

Moleculaire diagnostiek van darmparasieten; de waarde van kwaliteitsrondzendingen

Jaap van Hellemond, parasitoloog

Erasmus MC & Havenziekenhuis, Rotterdam

Theo Schuurs, moleculair bioloog

Izore, Centrum Infectieziekten Friesland, Leeuwarden

Moleculaire diagnostiek in de parasitologie

Toename van :

- aantal toepassingen
- aantal laboratoria dat van Mol. Diagnostiek gebruikt maakt



Stichting Kwaliteitsbewaking
Medische Laboratoriumdiagnostiek

Sectie Parasitologie

2013: Introductie fecespanel voor Mdx

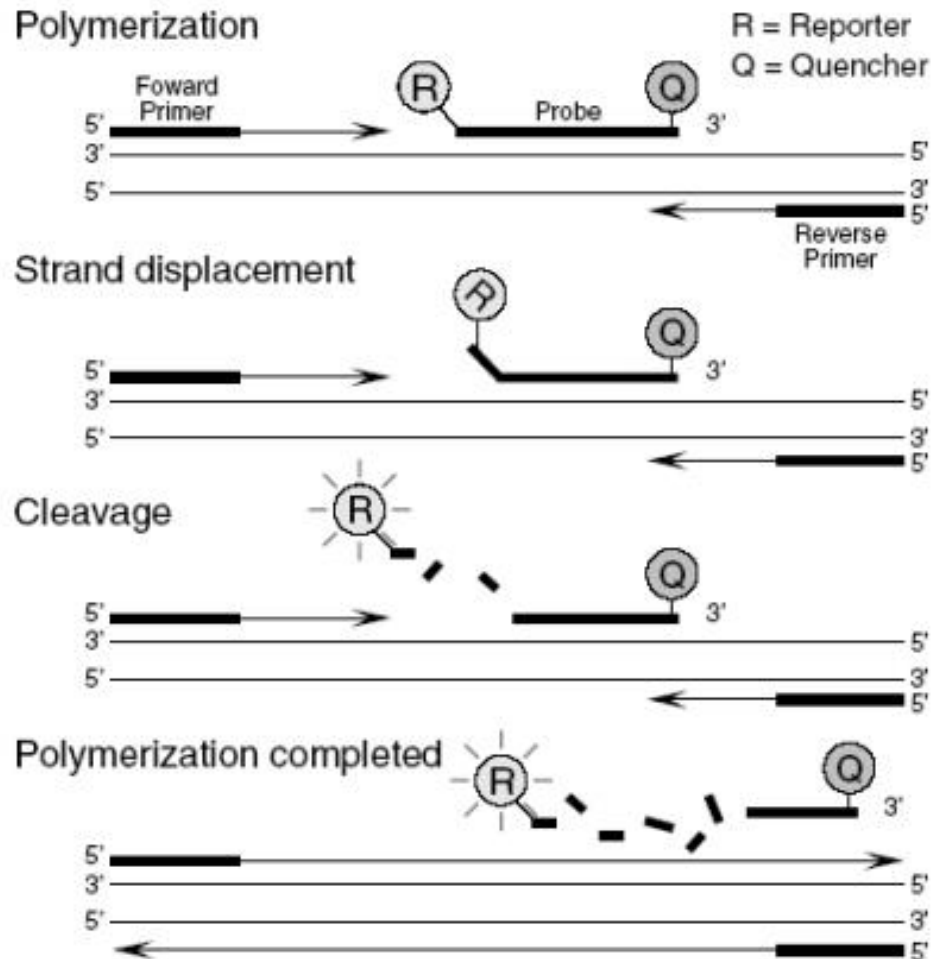
SKML-parasitologie

Voorwaarden rondzending:

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

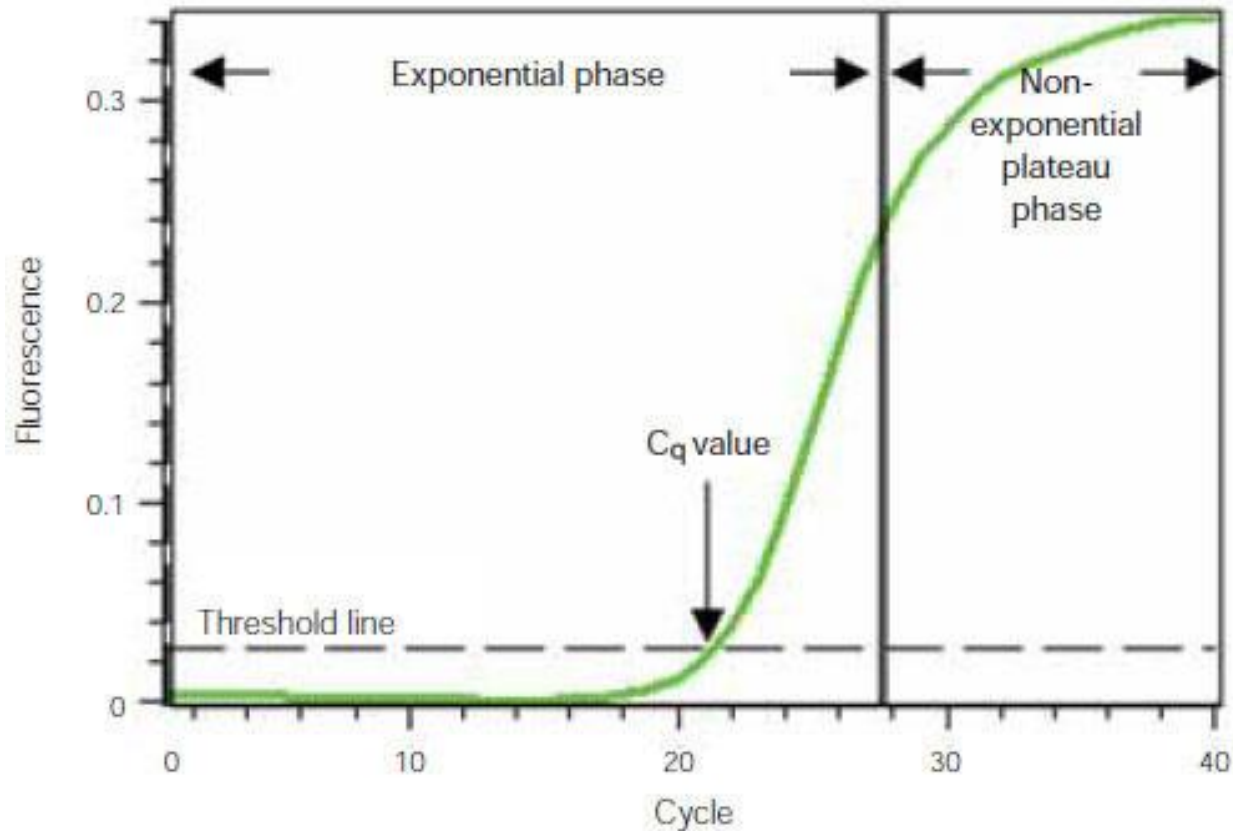


Real time PCR product (light cycler)



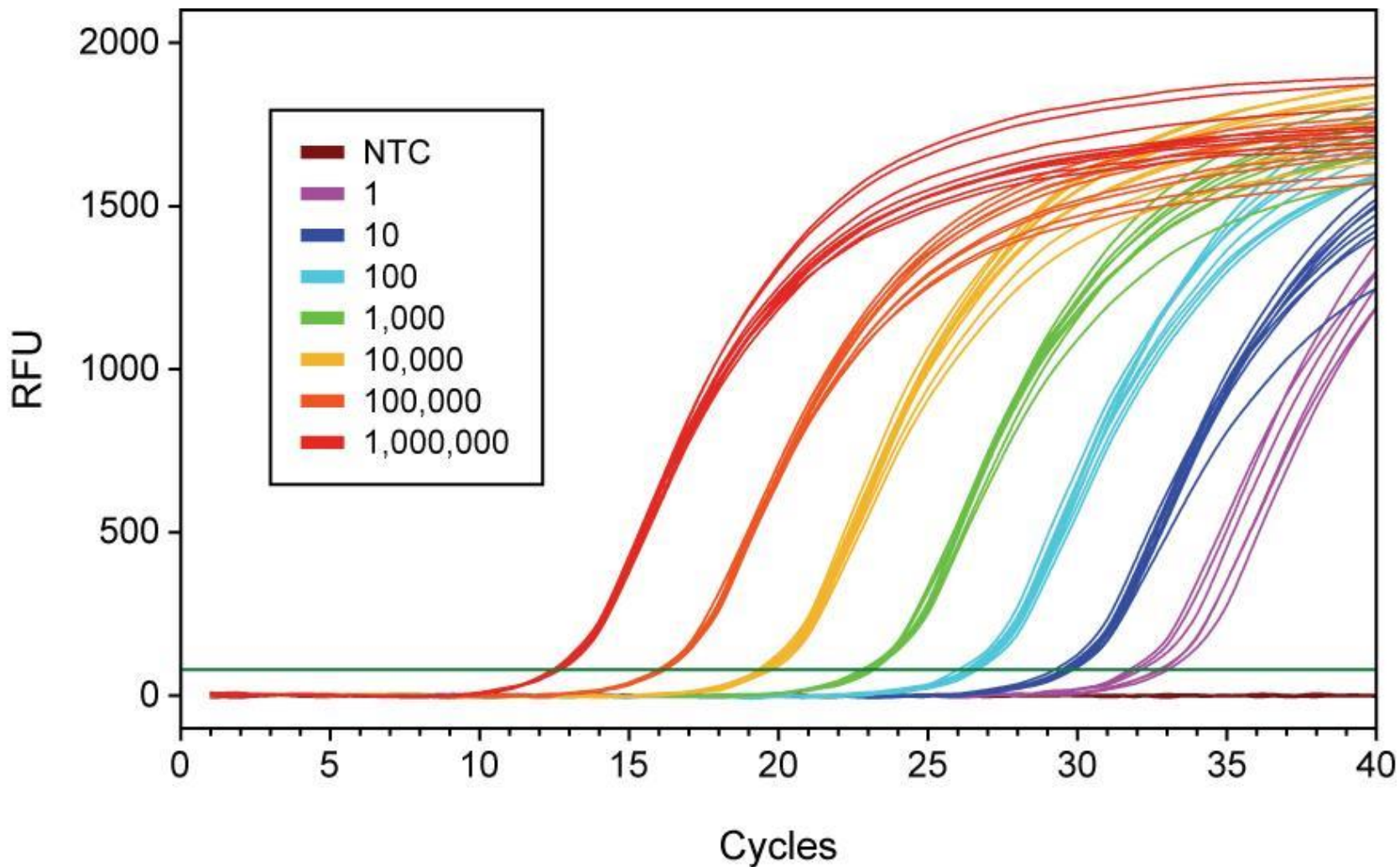
- Niet alleen DNA primers, maar ook fluorescente probes
- Fluorescentie ontstaat als target DNA vermeerderd wordt

Real time PCR product (light cycler)

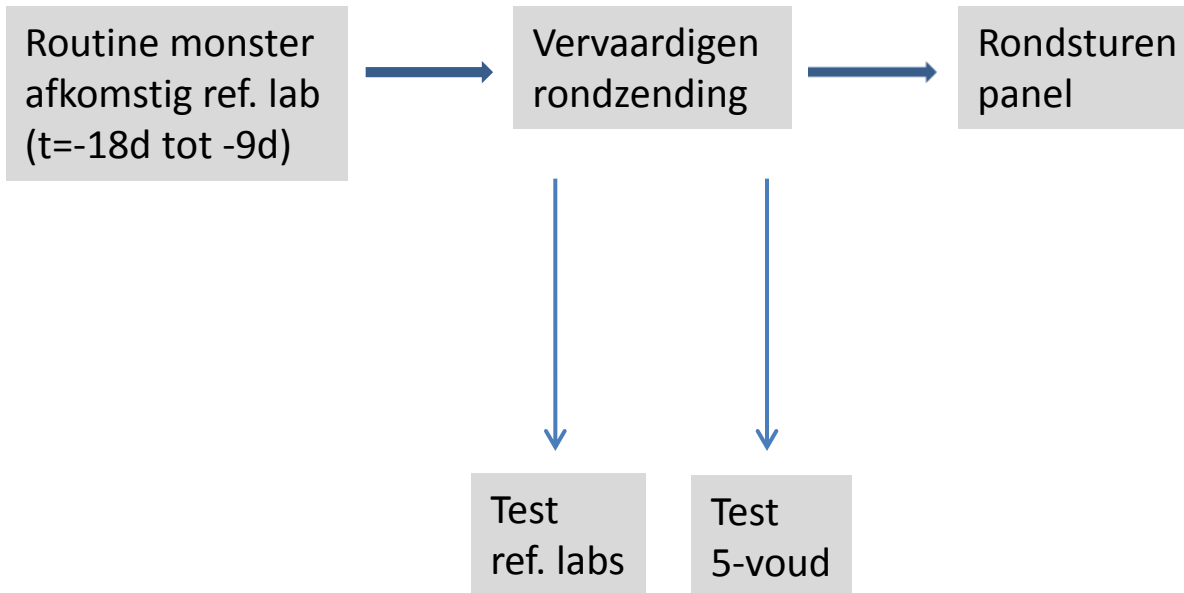


C_q (C_p or C_t) waarde is aantal cycli dat nodig is voor signaal > grenswaarde

Verband target DNA & Cq waarde



Workflow materiaal moleculair panel (SKML-parasitologie)

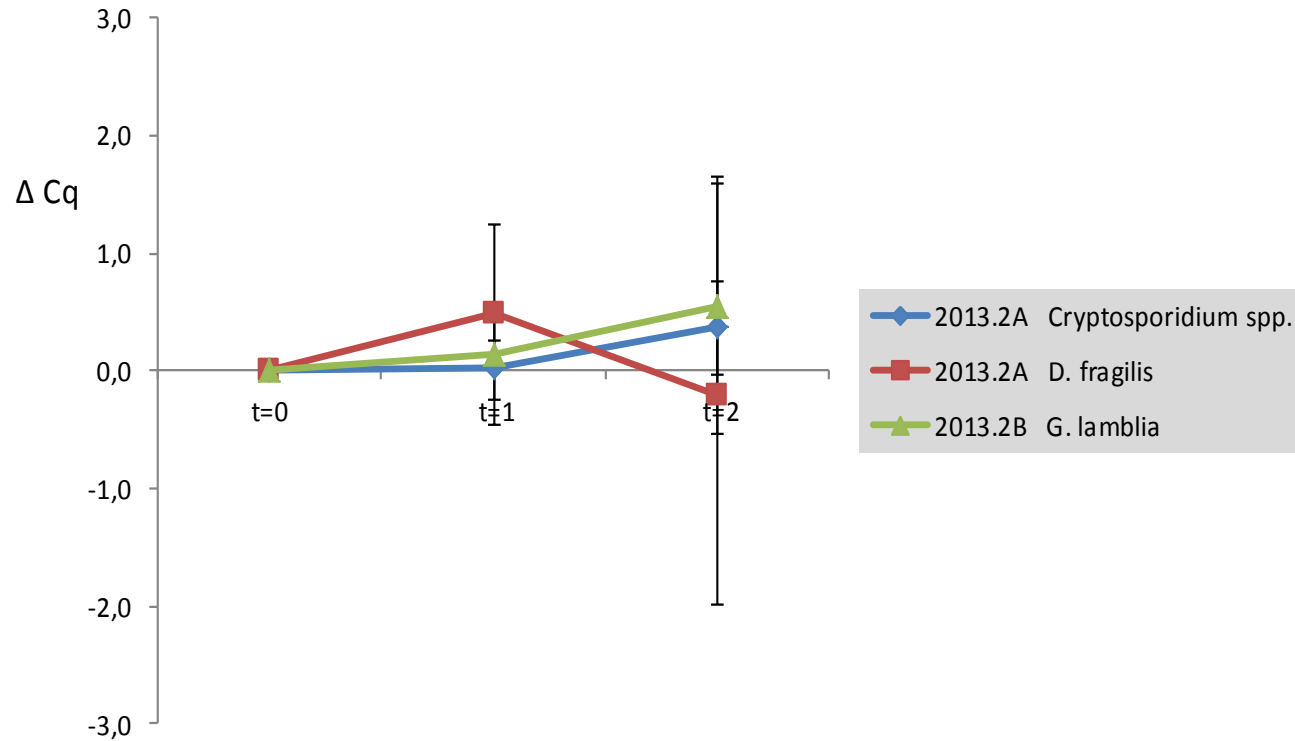


Kwaliteitscontrole: documentatie

	Rondzending feces PCR SKML 3e en 4e rondzending 2012															
Nummer	FMB-17				FMB-20				FMB-23				FMB-24			
Materiaal	feces				feces				feces				feces PBS			
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				37,3			
	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			
Geschikt voor rondzending	ja				ja				ja				ja			
Opmerking																
Nummer rondzending	2012-3E				2012-3E				2012.4.E				2012.4.F			
Datum rondzending									13-11-2012				13-11-2012			
Casus									2012.4				2012.4			



Stabiliteit materiaal (na 14 dagen kamertemp.)



Overzicht resultaten 2014

Ronde		Parasieten
2014-1	A	<i>E. histolytica</i>
	B	<i>Cryptosporidium</i> spp
2014-2	A	<i>G. lamblia</i>
	B	<i>G. lamblia</i>
2014-3	A	<i>Cryptosporidium</i> spp
	B	<i>D. fragilis</i>
2014-4	A	<i>E. histolytica</i>
	B	<i>G. lamblia</i> + <i>D. fragilis</i>

Overzicht resultaten 2014

Ronde		Parasieten	Aantal max scores /aantal inzenders
2014-1	A	<i>E. histolytica</i>	21/29 (72%) *
	B	<i>Cryptosporidium</i> spp	27/27 (100%) ● 1 GL
2014-2	A	<i>G. lamblia</i>	30/30 (100%) ● 2 Df
	B	<i>G. lamblia</i>	30/30 (100%)
2014-3	A	<i>Cryptosporidium</i> spp	29/29 (100%) ● 1 GL
	B	<i>D. fragilis</i>	27/27 (100%)
2014-4	A	<i>E. histolytica</i>	29/32 (91%) *,●, ▲ 2GL,1Df
	B	<i>G. lamblia</i> + <i>D. fragilis</i>	28/31 (90%) 26/27 (96%) ●, ▲ 1 Eh

Overzicht resultaten 2014

Ronde		Parasieten	Aantal max scores /aantal inzenders
2014-1	A	<i>E. histolytica</i>	21/29 (72%) *
	B	<i>Cryptosporidium</i> spp	27/27 (100%) ● 1 GL
2014-2	A	<i>G. lamblia</i>	30/30 (100%) ● 2 Df
	B	<i>G. lamblia</i>	30/30 (100%)
2014-3	A	<i>Cryptosporidium</i> spp	29/29 (100%) ● 1 GL
	B	<i>D. fragilis</i>	27/27 (100%)
2014-4	A	<i>E. histolytica</i>	29/32 (91%) *,●, ▲ 2GL,1Df
	B	<i>G. lamblia</i> + <i>D. fragilis</i>	28/31 (90%) 26/27 (96%) ●, ▲ 1 Eh

2014.1A: lage parasieten load (gem. Cq waarde 37): geen punten

Overzicht resultaten 2014

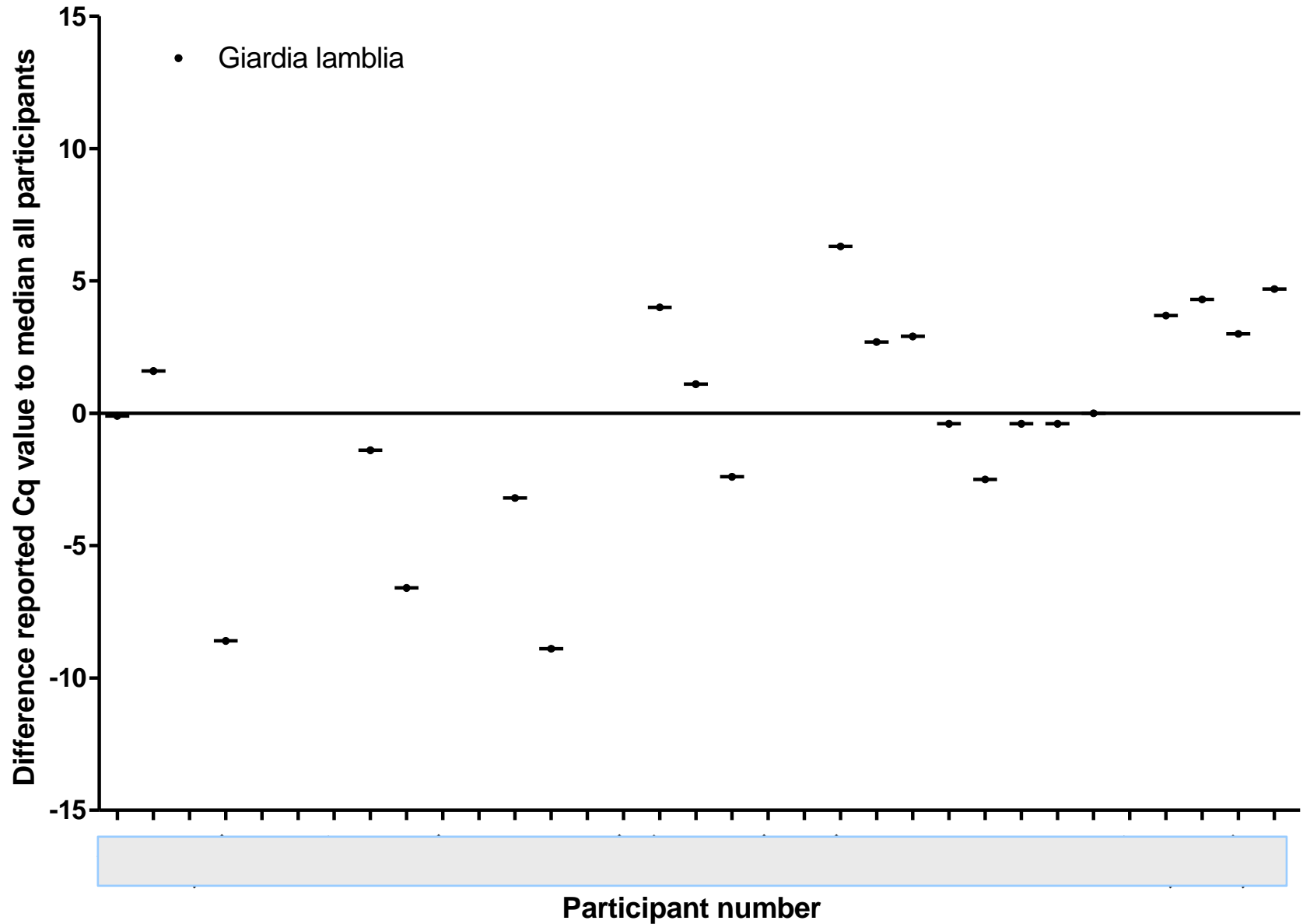
Ronde		Parasieten	Aantal max scores /aantal inzenders
2014-1	A	<i>E. histolytica</i>	21/29 (72%) *
	B	<i>Cryptosporidium</i> spp	27/27 (100%) ● 1 GL
2014-2	A	<i>G. lamblia</i>	30/30 (100%) ● 2 Df
	B	<i>G. lamblia</i>	30/30 (100%)
2014-3	A	<i>Cryptosporidium</i> spp	29/29 (100%) ● 1 GL
	B	<i>D. fragilis</i>	27/27 (100%)
2014-4	A	<i>E. histolytica</i>	29/32 (91%) *,●, ▲ 2GL,1Df
	B	<i>G. lamblia</i> + <i>D. fragilis</i>	28/31 (90%) 26/27 (96%) ●, ▲ 1 Eh

5 van de 8 materialen: 100 % score voor target
 fout negatieve resultaten *E. histolytica* in 2014.1A en 4A (*)
 Enkele malen materiaal verwisseling (▲)
 Enkele malen fout negatief of fout positief (●)

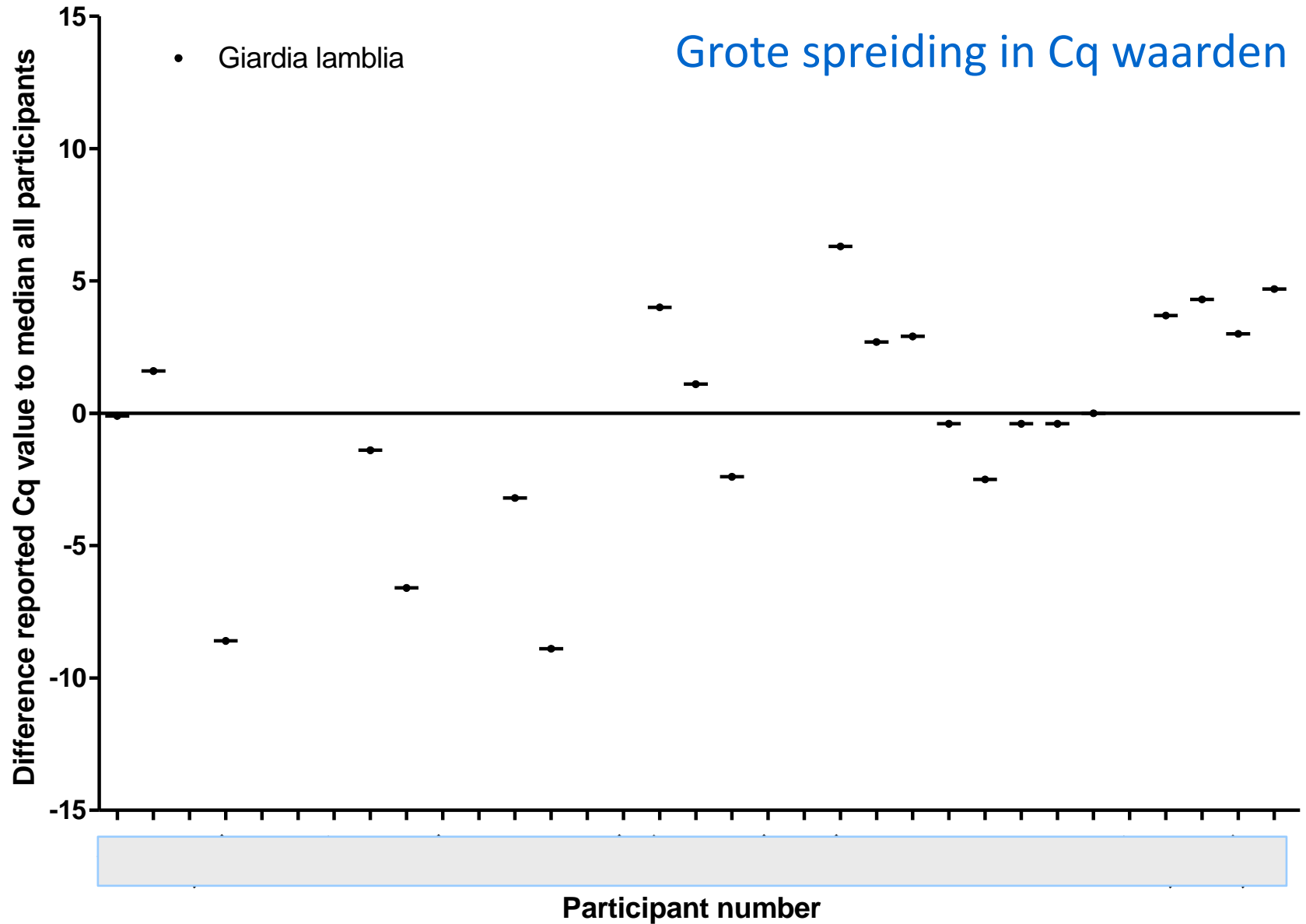
Analyse gegevens 2013 en 2014

<i>Cryptosporidium spp.</i>								
ptp	Bepaling	Apparaat	Methode	2013.1 A	delta Ct	2013.2 A	delta Ct	
	CR PCR	Qiagen (QIA symphony)	overig	34,0	-1,3	31,7	-0,3	
	CR PCR	Roche (Magnapure)	Oocyst wall protein (Guy 2003)			pos		
	CR PCR	Roche (Magnapure)	overig	41,1	5,8	37,8	5,8	
	CR PCR	Biomerieux (easyMag)	SSU rRNA in house	35,1	-0,2	31,1	-0,9	
	CR PCR	Biomerieux (easyMag)	overig	40,0	4,7	pos		
	CR PCR	Roche (Magnapure)	DNAJ-lik protein (Bruijnestein 2009)	36,5	1,2	33,2	1,2	
	CR PCR	Overig	overig					
	CR PCR	Qiagen (QIA symphony)	overig	neg		33,9	1,9	
	CR PCR	Roche (Magnapure)	DNAJ-like protein (Verweij 2004 JCM)					
	CR PCR	Roche (Magnapure)	SSU rRNA (Verweij 2004 JCM)	neg		34,0	2,0	
	CR PCR	Biomerieux (easyMag)	Oocyst wall protein (Guy 2003)	40,0	4,7	37,0	5,0	
	CR PCR	Roche (Magnapure)	Light Mix Kit (TIB MOLBIOL)					
	CR PCR	Biomerieux (easyMag)	DNAJ-like protein (Verweij 2004 JCM)					
	CR PCR	Biomerieux (easyMag)	SSU rRNA (Verweij 2004 JCM)	34,6	-0,7	31,7	-0,3	
	CR PCR	Qiagen (Stool kit mini)	overig	34,1	-1,2	29,1	-2,9	
	CR PCR	Overig	SSU rRNA (Verweij 2004 JCM)	35,8	0,5	34,6	2,6	
	CR PCR	Qiagen (QIA symphony)	DNAJ-like protein (Verweij 2004 JCM)					
	CR PCR	Qiagen (QIA symphony)	Oocyst wall protein (Guy 2003)	32,9	-2,4	28,5	-3,5	
	CR PCR	Qiagen (Stool kit mini)	overig	32,5	-2,8	25,1	-6,9	
	CR PCR	Roche (Magnapure)	overig					
	CR PCR	Qiagen (QIA symphony)	overig	neg		30,2	-1,8	
	CR PCR	Roche (Magnapure)	overig					
	CR PCR	Overig	overig	neg		neg		
	CR PCR	Overig	overig	31,0	-4,3	28,4	-3,6	
	CR PCR	Roche (Magnapure)	DNAJ-lik protein (Bruijnestein 2009)	34,9	-0,4			
	CR PCR	Biomerieux (easyMag)	overig	39,0	3,7	34,2	2,2	
	CR PCR	Biomerieux (easyMag)	SSU rRNA (Verweij 2004 JCM)	40,3	5,0	34,0	2,0	
	CR PCR	Roche (Magnapure)	DNAJ-like protein (Verweij 2004 JCM)					
	CR PCR	Roche (Magnapure)	DNAJ-like protein (Verweij 2004 JCM)					
	CR PCR	Roche (Magnapure)	SSU rRNA (Verweij 2004 JCM)	pos		pos		
	CR PCR	Overig	overig	28,3	-7,0	28,4	-3,6	
	CR PCR	Roche (Magnapure)	Oocyst wall protein (Guy 2003)	36,0	0,7	32,5	0,5	
	CR PCR	Biomerieux (easyMag)	overig	34,9	-0,4	32,0	0,0	
	CR PCR	Roche (Magnapure)	overig	29,0	-6,3			
				gem	35,3		gem	32,0
				mediaan	34,9		mediaan	32,0

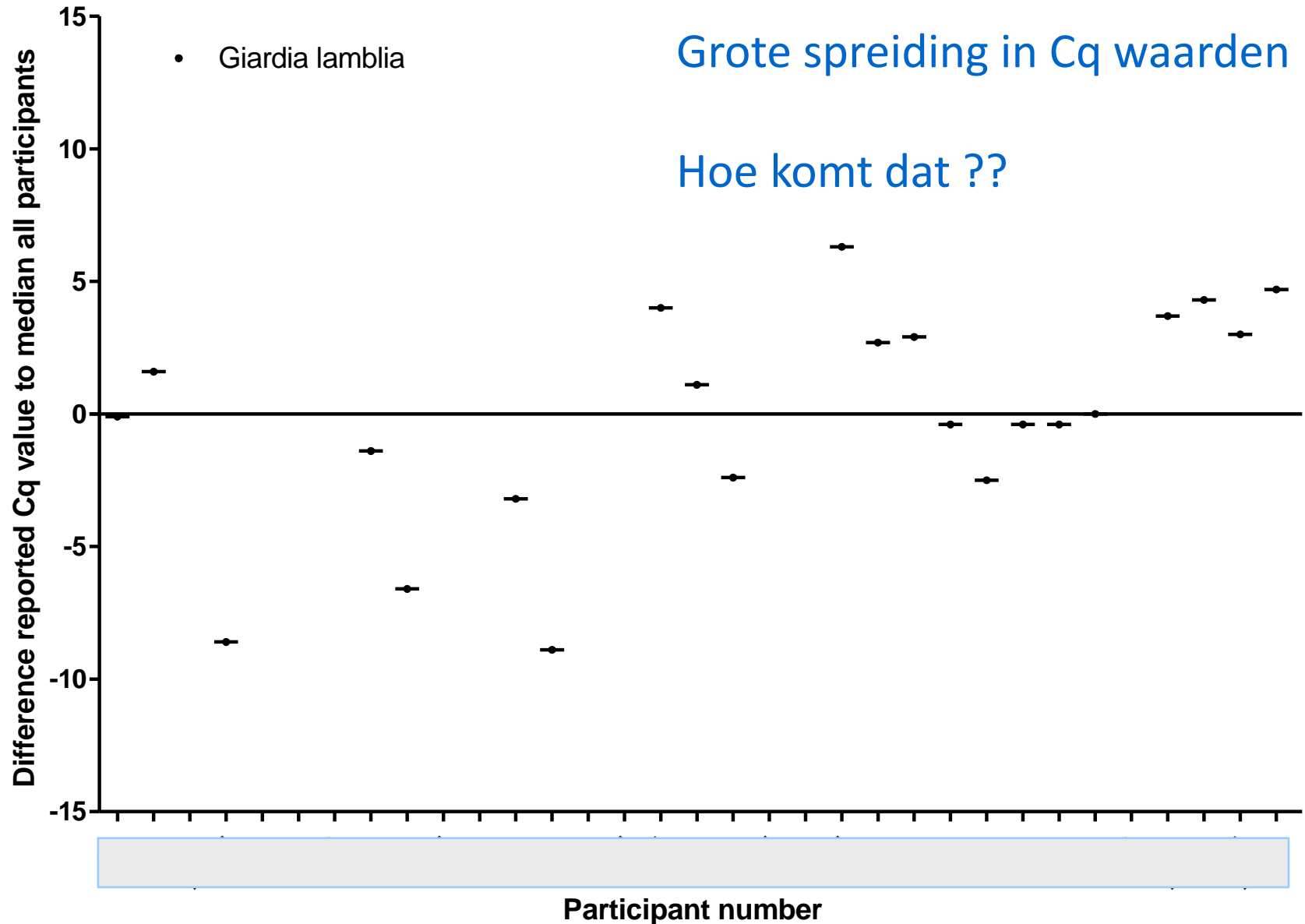
Resultaten 1 materiaal *Giardia lamblia*



Resultaten 1 materiaal *Giardia lamblia*



Resultaten 1 materiaal *Giardia lamblia*

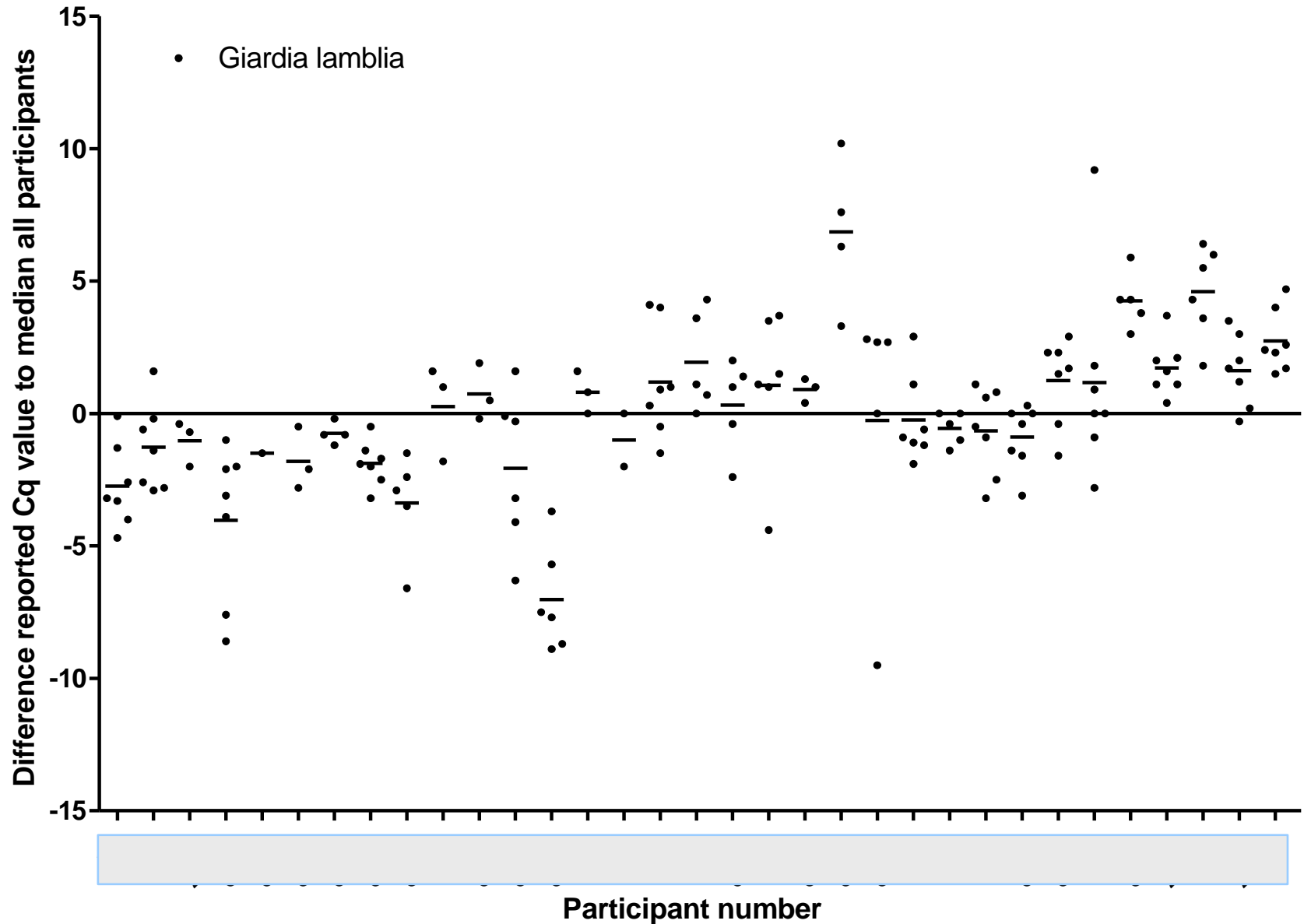


Kwaliteitscontrole: documentatie

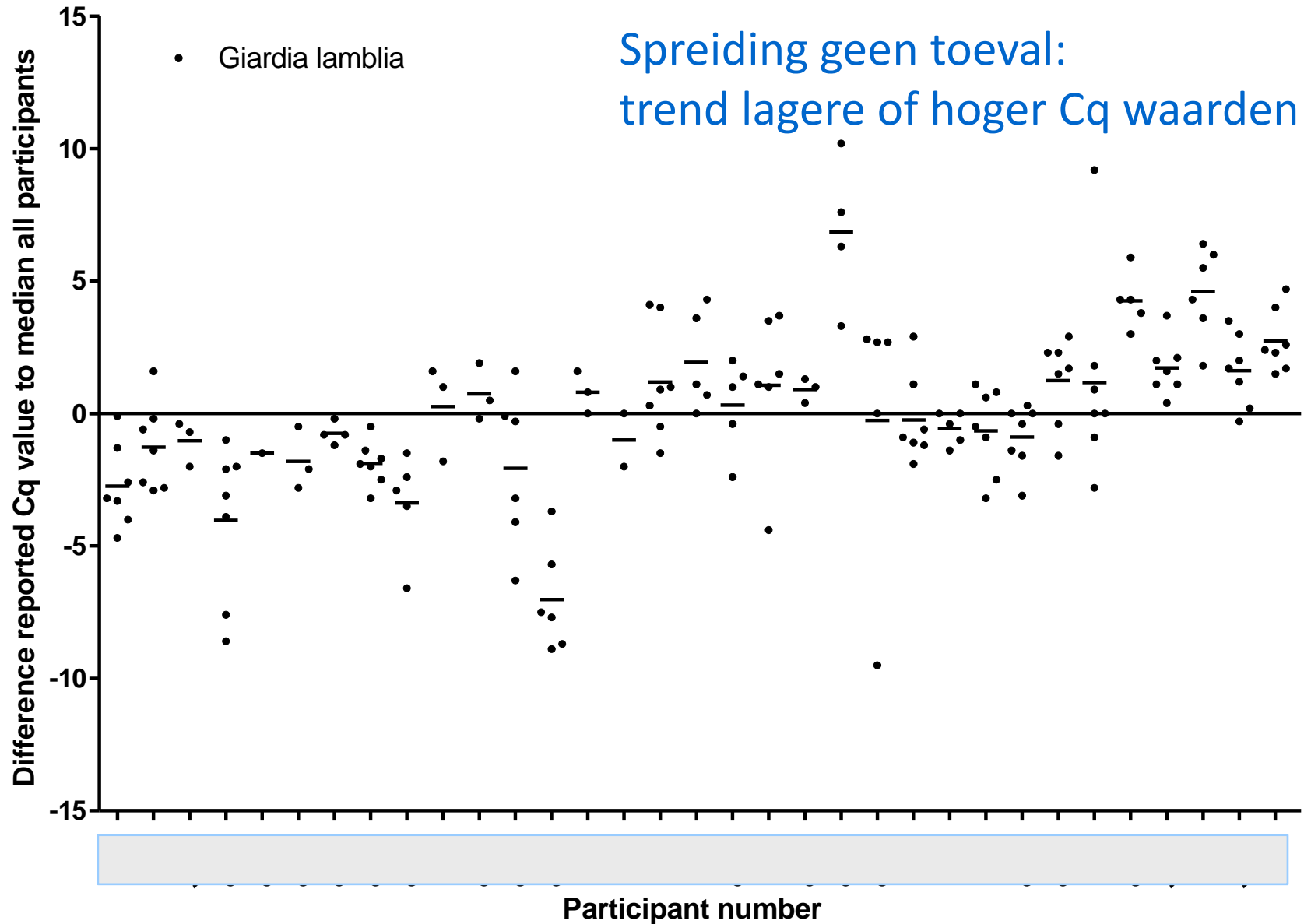
	Rondzending feces PCR SKML 3e en 4e rondzending 2012															
Nummer	FMB-17				FMB-20				FMB-23				FMB-24			
Materiaal	feces				feces				feces				feces PBS			
Hoeveelheid																
Aangeleverd door	Izore				Izore				HZH/Erasmus				Haarlem			
Klinische gegevens																
Datum bereiding	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				37,3			
	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			
Geschikt voor rondzending	ja				ja				ja				ja			
Opmerking																
Nummer rondzending	2012-3E				2012-3E				2012.4.E				2012.4.F			
Datum rondzending									13-11-2012				13-11-2012			
Casus									2012.4				2012.4			



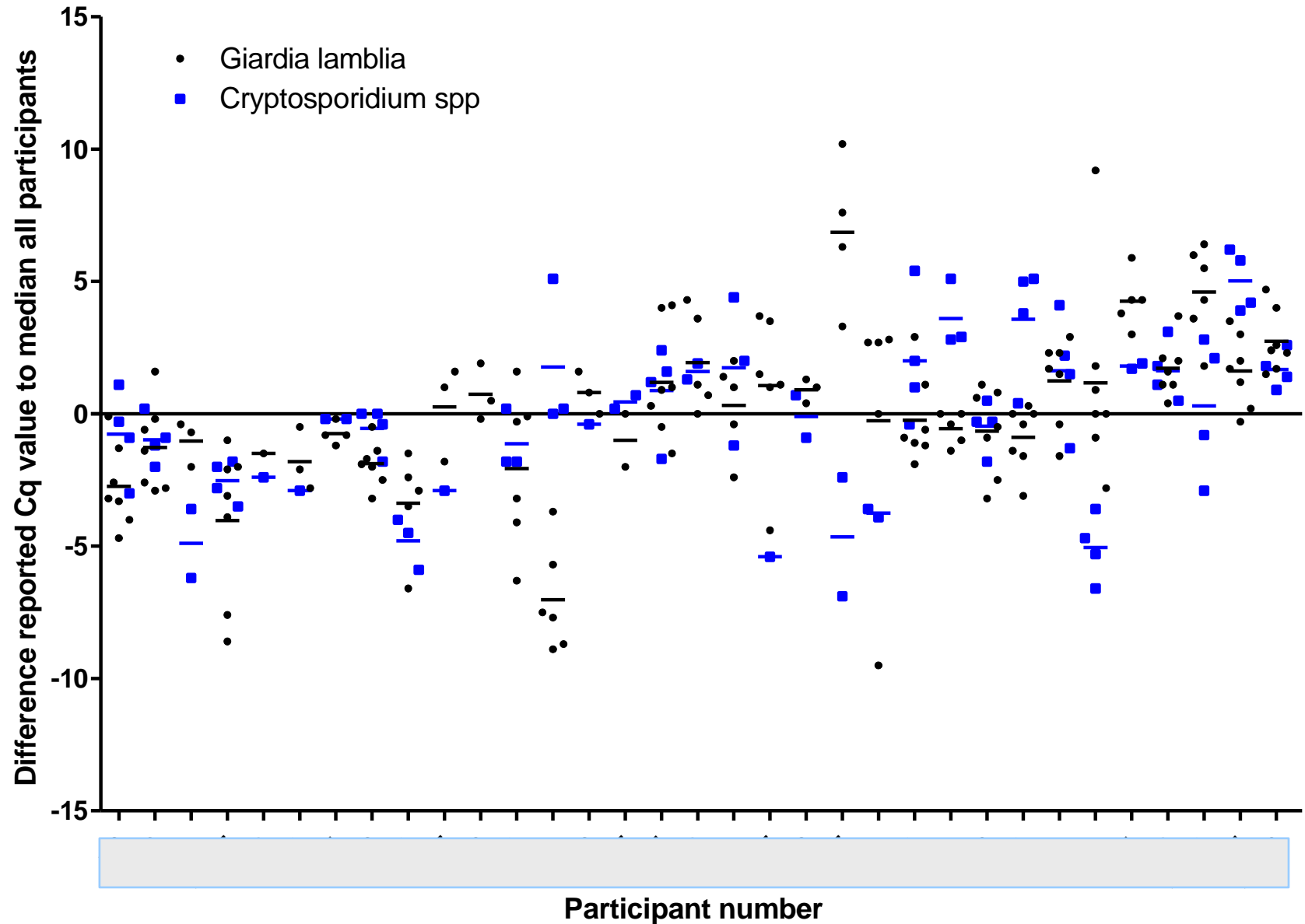
Resultaten alle materialen *Giardia lamblia*



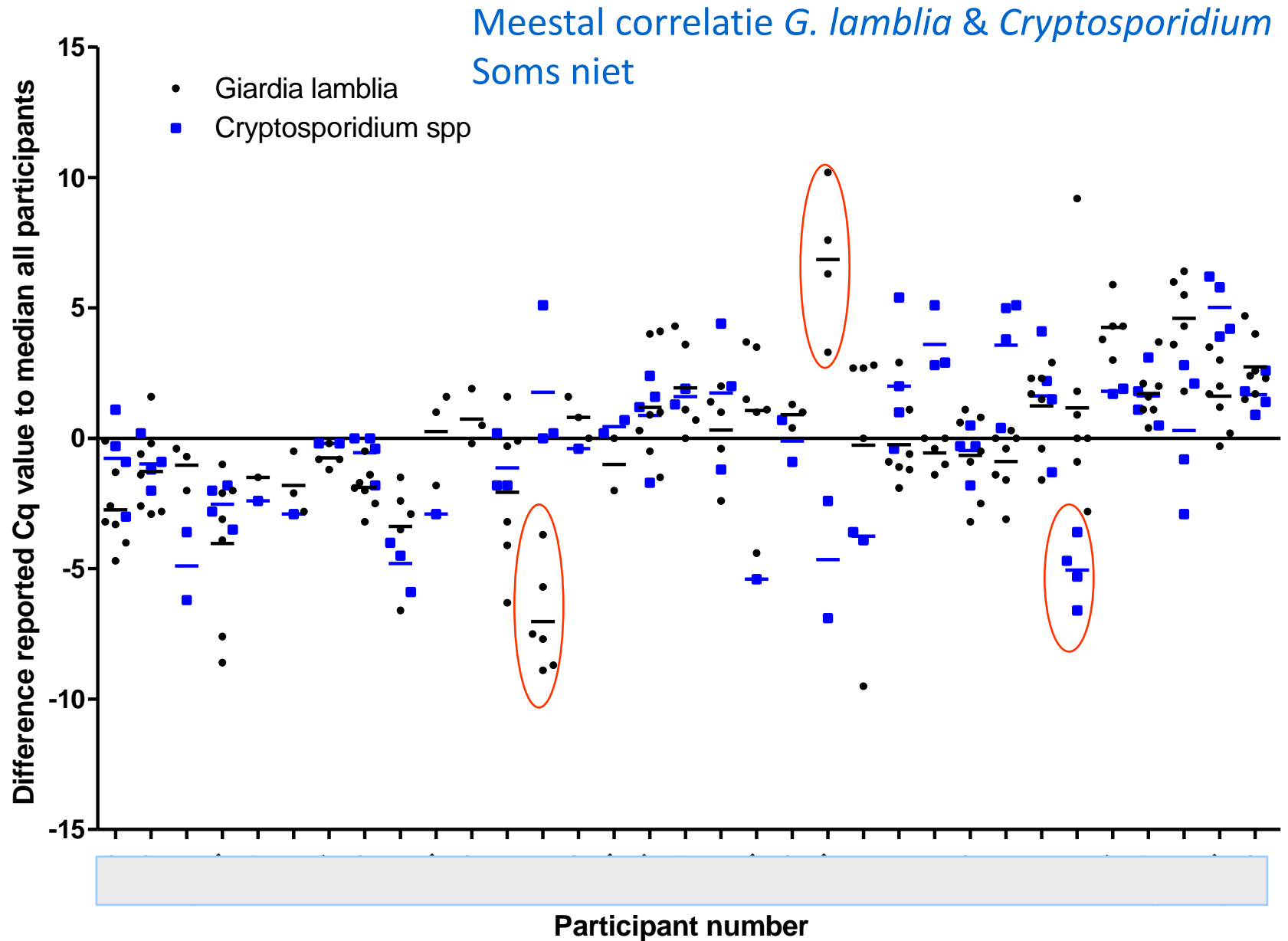
Resultaten alle materialen *Giardia lamblia*



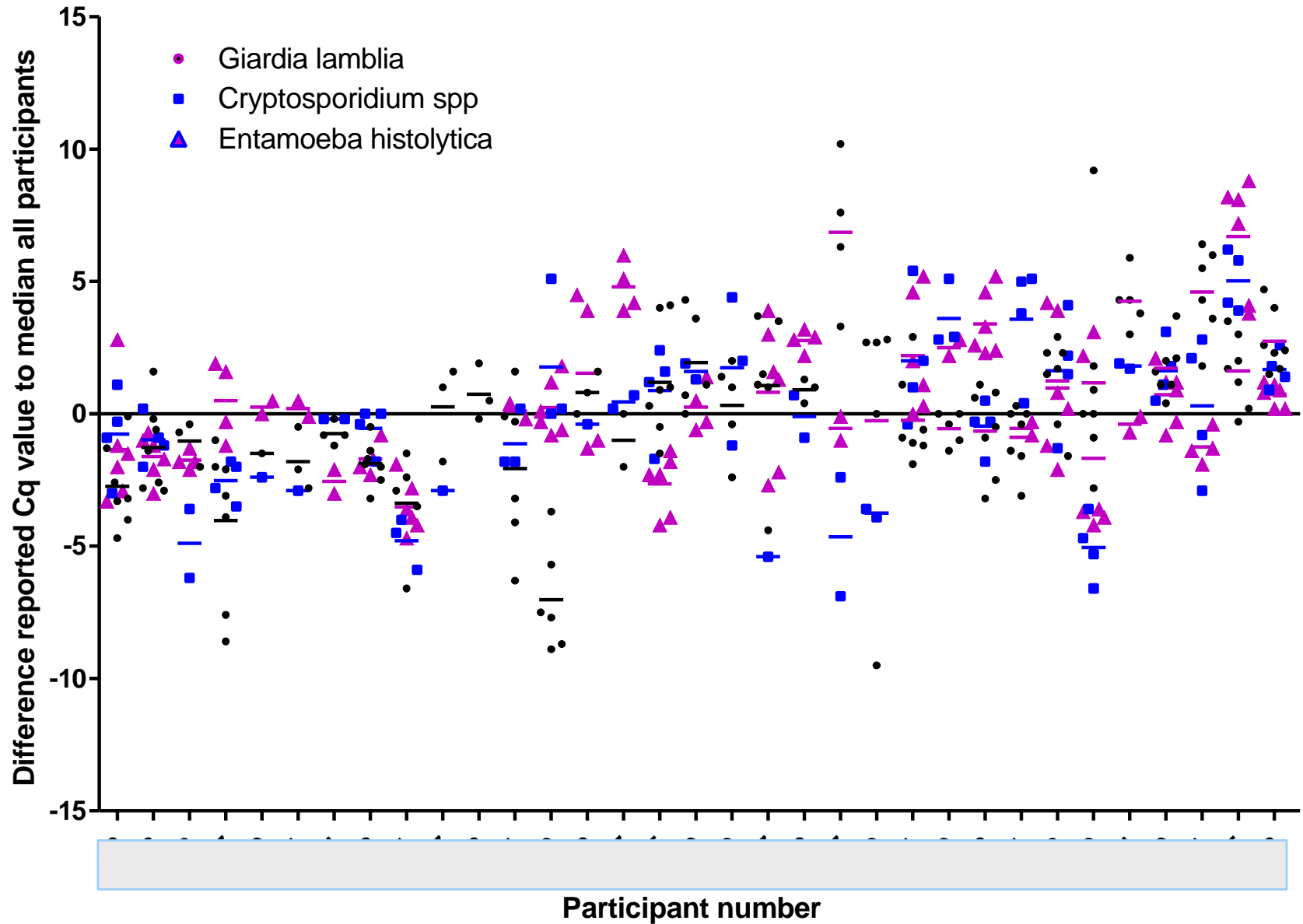
Resultaten alle materialen



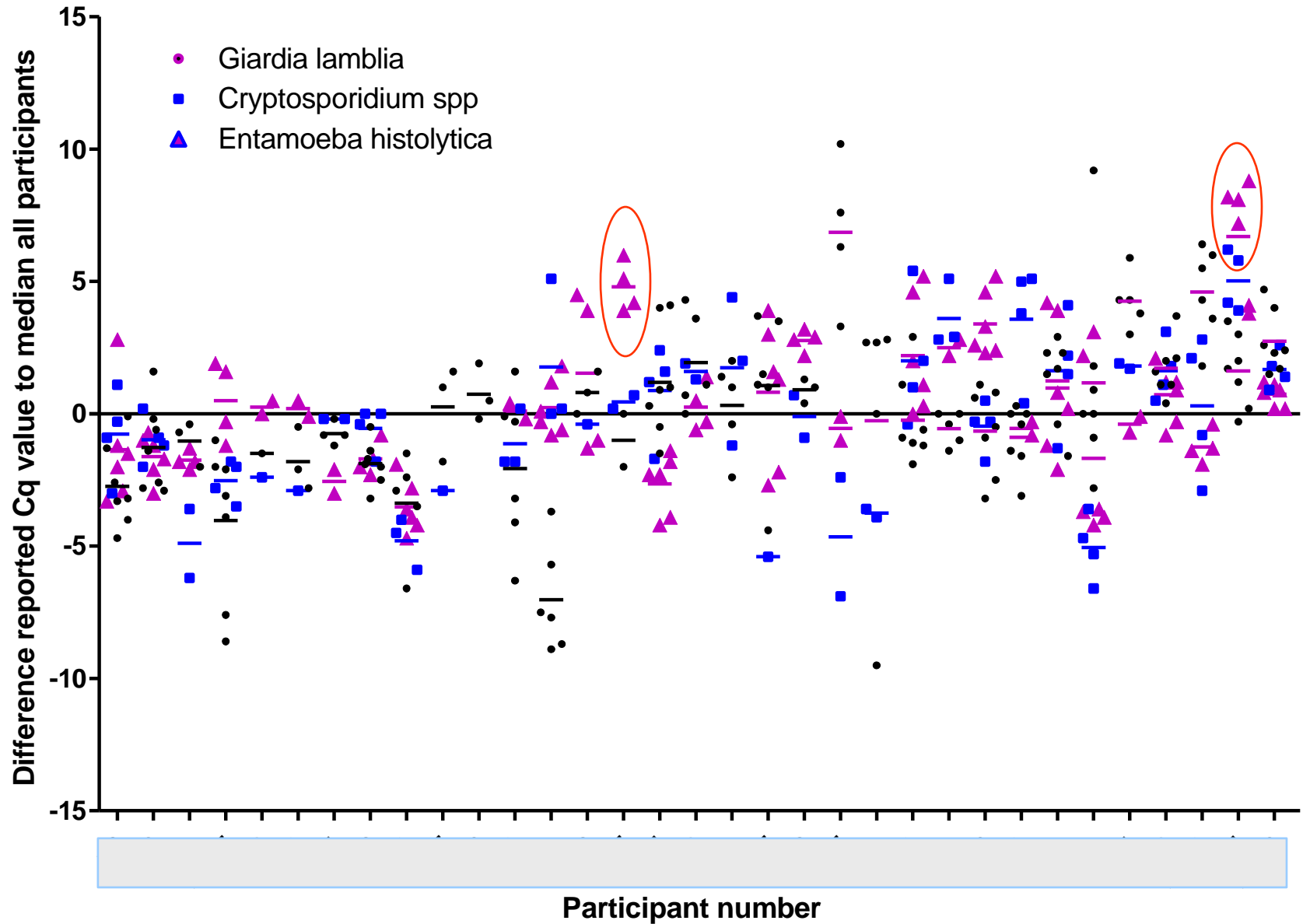
Resultaten alle materialen

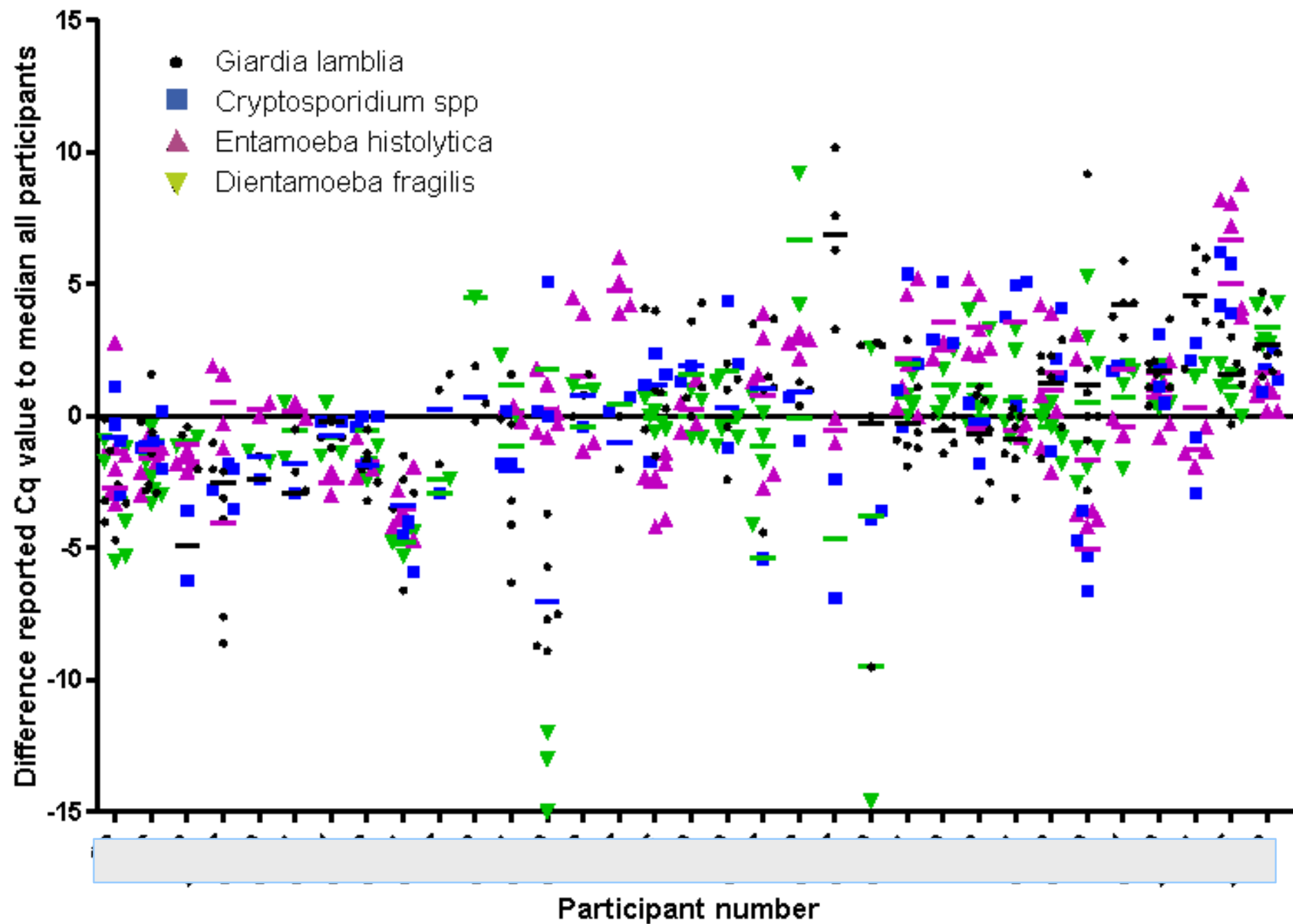


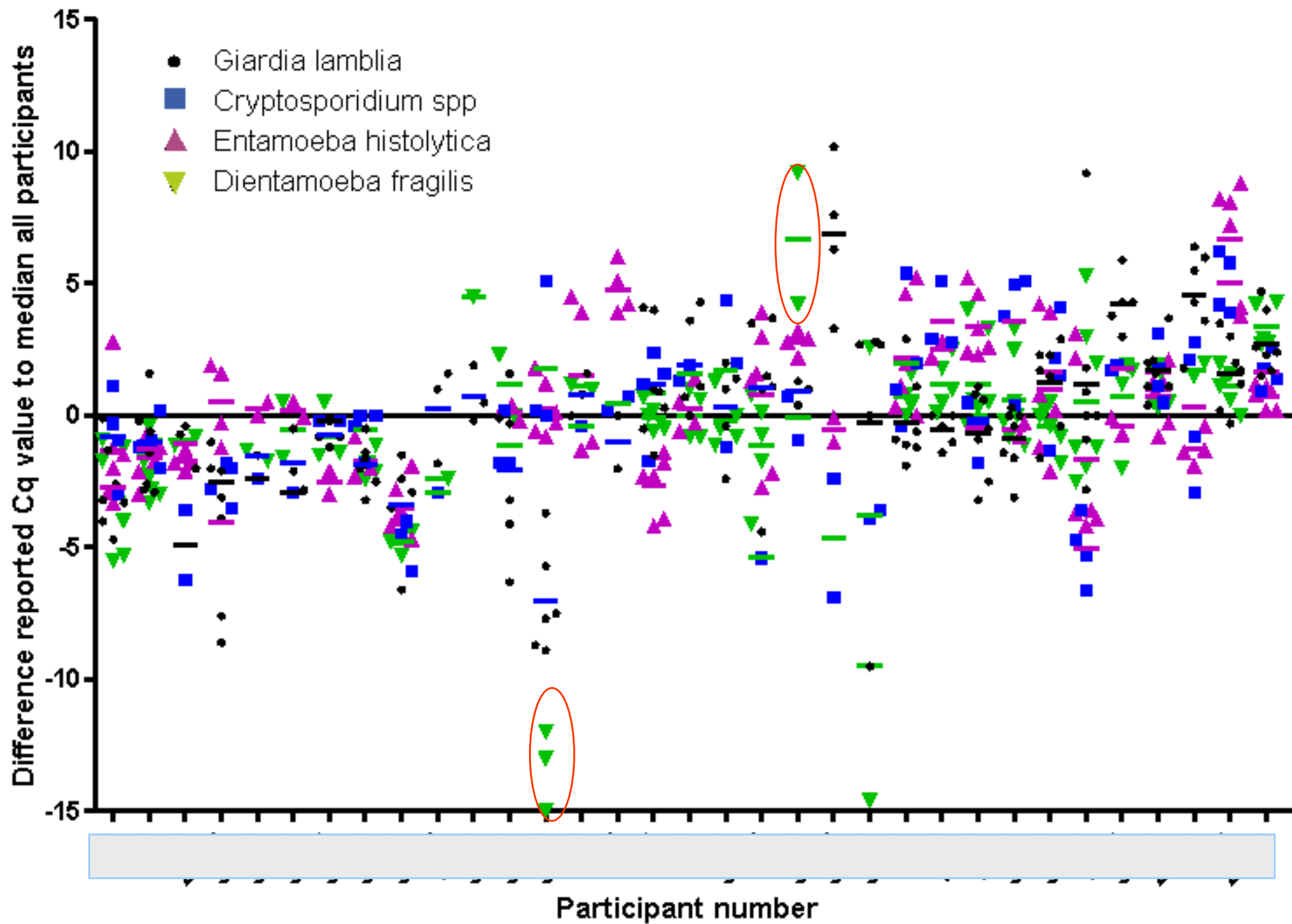
Resultaten alle materialen

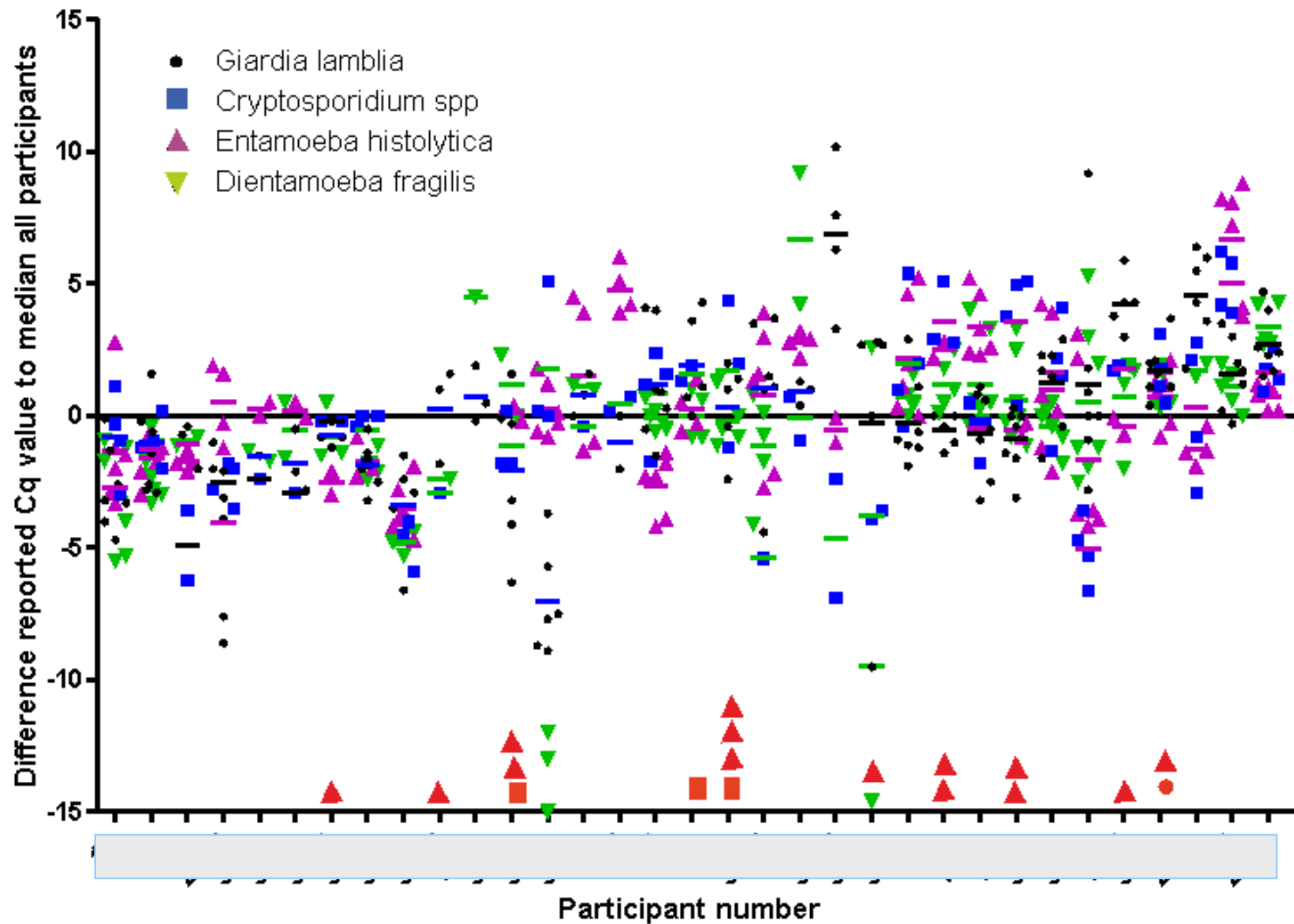


Resultaten alle materialen

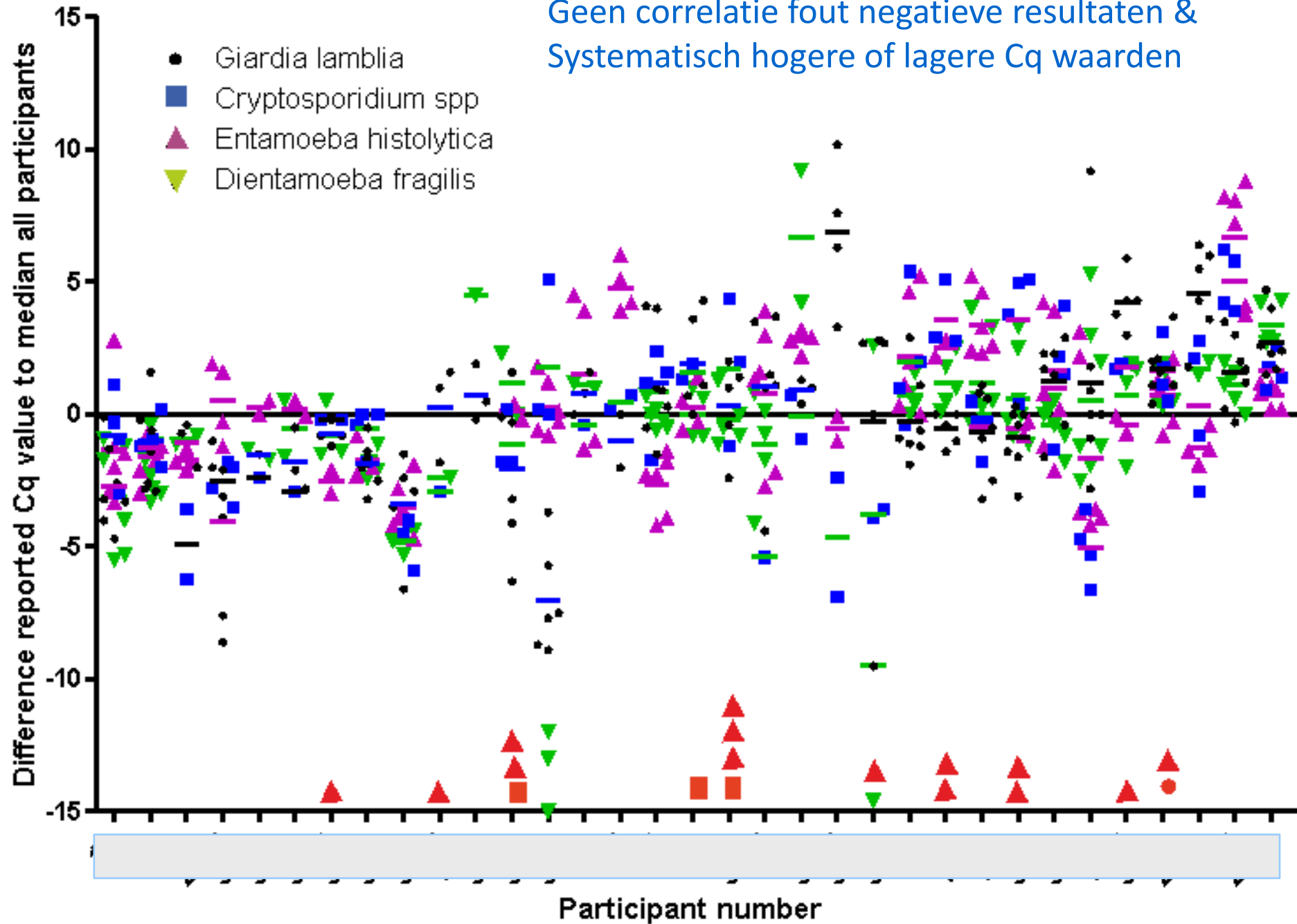








Geen correlatie fout negatieve resultaten & Systematisch hogere of lagere Cq waarden



Conclusies

- 1) Sinds 2013 distributie stabiele & homogene feces materialen
- 2) Resultaten rondzending 2014 (<< 100% juist); noodzaak kwaliteitscontrole

Conclusies

- 1) Sinds 2013 distributie stabiele & homogene feces materialen
- 2) Resultaten rondzending 2014 (<< 100% juist); noodzaak kwaliteitscontrole
- 3) Veel variatie in gerapporteerde Cq waarden
 - meestal trend: verschil in DNA extractie/ voorbewerking
 - soms niet: verschil in PCR methode (Ct – Cp waarde)
 - lijkt geen correlatie met gebruikte apparatuur
 - belang van echte feces als materiaal in kwaliteitscontrole
- 4) Enquête t.a.v. details volledige procedure

Conclusies

- 1) Sinds 2013 distributie stabiele & homogene feces materialen
- 2) Resultaten rondzending 2014 (<< 100% juist); noodzaak kwaliteitscontrole
- 3) Veel variatie in gerapporteerde Cq waarden
 - meestal trend: verschil in DNA extractie/ voorbewerking
 - soms niet: verschil in PCR methode (Ct – Cp waarde)
 - lijkt geen correlatie met gebruikte apparatuur
 - belang van echte feces als materiaal in kwaliteitscontrole
- 4) Enquête t.a.v. details volledige procedure
- 5) Geen correlatie fout negatieve resultaten met systematisch hogere of lagere Cq waarden

2015: Introductie Mol. Diag. *T. vaginalis*

ISO 15189 accreditatie

Bij voorkeur voor alle onderzoeken externe kwaliteitscontrole

Geen rondzending beschikbaar voor *Trichomonas vaginalis*

2015: Proefrondzending: 2 * 3 materialen (kostenloos)
(urine of vaginale uitstrijk)

2016: aparte (betaalde) rondzending



Stichting Kwaliteitsbewaking
Medische Laboratoriumdiagnostiek

Sectie Parasitologie

Dankwoord

Nicolette v.d. Ham

Rob Koelewijn

SKML sectie parasitologie



Stichting Kwaliteitsbewaking
Medische Laboratoriumdiagnostiek

Sectie Parasitologie