	-2,5	neg
neg	37,3	2,0	-0,2	0,0	34,3	-0,1	-1,3	-1,6	32,4	-1,7	-2,1	-1,6	37,9	3,4	3,0	3,4	neg
neg	neg				35,9	1,5	0,3	0,0	35,9	1,8	1,4	1,9	neg				neg
neg	38,5	3,2	1,0	1,2	35,7	1,3	0,1	-0,2	34,1	0,0	-0,4	0,1	36,1	1,6	1,2	1,6	neg
neg	38,4	3,1	0,9	1,1	37,1	2,7	1,5	1,2	36	1,9	1,5	2,0	34,4	-0,1	-0,5	-0,1	neg
neg	pos				pos				pos				pos				neg
neg	38,8	3,5	1,3	1,5	34,0	-0,4	-1,6	-1,9	32,6	-1,5	-1,9	-1,4	32,9	-1,6	-2,0	-1,6	neg
neg	36,0	0,7	-1,5	-1,3	32,0	-2,4	-3,6	-3,9	36,9	2,8	2,4	2,9	34,5	0,0	-0,4	0,0	neg
									pos				pos				neg



overzicht *Trichomonas vaginalis* 2016

	parasiet	correct n (%)	totaal n	Cq (spreiding)	opmerkingen
2016.1A	negatief	31 (100%)	31	-	
2016.1B	<i>T. vaginalis</i>	19 (61%)	31	37 (33-40)	(11x fout neg.)
2016.1C	<i>T. vaginalis.</i>	27 (87%)	31	36 (30-40)	(3x fout neg.)
2016.2A	<i>T. vaginalis</i>	25 (86%)	29	34 (32-38)	(4x fout neg.)
2016.2B	<i>T. vaginalis</i>	26 (90%)	29	35 (28-40)	(3x fout neg.)
2016.2C	negatief	29	29	-	

Samenvattend:

- duidelijke relatie tussen relatieve load en aantal fout-negatieve resultaten
- enorme spreiding Cq waarden

2017:

- Deelnemers bevragen op gebruikte methoden/apparatuur

