

SKML rondzendingen

Parasitologie

Jaap van Hellemond

Dept. Medische Microbiologie & Infectieziekten
Erasmus MC, Rotterdam

SKML

Stichting Kwaliteitsbewaking Medische Laboratorium-
diagnostiek :

NL non profit organisatie

Doel:

bevorderen van kwaliteit van medisch laboratoriumonderzoek

De kern is verzorgen van externe kwaliteitsbewakings-
rondzendingen voor alle laboratoriumspecialismen.

SKML – organisatie

Algemeen bestuur

Directeur & uitvoerende medewerkers

Groot aantal vakspecifieke secties

- experts vanuit het veld
- voorgedragen vanuit wetenschappelijke vakverenigingen
- organisatie van externe kwaliteitsrondzendingen

SKML – sectie parasitologie

NVP	Jaap van Hellemond, Erasmus MC	(vz)
	Lisette van Lieshout, LUMC	(secre.)
	Theo Mank, Streeklab Haarlem	(penn.)

NVMM	Foekje Stelma, Radboudumc
------	---------------------------

WMDI	Theo Schuurs, Izore
------	---------------------

Leden	Titia Kortbeek, RIVM
	Eric Bienen, LUMC
	Bert Mulder, CWZ

Monsterbereidingscentrum (MCB):	Erasmus MC
---------------------------------	------------

SKML – sectie parasitologie

Organisatie van externe kwaliteitsrondzendingen

- Toetsing van kwaliteit van diagnostiek dmv rondzending van gevalideerde materialen.

Verhogen van kennis en kwaliteit diagnostiek parasitaire infecties

- Verdiepingsvragen en vakinhoudelijke discussie
- Jaarlijkse deelnemersmiddag
- Tweejaarlijks SKML congres

SKML –rondzendingen parasitologie

Bloed- en darmparasieten

- Feces en bloedpreparaten voor microscopie
- Bloedlysaten voor malaria antigeentesten

Protozoa Moleculaire Diagnostiek (2013)

- Ongefixeerde feces

Helminthen Moleculaire Diagnostiek (2018/9)

- Ethanol gefixeerde feces

Trichomonas Moleculaire Diagnostiek (2015)

- Urine / urogenitaal uitstrijk materiaal
- Vanaf 2019 pilot naar combi met bacteriële SOA

SKML – bloed- en darmparasieten

4 distributies

- 2 fecesmaterialen
- 2 bloedpreparaten
- 2x per jaar 2 bloedlysaten

Doel:

Toetsing van kwaliteit van microscopisch onderzoek naar

- Protozoa en wormeieren/larven in feces
- Parasieten in bloed

+ toetsing van kwaliteit van malaria antigeentesten

SKML – bloed- en darmparasieten

4 distributies

- 2 fecesmaterialen
- 2 bloedpreparaten
- 2x per jaar 2 bloedlysaten

Validatie materiaal:

Geblindeerde beoordeling door 6 expert laboratoria.

- Unaniem in resultaat
- Beoordeling van kwaliteit
- Vast stelling van 'performance score'

SKML – bloed- en darmparasieten

Beoordeling:

Per materiaal:

2 punten: helemaal correct

1 punt beetje correct

0 punten fout, zonder medische consequenties

-1 punt fout, met medische consequenties

-2 punten fout met ernstige medische consequenties

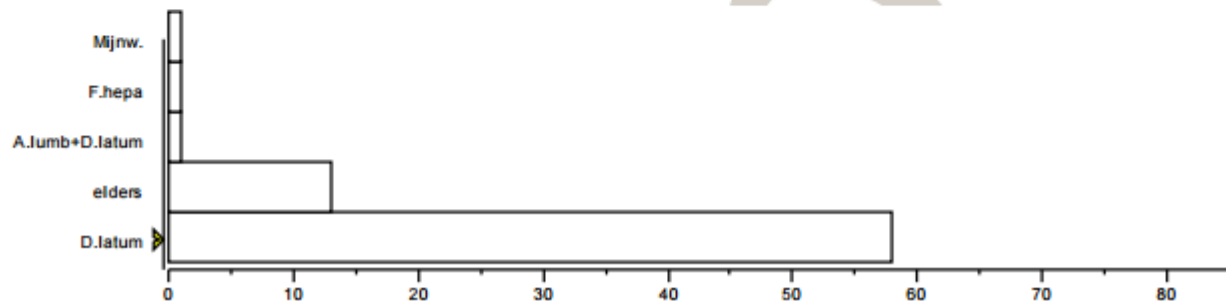
Kwalitatieve scores (MAP 100% - 2)

Monster :	C SAF gefixeerde feces.
Patiënt :	Een 25-jarige student uit Finland heeft sinds een paar maanden klachten van moeheid en buikpijn met soms dunne ontlasting. De huisarts vraagt onderzoek op wormeieren en cysten aan.
Vraag :	Onderzoek op darmparasieten.
Opmerkingen :	Indien onderzoek niet in laboratorium wordt verricht, vul "doorgestuurd" als antwoord optie in.

Determinatie	Expert uitslag	Score	Uw uitslag
	Diphyllobothrium latum	2	Diphyllobothrium latum ✓

Totaalscore : 2

Histogram



- Protozoa

- *Balantidium coli*
- *Cryptosporidium* sp
- *Cyclospora cayetanensis*
- *Cystoisospora belli*
- *Entamoeba histolytica*
- *Giardia lamblia*
- *Microsporidium* sp
- *Dientamoeba fragilis*
- *Blastocystis hominis*
- *Chilomastix mesnili*
- *Endolimax nana*
- *Entamoeba coli*
- *Entamoeba dispar*
- *Entamoeba hartmanni*
- *Iodamoeba bütschlii*

- Wormen

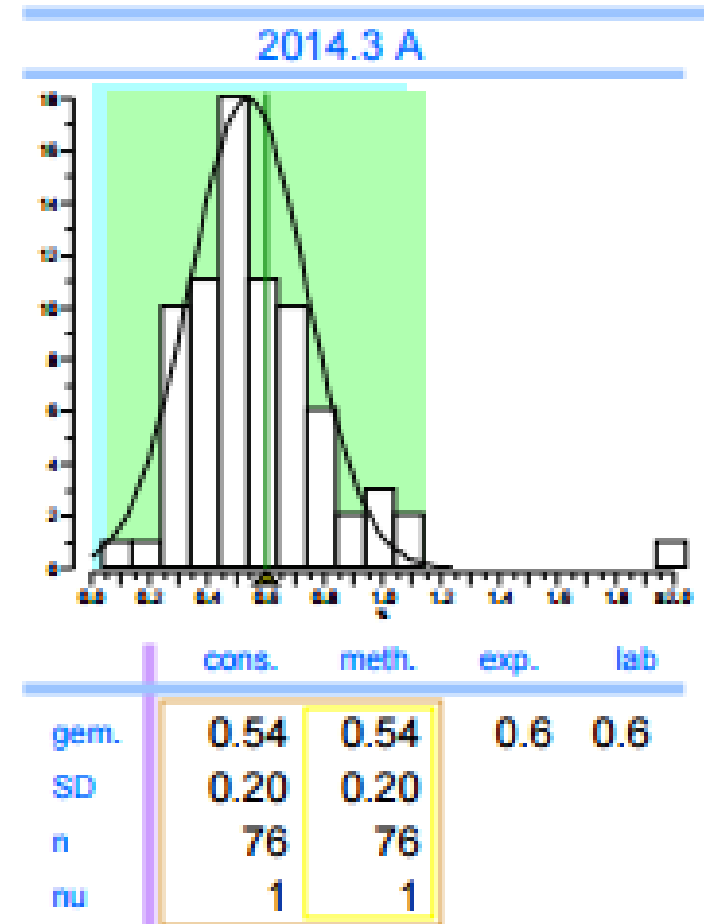
- *Ascaris lumbricoides*
- *Diphyllobotrium* sp
- *Enterobius vermicularis*
- *Fasciola hepatica*
- *Hymenolepis nana*
- *Hymenolepis diminuta*
- Mijnwormen
- *Schistosoma* sp
- *Strongyloides stercoralis*
- *Trichuris trichiura*
- *Taenia* sp

2016

Ronde nr.		Parasieten	Aantal max scores /aantal inzenders
2017-1	A	P. vivax	65/76 (86%)
	B	P. falciparum (0,01%)	76/76 (100%)
	C	Trichuris trichiura	52/56 (93%)
	D	G. lamblia & Taenia spp.	48/56 (86%)
	E	Plasmodium spp. positief	62/69 (90%)
	F	P. falciparum & Plasmodium spp. positief	66/69 (96%)
2017-2	A	P. malariae	72/78 (92%)
	B	P. falciparum (0,01%)	76/78 (97%)
	C	Ascaris spp.	57/58 (98%)
	D	Entamoeba histolytica/dispar	50/55 (91%)
2017-3	A	P. vivax	57/75 (76%)
	B	P. falciparum (7,5%)	75/75 (100%)
	C	Giardia lamblia	43/53 (81%)
	D	Entamoeba coli (+ sporadisch D. fragilis, E. his./dis. & Blastocystis spp.)	56/58 (97%)
	E	P. falciparum positief	67/68 (99%)
	F	P. falciparum & Plasmodium spp. positief	65/68 (96%)
2017-4	A	P. vivax	74/77 (96%)
	B	P. ovale	70/77 (91%)
	C	Echinococcus spp. (cyste inhoud)	52/53 (98%)

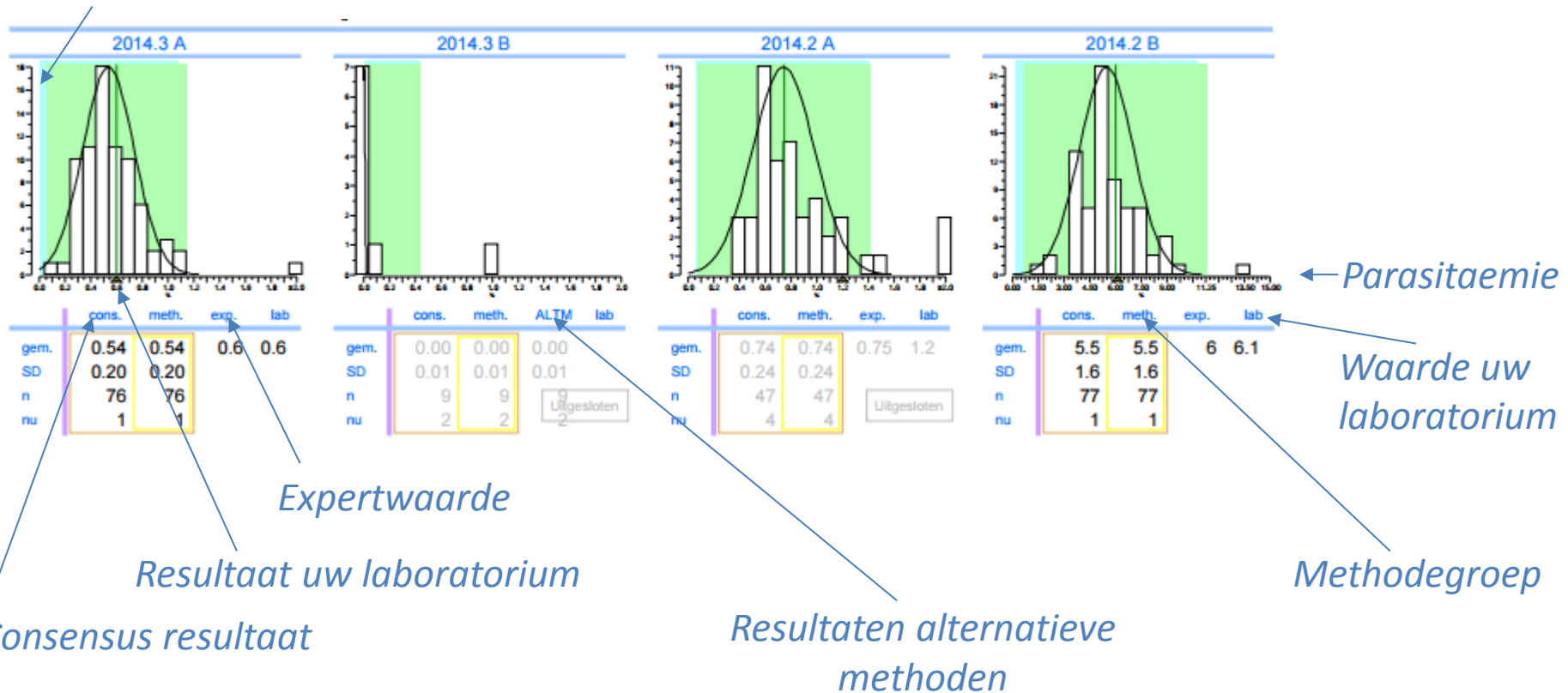
Kwantitatieve scores: malaria parasitaemie

- De mediaan van de load vastgesteld door tellingen in de 6 centra
- De tellingen van de deelnemende perifere laboratoria dragen bij aan de statistische spreiding rondom de mediaan.
- 95% van de observaties dienen binnen 2 SD van de mediaan te liggen.



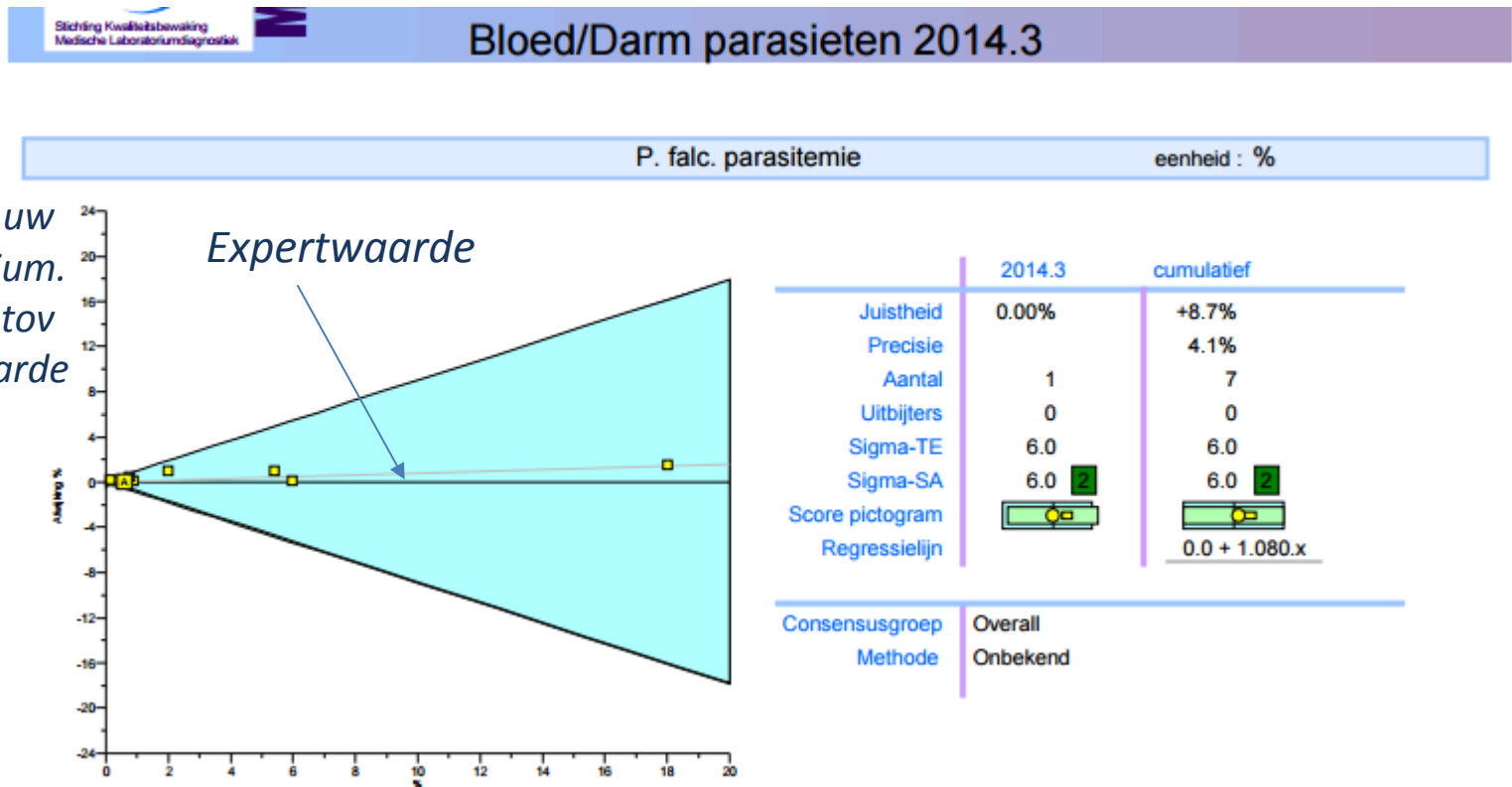
Malaria parasitaemie – rapporten laatste 2 ronden

Aantal deelnemers



Malaria parasitaemie - difference plot

Geeft resultaten weer van de laatste 3 jaar (startend vanaf 1-1-2013)



Blokjes A en B geven de resultaten van de materialen A en B van de laatste ronde weer

Rapporten

Overzicht van historische gegevens:

Trend analyse voor systematische afwijkingen



SKML – bloed- en darmparasieten

Vragen:

“Waarom zitten er nog protozoa in de rondzending?
Dat dan we met PCR.”

- Rondzending toetst kwaliteit microscopische diagnostiek naar parasieten, daar horen protozoa bij.
- Niet alle parasitaire protozoa zitten in PCR panels!
 - Cyclospora, Cystoisospora, Sarcocystis, etc.

SKML – bloed- en darmparasieten

Vragen:

Waarom ook commensale protozoa of omstreden protozoa?

Toetsing kwaliteit:

Voor juist benoemen van pathogenen is ook het juist herkennen van a-pathogenen van belang.

2013: Introductie fecespanel geschikt voor Mdx

SKML-parasitologie

Karakteristieken rondzending:

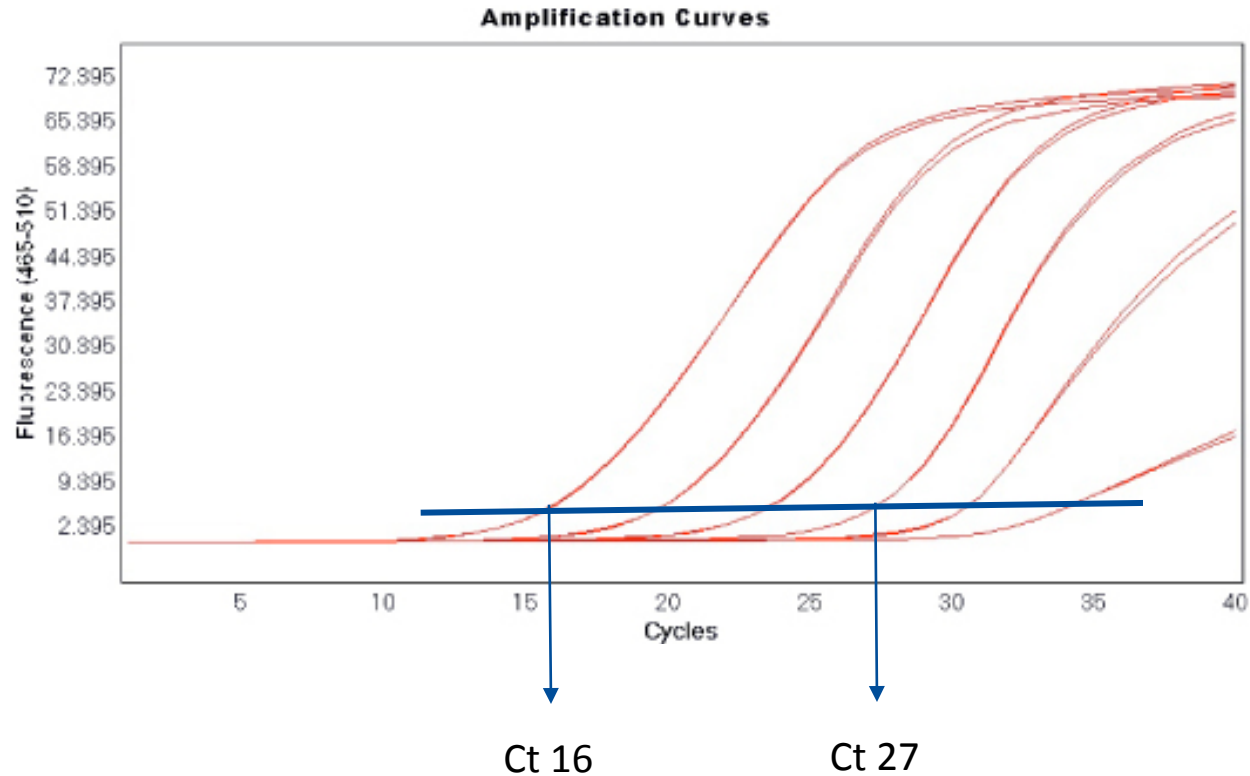
- pathogeen in feces (uniek!)
- hoge kwaliteit: reproduceerbare en stabiele feces-monsters



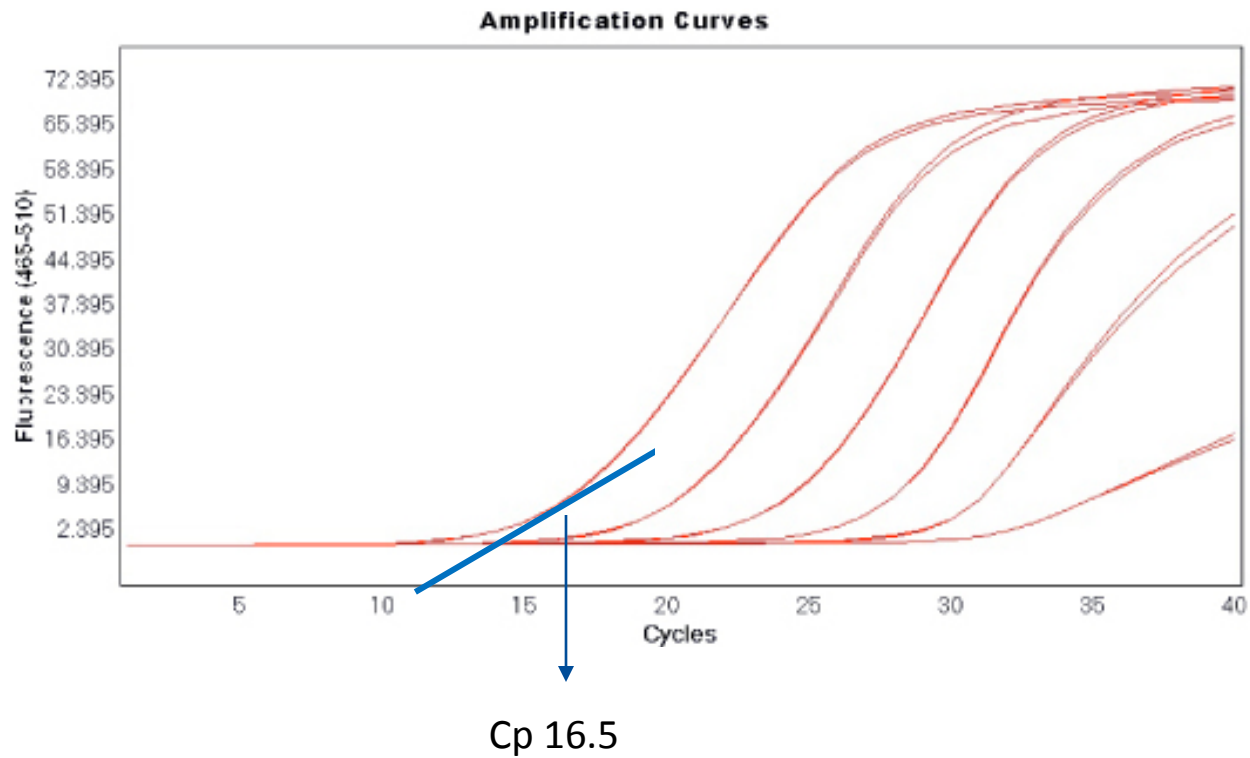
Stichting Kwaliteitsbewaking
Medische Laboratoriumdiagnostiek

Sectie Parasitologie

Ct, Cp en Cq waarden

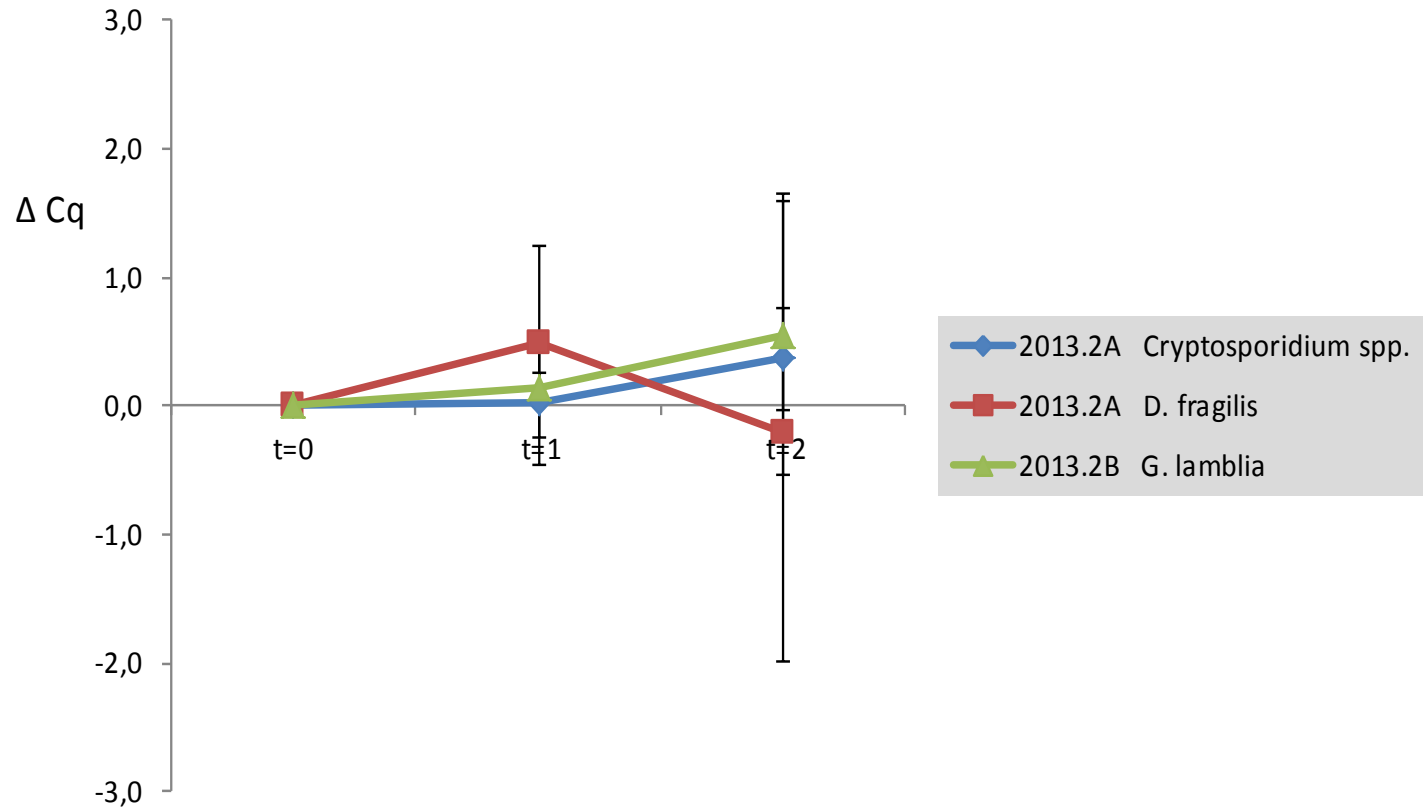


Ct, Cp en Cq waarden



Cq waarde = verzamelnaam voor Cp en Ct

Stabiliteit monsters (na 14 dagen kamertemp.)



Overzicht 2017

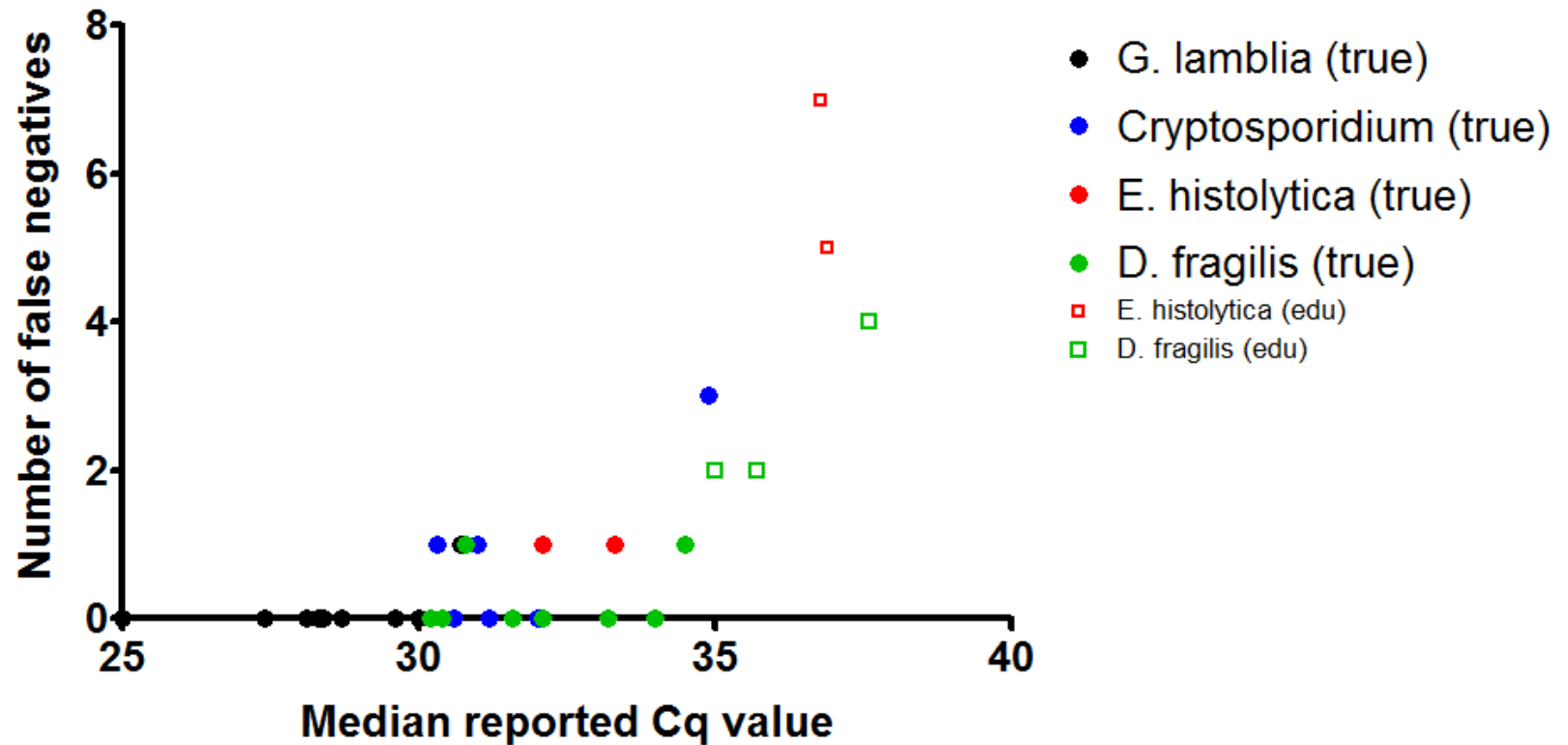
	parasiet	correct n (%)	totaal n *	Cq	opmerkingen
2017.1A	<i>G. lamblia</i>	29 (97%)	30	27	
	<i>D. fragilis</i>	23 (100%)	23	30	
2017.1B	<i>G. lamblia</i>	30 (100%)	30	28	
	<i>D. fragilis</i>	23 (100%)	23	30	
2017.1C	<i>G. lamblia</i>	29 (97%)	30	32	
	<i>Crypto spp.</i>	30 (100%)	30	32	
	<i>E. histolytica</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	

Sensitiviteit 2013-2017

	<i>Giardia lamblia</i>	N	<i>Cryptosporidium spp</i>	N	<i>Entamoeba histolytica</i>	N	<i>Dientamoeba fragilis</i>	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)

Fout-negatieven 2013-2015



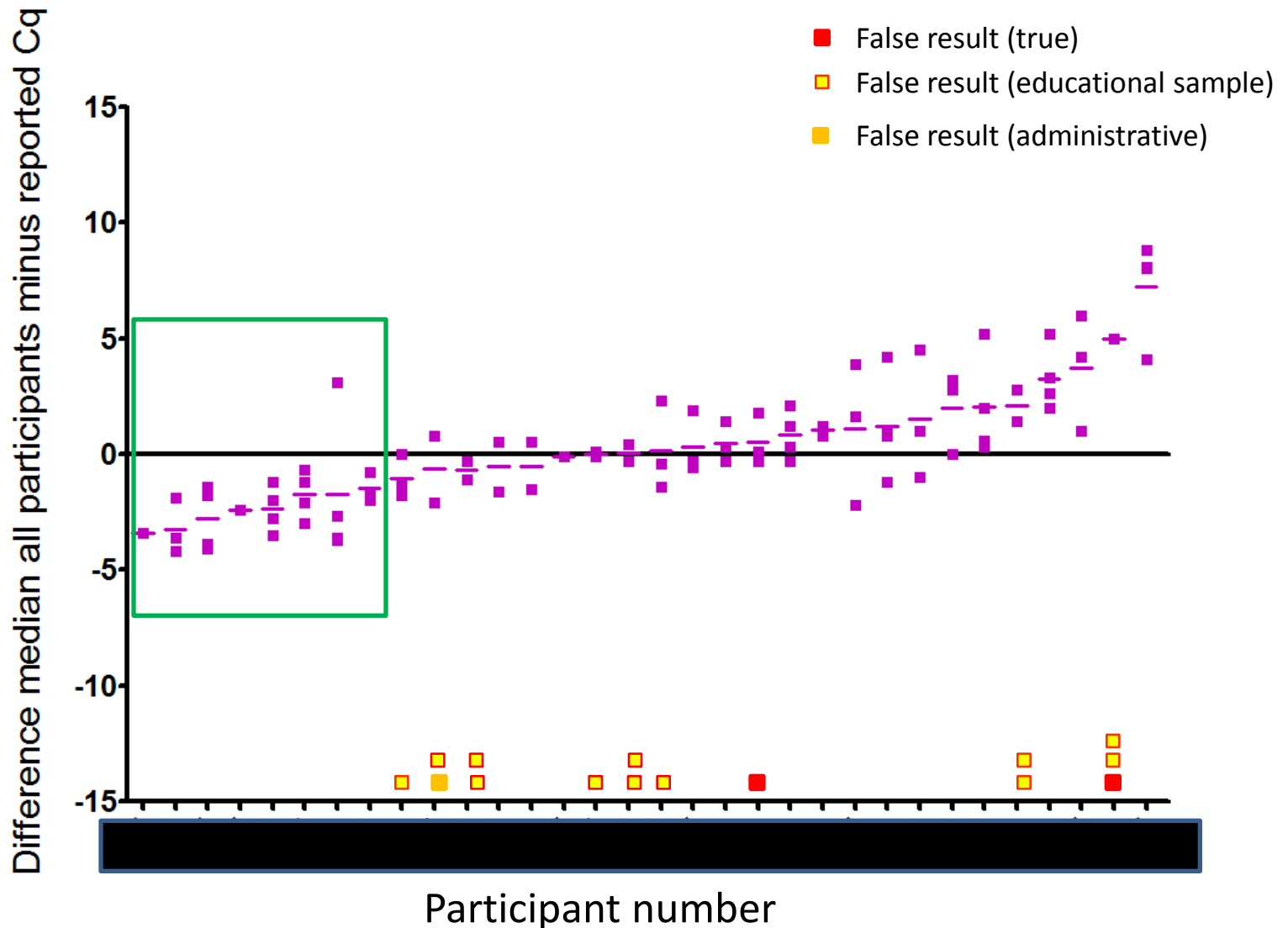
relatieve load

relatieve load diarreeverwekkers Izore (2012- 2016)

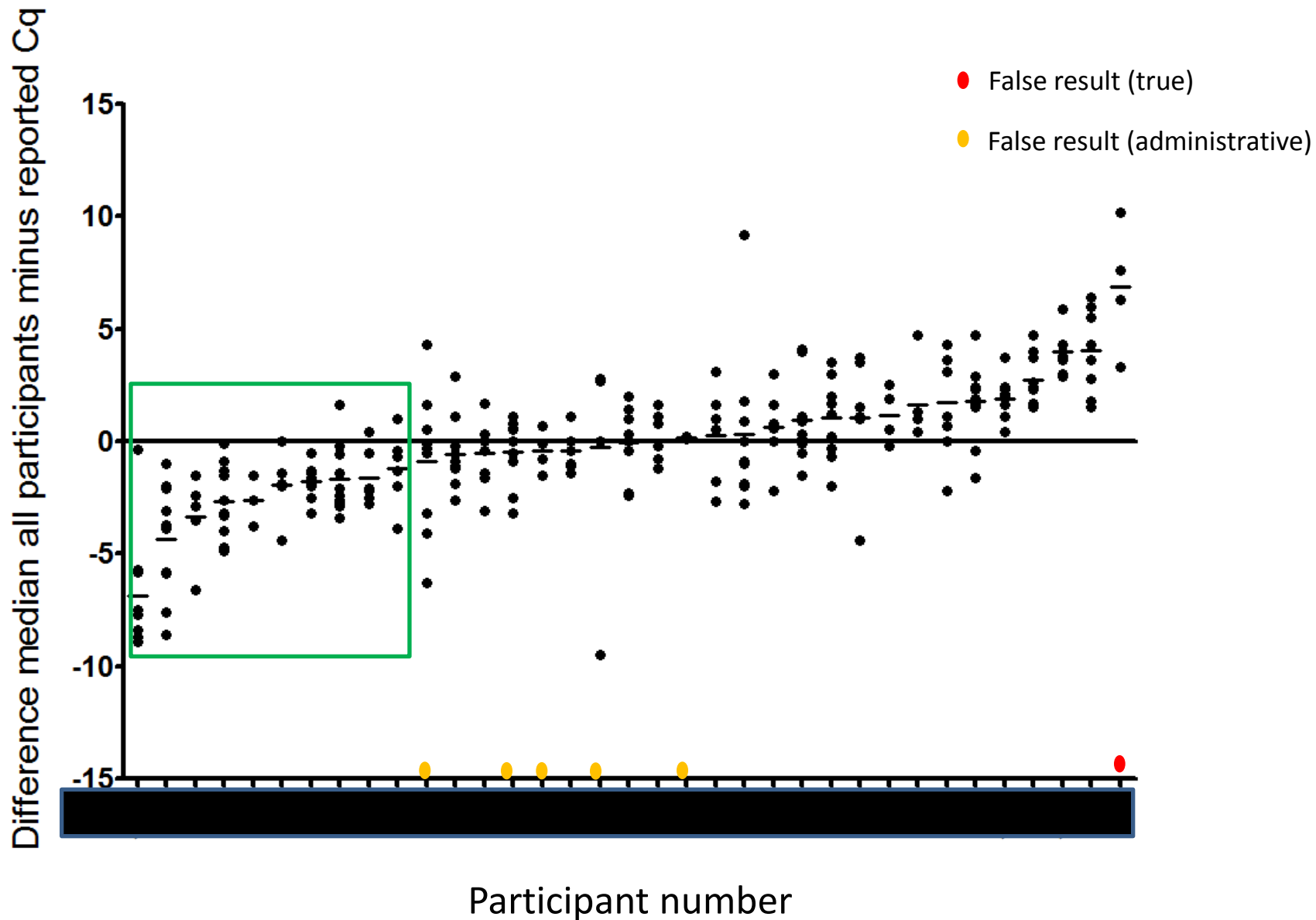
	<i>G.lamblia</i>	n	<i>Cryptosp. spp.</i>	n	<i>E.histolytica</i>	n	<i>D.fragilis*</i>	n
gemiddelde Cp waarde	27.8	929	31.5	401	31.0	17	26.7	80

* *D.fragilis*: alleen 2016

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



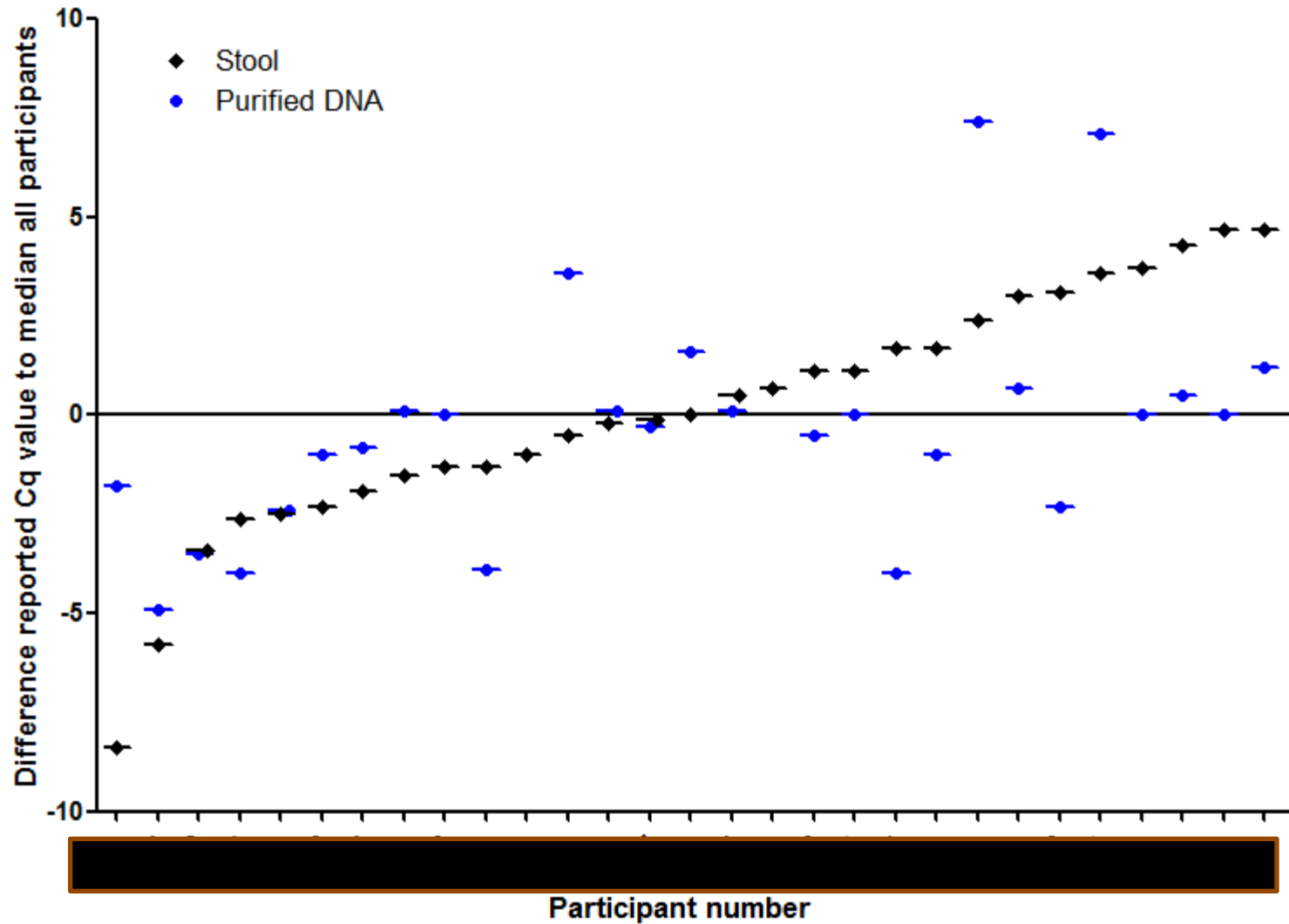
Cq waarden *G. lamblia* per laboratorium, 2013-2015



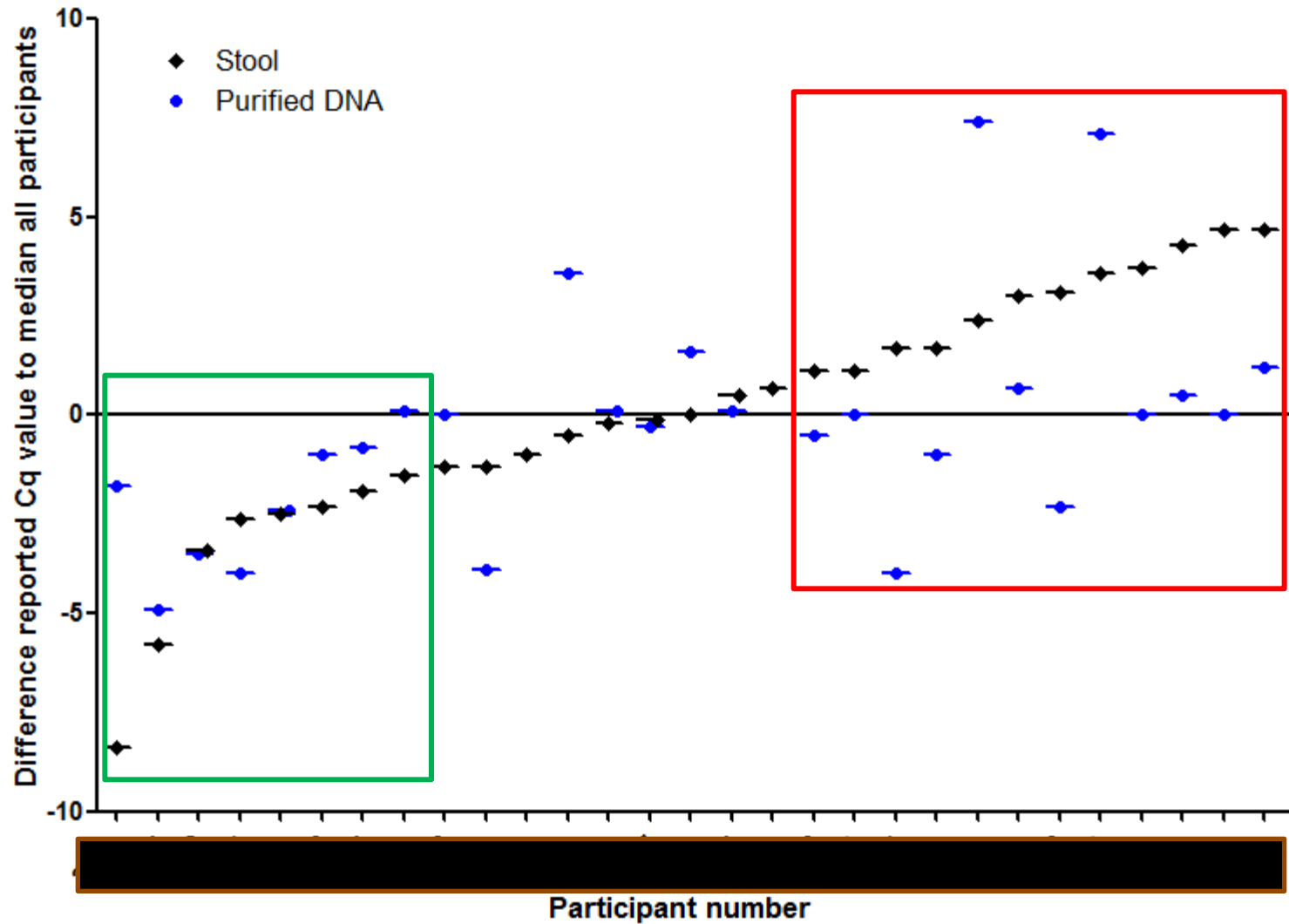
Werkwijze moleculaire diagnostiek intestinale parasieten



G. lamblia uitslagen feces en gezuiverd DNA



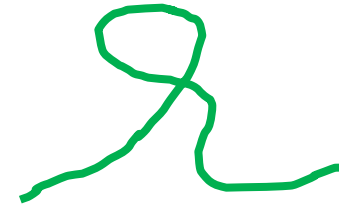
G. lamblia uitslagen feces en gezuiverd DNA



Werkwijze moleculaire diagnostiek intestinale parasieten



G.lamblia :



Verdiepingsvragen voorbehandeling feces

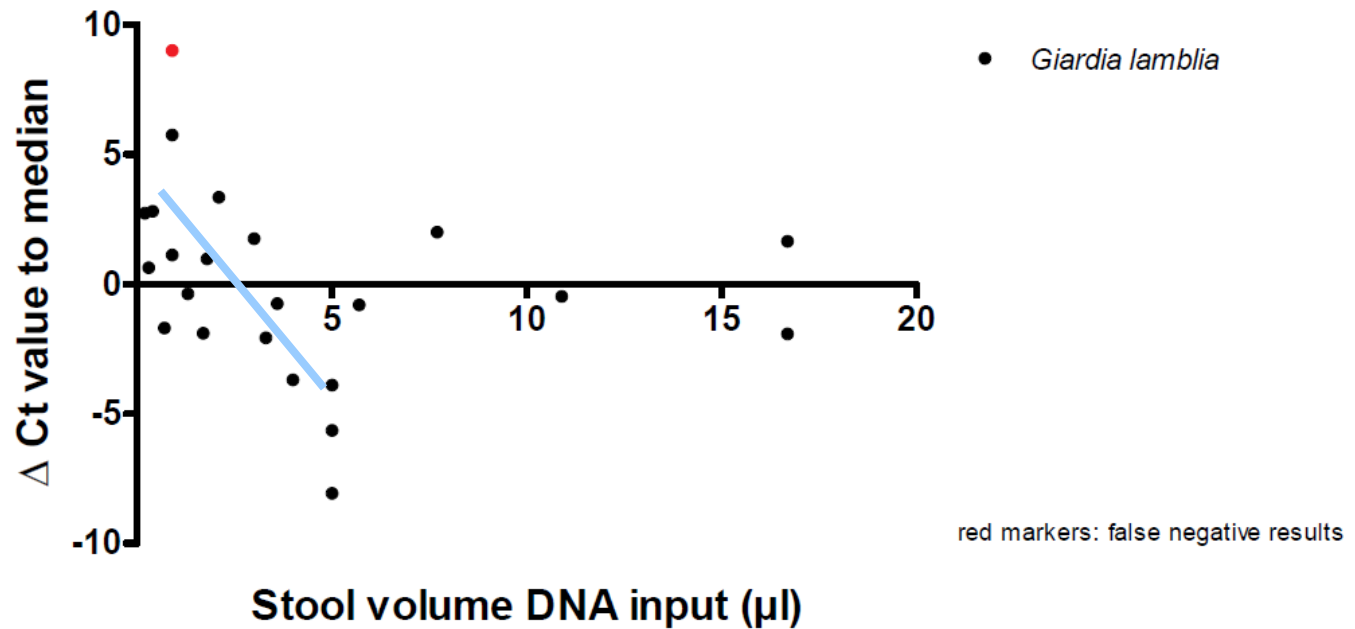
Verdiepingsvragen voorbehandeling feces:

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

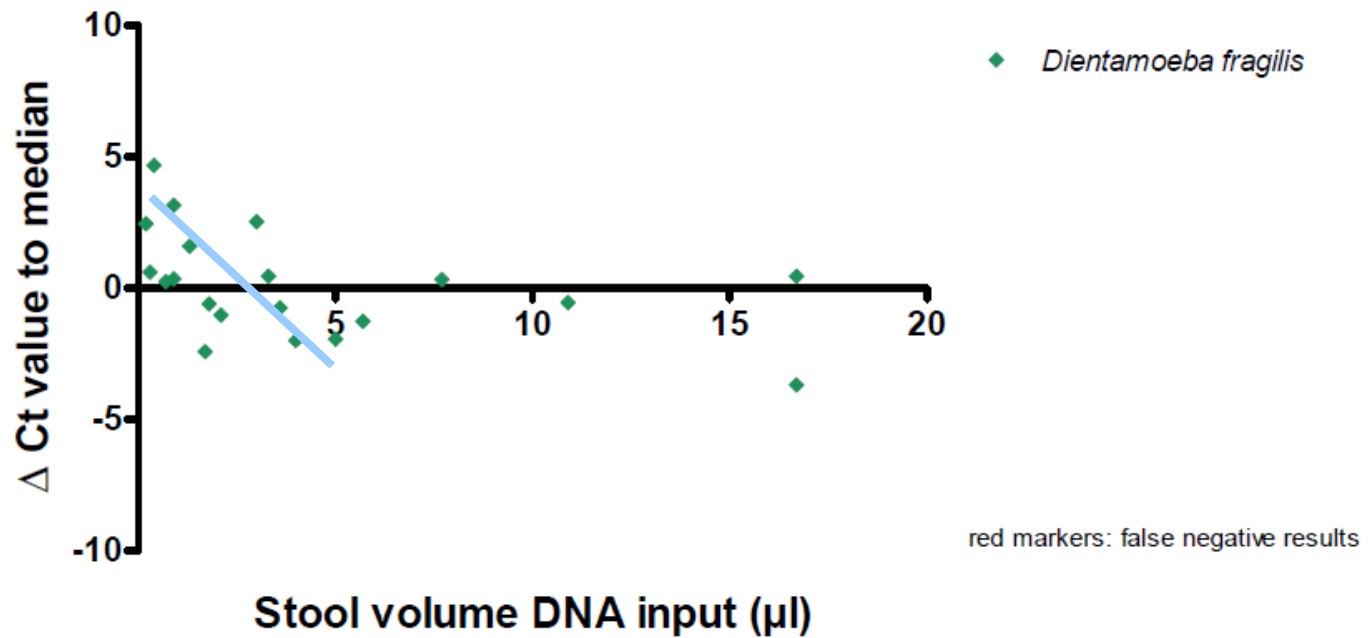
Verdiepingsvragen voorbehandeling feces

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

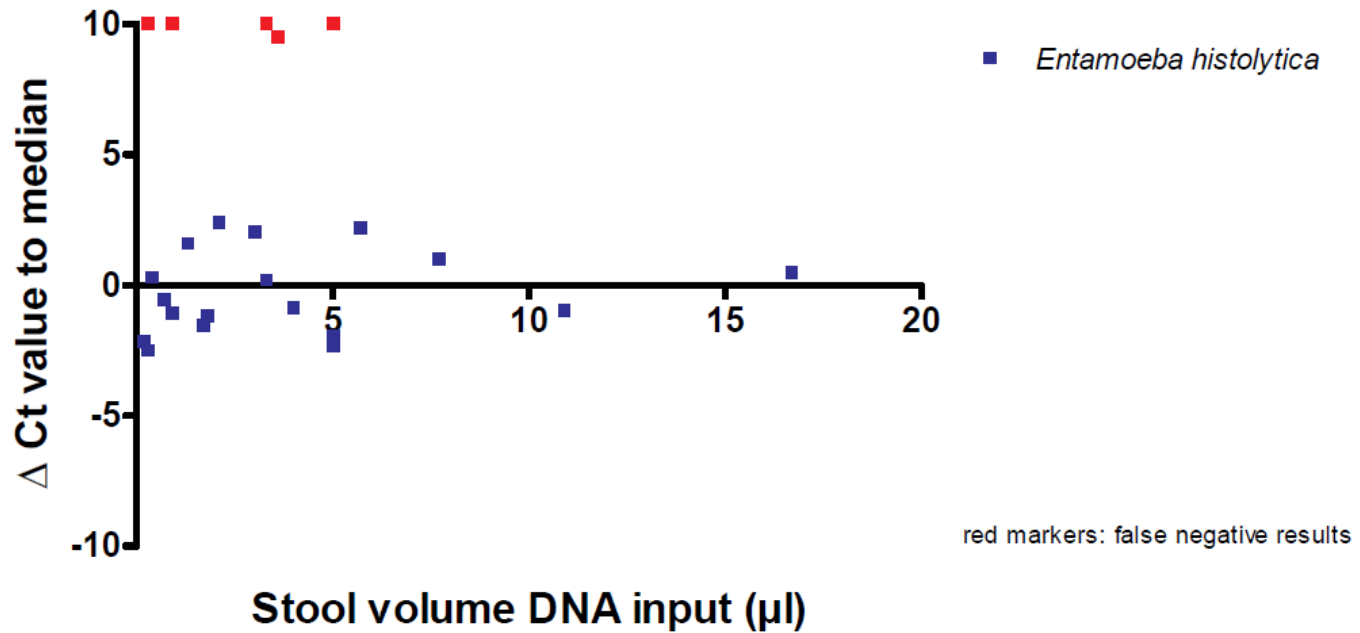
G. lamblia : input PCR



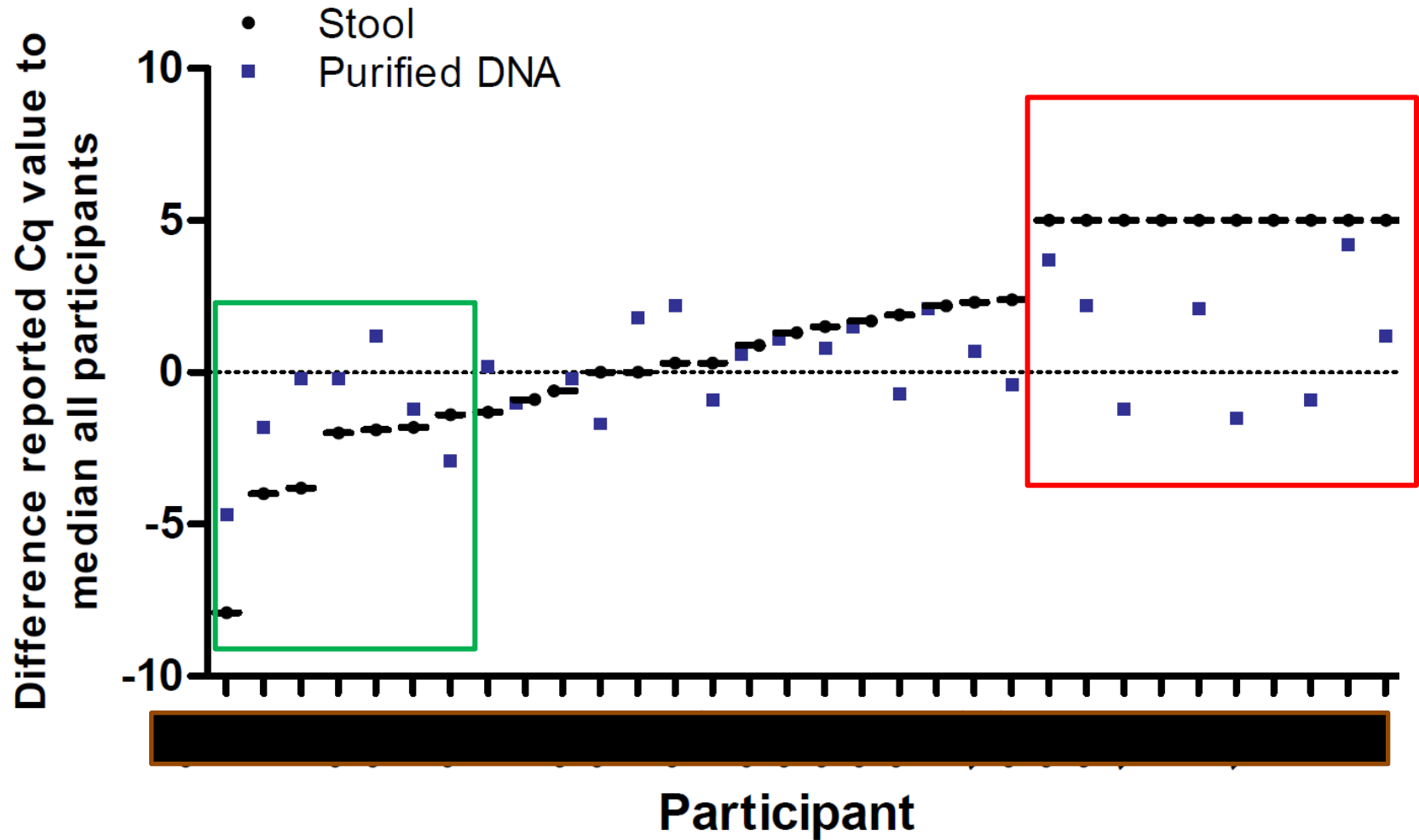
D. fragilis : input PCR



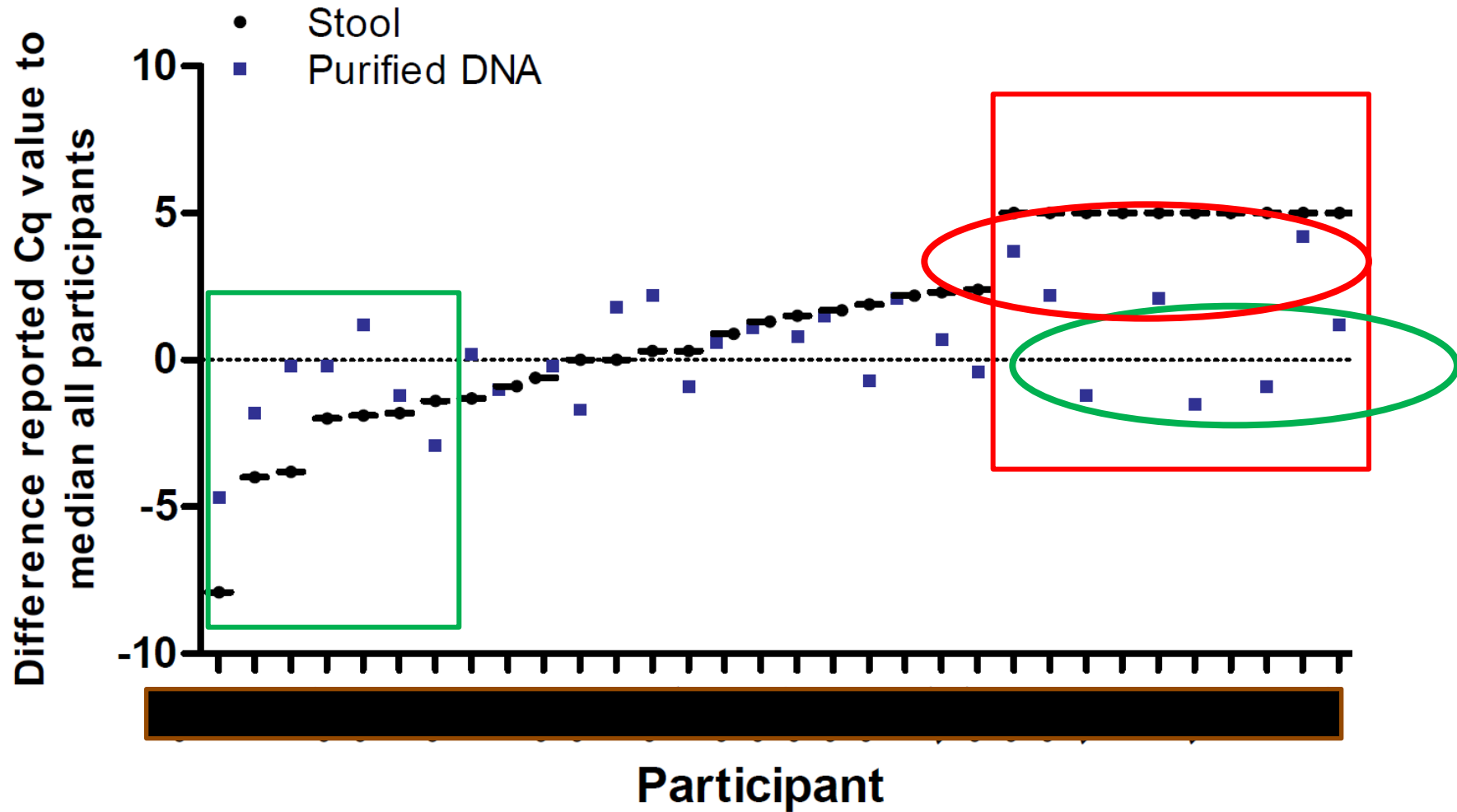
E. histolytica : input PCR



E. histolytica uitslagen feces en gezuiverd DNA



E. histolytica uitslagen feces en gezuiverd DNA



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

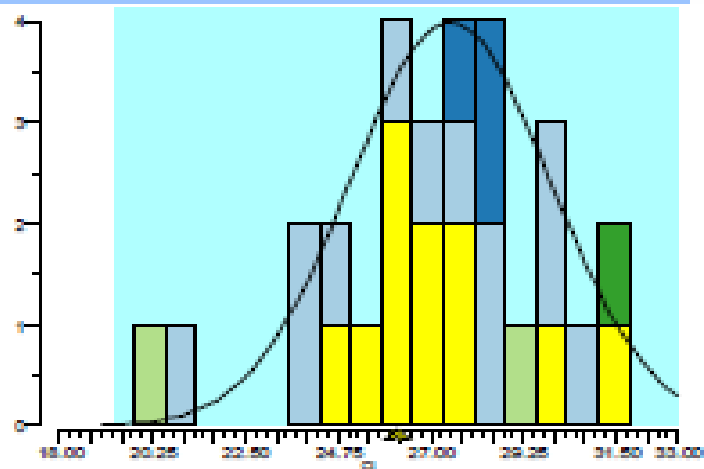
Clin Chem Lab Med 2018; 56(10): 1722–1727

DE GRUYTER

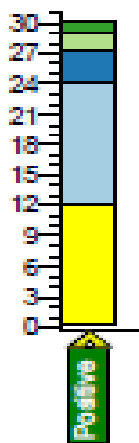
Theo A. Schuurs^a, Rob Koelewijn, Eric A.T. Brienens^a, Titia Kortbeek^a, Theo G. Mank^a, Bert Mulder^a, Foekje F. Stelma^a, Lisette van Lieshout^a and Jaap J. van Hellemond^{a,*}

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

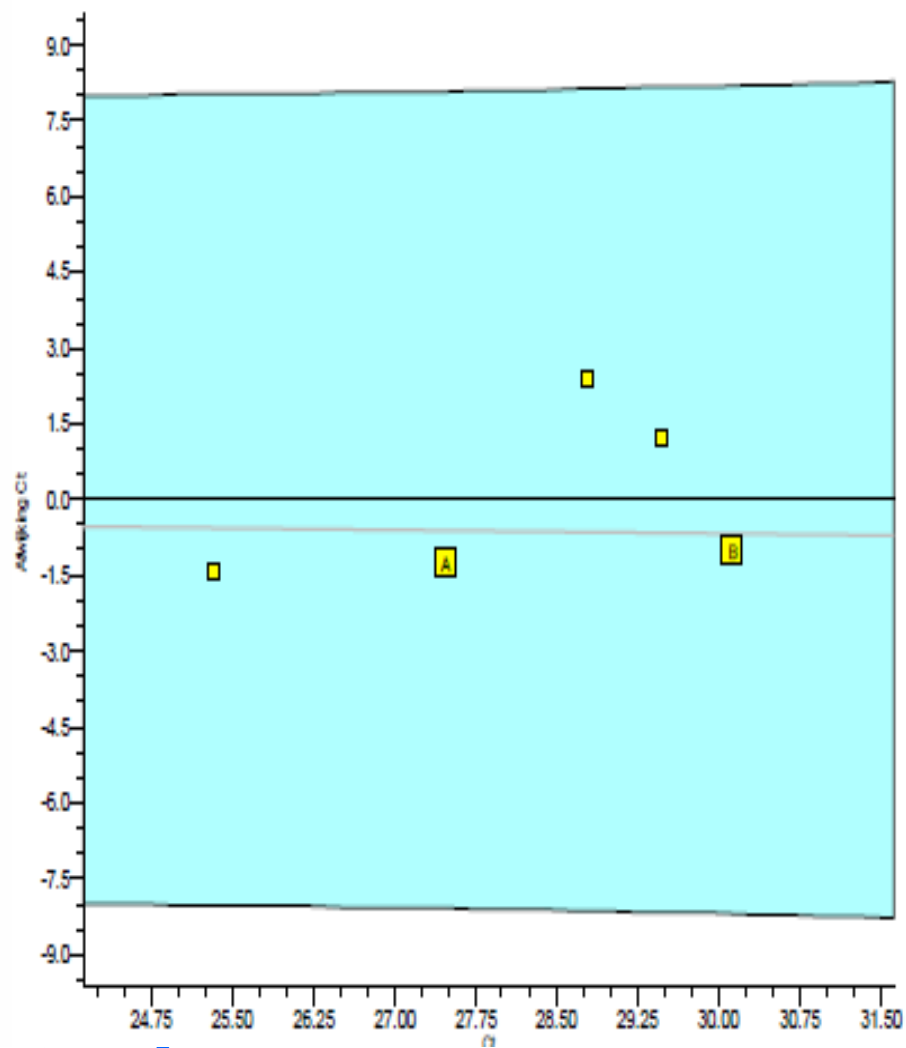
2014.2 A



	cons.	meth.	ALTM	lab
mean	27.5	27.2	27.5	26.2
SD	2.4	2.0	2.4	
n	29	11	29	
no	1	0	1	



score : 2



	2014.2	cumulative
Trueness	-4.0%	-2.3%
Precision	0.87%	4.4%
Number	2	6
Outliers	0	0
Regression line		$0.0 + 0.978.x$
Consensus group	Overall	
Method	SSU rRNA (Verweij 2004 JCM)	

Helminth Moleculaire Diagnostiek

Pilot study Helminth External Molecular Quality Assessment Scheme (HEMQAS)



Aim molecular EQAS :

- distribution of real pathogens in stool
 - > no lyophilized material nor DNA in artificial matrix
- high quality: stable and reproducible samples
- challenging loads suitable for molecular diagnostics
 - > ethanol preservative for long stability

Study design and sample validation

Panel: Hookworm (*N. americanus* & *Ancylostoma* spp.), *Ascaris* spp.,
Trichuris trichiura, *Strongyloides stercoralis*, *Schistosoma* spp.

Specimens: Stool; field samples (microscopy examined & ethanol preserved)
DNA; purified from isolated adult worms

SKML EQAS
coordinating center parasitology



Stool & DNA sample collection

Stool: Gent University

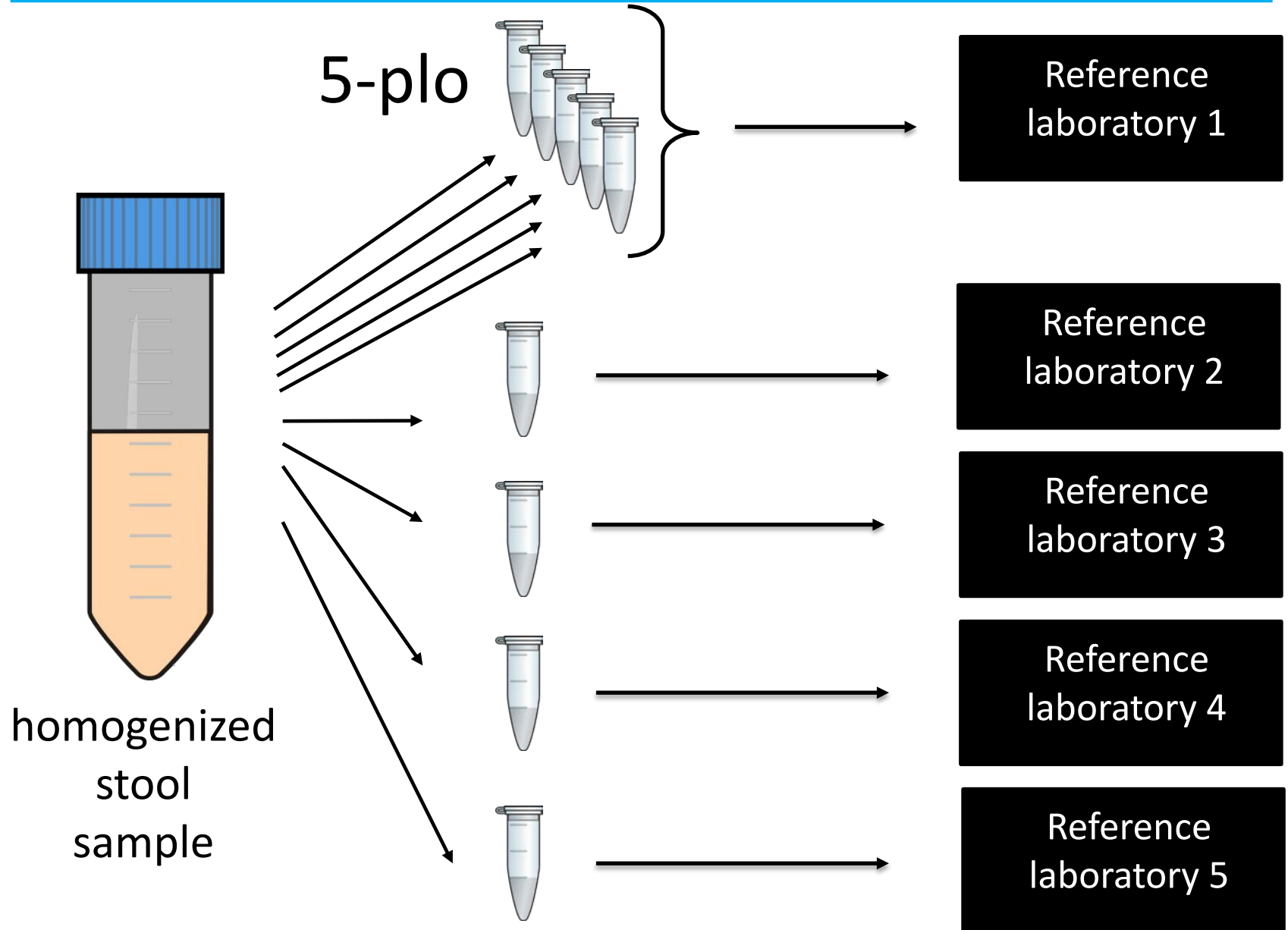
DNA: ETZ Tilburg, Erasmus MC, LUMC



Preparation of
EQAS sample
(Stool & DNA)



Stool / DNA samples



6 Reference Laboratories

BCM
Baylor College of Medicine

**SMITH
COLLEGE**

et·z

**LU
MC**

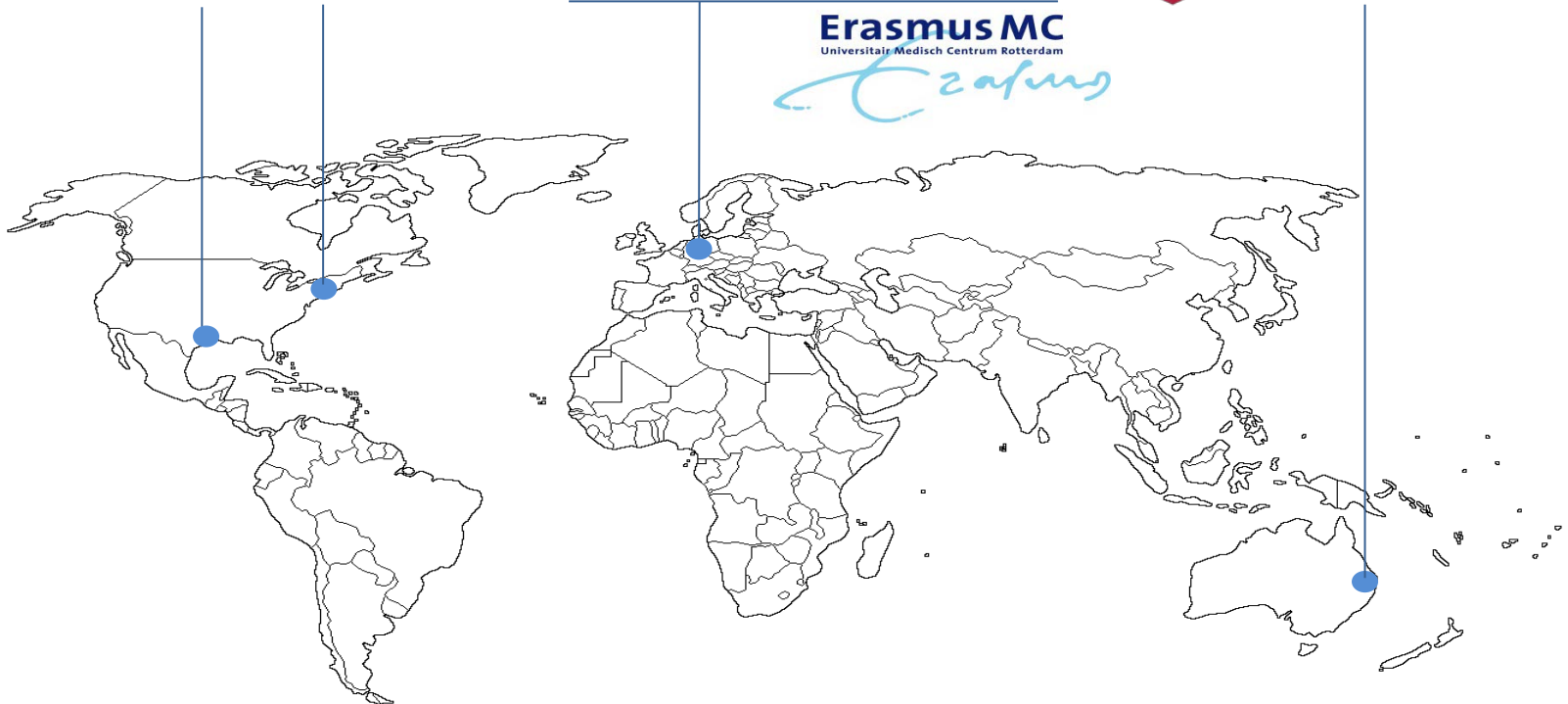
Leiden University
Medical Center



QIMR Berghofer
Medical Research Institute

Erasmus MC
Universitair Medisch Centrum Rotterdam

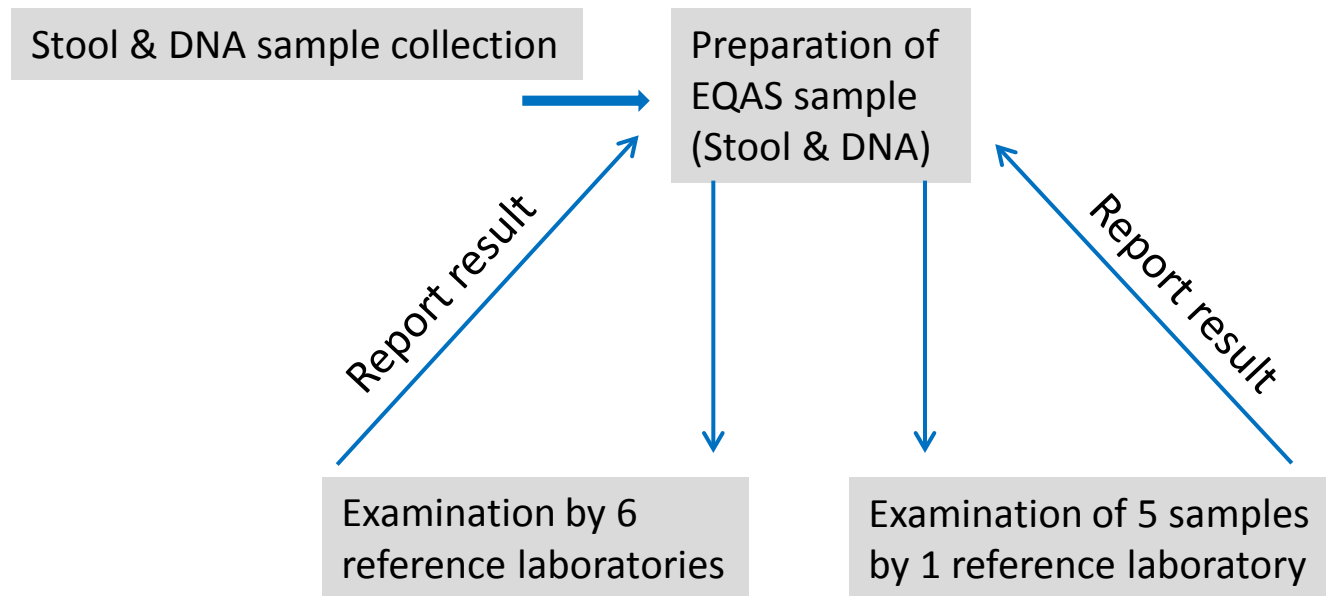
Erasmus



Study design and sample validation

Panel: Hookworm (*N. americanus* & *Ancylostoma* spp.), *Ascaris* spp.,
Trichuris trichiura, *Strongyloides stercoralis*, *Schistosoma* spp.

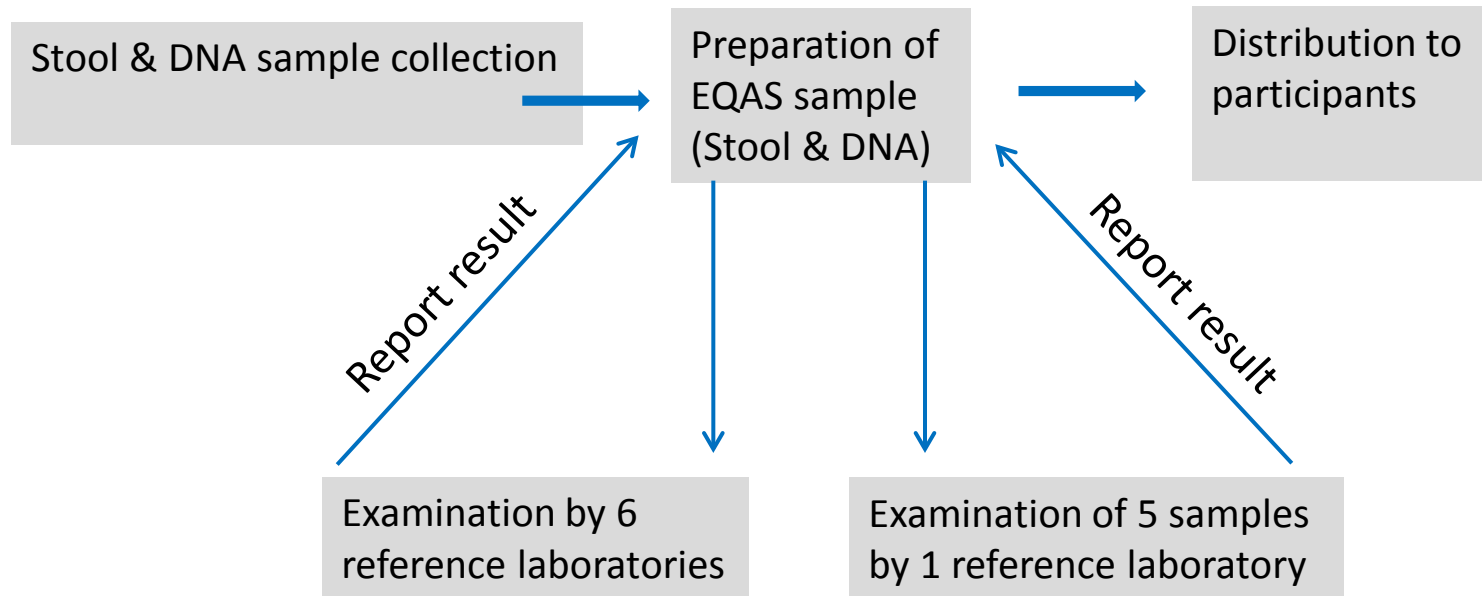
Specimens: Stool (preserved in ethanol) & purified DNA



Study design and sample validation

Panel: Hookworm (*N. americanus* & *Ancylostoma* spp), *Ascaris* spp, *Trichuris trichiura*, *Strongyloides stercoralis*, *Schistosoma* spp

Specimens: Stool (preserved in ethanol) & purified DNA



6 Reference Laboratories



Pilot EQAS distribution

Blinding of specimens
&
Distribution to:

6 reference laboratories
+
9 other laboratories
=
15 participants

Qbase

Software for reported results
Blinding to coordinator

Conclusions pilot HEMQAS

1. Validated stool & DNA samples can be prepared
 2. World wide EQAS distribution and reporting is feasible
 3. Substantial number of false negative and false positive results are reported for well validated, homogeneous samples
 4. Reported Cq values differ > 10 cycles ($= 2^{10} = 1000$ fold !)
 5. Cause of variations will be investigated by analysis of differences in methods
 6. Need for quality control (and harmonisation) for NAAT methods detecting helminths in stool
- Helminth Molecular EQAS will be started in 2019 by SKML

Acknowledgements



WELLCOME TRUST RESEARCH LABORATORY
Division of Gastrointestinal Sciences



Trichomonas Moleculaire Diagnostiek

- Start 2015
- Urine of urogenitale SWAB oplossingen
- Uitdagende parasieten concentraties
- Goede resultaten
 - 2017: 8 materialen, 30 deelnemers 100% score!

2019 pilot voor inclusie bacteriële SOA (Chlamydia & Neisseria)

- Zelfde prijs en materialen
- Detectie van 3 pathogenen ipv 1

Dankwoord

Coördinatie laboratorium (Erasmus MC)

- Rok Koelewijn
- Nicolette v.d. Ham

Volledige SKML sectie parasitologie
met name:

- Theo Schuurs (IZORE)
- Lisette van Lieshout (LUMC)

Jaco Verweij (ETZ)