Erasmus MC
University Medical Center Rotterdam

Validatie en borging van kwaliteit in de moleculaire parasitologie

Dr. Jaap van Hellemond
Afd. Medische Microbiologie & infectieziekten
Erasmus MC, Rotterdam

Resultaten externe QC moleculaire diagnostiek SKML 2013-2017

Erasmus MC

	Giardia lamblia	N	*Cryptosporidium spp*	N	*Entamoeba histolytica*	N	*Dientamoeba fragilis*	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)

+ ca. 1-2% false positive results

Molecular methods are not perfect.

Resultaten externe QC
Microscopische diagnostiek SKML 2017

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%)
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%)
2017-4	A	P. vivax	74/77 (96%)
	B	P. ovale	70/77 (91%)
	C	Echinococcus spp. (cyste inhoud)	52/53 (98%)

No method is perfect

Validatie en borging is dus voor alle methoden heel belangrijk.

Validatie:

Hoe weten we zeker dat :
de onderzoeksmethode meet wat deze zou moeten meten

Borging:

Hoe weten we zeker dat :
de onderzoeksmethode ook altijd meet wat deze zou moeten meten?

Validatie

Nieuwe onderzoeksmethode wordt vergeleken met de gouden standaard.

Wat is de gouden standaard voor onderzoek naar parasitaire infecties?

- Microscopie
- Antigeentesten
- Serologie
- Combinaties van bovenstaande methoden (+ wel/niet incl. mol. diag.) ?

Voorbeeld 1

ORIGINAL ARTICLE 10.1111/j.1469-0691.2009.02894.x

Parasitological diagnosis combining an internally controlled real-time PCR assay for the detection of four protozoa in stool samples with a testing algorithm for microscopy

L. E. S. Bruijnesteijn van Coppenraet[1], J. A. Wallinga[1], G. J. H. M. Ruijs[1], M. J. Bruins[1] and J. J. Verweij[2]

1) *Laboratory of Medical Microbiology and Infectious Diseases, Isala Clinics, Zwolle and* 2) *Department of Parasitology, Centre of Infectious Diseases, Leiden University Medical Centre, Leiden, The Netherlands*

Erasmus MC

TABLE 2. **Results of microscopy of complete Triple Faeces Test sets and paraPCR for individual unpreserved stool samples (n = 397)**

Target	Microscopy$^+$/ PCR$^+$	Microscopy$^+$/ PCR$^-$	Microscopy$^-$/ PCR$^+$	Microscopy$^-$/ PCR$^-$
Entamoeba histolytica	1	–	–	396
Giardia lamblia	28	1[a]	16	352
Cryptosporidium parvum/hominis	2	–	1	394
Dientamoeba fragilis	64	5	58	270

Microscopic re-examinations of discrepant samples are not included. Results of repeated paraPCR of initially inhibited samples are included. The protozoa in mixed infections are presented as separate detections.

[a]One PCR inhibited sample was positive for *G. lamblia* by microscopy and is included in the Microscopy$^+$/PCR$^-$ results for *G. lamblia*.

PCR meer positieve resultaten, interpretatie ; sensitiever

Onderbouwing hogere sensitiviteit PCR

Erasmus MC

Verdunningsreeksen voor feces suspensies met *Giardia*

Table 1
Comparison of results obtained from the 4 methods, in the dilution trial.

		1:1	1:20	1:100	1:1000	1:5000	1:10,000
FEA	Percentage positive	100%	16%	0	0	0	0
	Positive/all	19/19	3/19				
	Median ± 25–75%	50 ± 0–150	0	0	0	0	0
SSF	Positive/all	79% 15/19	37% 7/19	5% 1/19	0	0	0
	Median ± 25–75%	350 ± 200–500	150 ± 100–150	NA	0	0	0
IFA	Positive/all	100% 19/19	100% 19/19	95% 18/19	84% 16/19	47% 9/19	26% 5/19
	Median ± 25–75%	76,700 ± 56800–121,100	43,300 ± 21100–71,400	9400 ± 3700–16,900	700 ± 400–2000	300 ± 200–500	100 (NA)
qPCR	Positive/all	100% 19/19	100% 19/19	100% 19/19	47% 9/19	32% 6/19	11% 2/19
	Median ± 25–75%	316,200 ± 281,800–631,000	31,600 ± 5000–39,800	3500 ± 2200–10,000	1000 NA	1000 NA	1000 NA

FEA: feces after formol-ethylacetate
SSF: salt–sugar flotation
IFA: immune fluorescence

Lund et al 2016 DMID

Erasmus MC

TABLE 2. **Results of microscopy of complete Triple Faeces Test sets and paraPCR for individual unpreserved stool samples (n = 397)**

Target	Microscopy$^+$/ PCR$^+$	Microscopy$^+$/ PCR$^-$	Microscopy$^-$/ PCR$^+$	Microscopy$^-$/ PCR$^-$
Entamoeba histolytica	1	–	–	396
Giardia lamblia	28	1[a]	16	352
Cryptosporidium parvum/hominis	2	–	1	394
Dientamoeba fragilis	64	5	58	270

Microscopic re-examinations of discrepant samples are not included. Results of repeated paraPCR of initially inhibited samples are included. The protozoa in mixed infections are presented as separate detections.

[a]One PCR inhibited sample was positive for *G. lamblia* by microscopy and is included in the Microscopy$^+$/PCR$^-$ results for *G. lamblia*.

PCR meer positieve resultaten, interpretatie ; sensitiever

Microscopie + en PCR -; ??

Voorbeeld 2

Contents lists available at ScienceDirect

Clinical Microbiology and Infection

journal homepage: www.clinicalmicrobiologyandinfection.com

Original article

Evaluation of a new multiplex PCR assay (ParaGENIE G-Amoeba Real-Time PCR kit) targeting *Giardia intestinalis*, *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*/*Entamoeba moshkovskii* from stool specimens: evidence for the limited performances of microscopy-based approach for amoeba species identification

F. Morio [1,*], S. Valot [2], A. Laude [1], G. Desoubeaux [3], N. Argy [4], C. Nourrisson [5], C. Pomares [6], M. Machouart [7], Y. Le Govic [8], F. Dalle [2], F. Botterel [9], N. Bourgeois [10], E. Cateau [11], M. Leterrier [12], F. Jeddi [1], M. Gaboyard [13], P. Le Pape [1]

Karakteristiek resultaat voorbeeld

Table 2
Performances of the ParaGENIE G-Amoeba Real-Time multiplex PCR assay for the detection of *Giardia intestinalis*, *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar/Entamoeba moshkovskii* ($n = 168$ stool samples)

	Positive by microscopy and multiplex PCR	Positive by microscopy but negative by multiplex PCR	Negative by microscopy but positive by multiplex PCR	Negative by both microscopy and multiplex PCR
Giardia intestinalis	33	4[a]	6[b]	125
Entamoeba dispar/Entamoeba moshkovskii	10	5[c]	9[d]	144
Entamoeba histolytica	2	3[e]	2[f]	161

Note: 'Microscopy' refers to the findings of the reference panel and includes the findings of adhesin detection by ELISA on stools.
[a] These samples, all processed by well-trained microscopists contained only a few cysts per slide (i.e. false-negative by PCR).
[b] Two were confirmed positive by the external PCR assay (false-negative by microscopy). The four remaining could not be confirmed positive (false-positive by the ParaGENIE assay).
[c] One positive for *E. dispar* by the external assay (i.e. false-negative *E. dispar* by the ParaGENIE assay). The others were negative ($n = 2$, i.e. false-positive *E. dispar* by microscopy) or positive for *E. histolytica* ($n = 2$, i.e. false-negative *E. histolytica* by microscopy) by the external assay.
[d] All were positive for *E. dispar* by the external PCR assay (i.e. false-negative *E. dispar* by microscopy).
[e] Two were confirmed positive for *E. histolytica* by the external PCR assay (false-negative by the ParaGENIE PCR assay). The remaining sample was categorized as a false-positive *E. histolytica* by microscopy (external PCR being positive for *E. dispar*).
[f] Both were positive for *E. histolytica* by the external PCR (i.e. false-negative *E. histolytica* by microscopy).

PCR meer positieve resultaten, interpretatie ; sensitiever

Microscopie soms ook positief met negatieve PCR, interpretatie ?

Karakteristiek resultaat voorbeeld

Table 2
Performances of the ParaGENIE G-Amoeba Real-Time multiplex PCR assay for the detection of *Giardia intestinalis*, *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar/Entamoeba moshkovskii* ($n = 168$ stool samples)

	Positive by microscopy and multiplex PCR	Positive by microscopy but negative by multiplex PCR	Negative by microscopy but positive by multiplex PCR	Negative by both microscopy and multiplex PCR
Giardia intestinalis	33	4[a]	6[b]	125
Entamoeba dispar/Entamoeba moshkovskii	10	5[c]	9[d]	144
Entamoeba histolytica	2	3[e]	2[f]	161

Note: 'Microscopy' refers to the findings of the reference panel and includes the findings of adhesin detection by ELISA on stools.
[a] These samples, all processed by well-trained microscopists contained only a few cysts per slide (i.e. false-negative by PCR).
[b] Two were confirmed positive by the external PCR assay (false-negative by microscopy). The four remaining could not be confirmed positive (false-positive by the ParaGENIE assay).
[c] One positive for *E. dispar* by the external assay (i.e. false-negative *E. dispar* by the ParaGENIE assay). The others were negative ($n = 2$, i.e. false-positive *E. dispar* by microscopy) or positive for *E. histolytica* ($n = 2$, i.e. false-negative *E. histolytica* by microscopy) by the external assay.
[d] All were positive for *E. dispar* by the external PCR assay (i.e. false-negative *E. dispar* by microscopy).
[e] Two were confirmed positive for *E. histolytica* by the external PCR assay (false-negative by the ParaGENIE PCR assay). The remaining sample was categorized as a false-positive *E. histolytica* by microscopy (external PCR being positive for *E. dispar*).
[f] Both were positive for *E. histolytica* by the external PCR (i.e. false-negative *E. histolytica* by microscopy).

PCR meer positieve resultaten, interpretatie ; sensitiever

Microscopie soms ook positief met negatieve PCR, interpretatie ?

Validatie

Wat is de gouden standaard voor onderzoek naar parasitaire infecties?

Interpretatie discrepanties tussen resultaten verschillende methoden:

1) PCR is zo superieur tov overige methoden dat alle discrepanties fouten in de andere methode zijn

‘Fout negatieve resultaten overige methoden’: sterk bewijs

‘Fout positief resultaat overige methoden’: minder bewijs

→ externe QC rondzendingen bevestigen het voorkomen van zowel fout positieve (ca. 1-2 %) als fout negatieve resultaten (ca. 1-10%)

Fout positieve NAAT resultaten

Oorzaken:

Niet systematische oorzaken:
- Sample technisch probleem (contaminatie, handling error)

Systematische oorzaken?
- Kruisreacties indien primers & probe niet specifiek genoeg (?)

Fout negatieve NAAT resultaten

Oorzaken:

Niet systematische oorzaken:
- Sample technisch probleem (inhibitie, handling error)

Systematische oorzaken?
- Niet optimale sensitiviteit (presentatie Theo Schuurs)
- Detecteren primers & probe alle genotypen/species detecteren (?)

Genomische informatie parasieten

1) Betrouwbaarheid van genomische entries in database in het algemeen

2) Tov overige micro-organismen

- Weinig entries
  - Niet/moeilijk kweekbaar
  - Grote genomen (kostbaar) → kleine stukjes
  - Geen systematische en continue monitoring (zoals virologie)
- Genotype bias
  - isolaten uit westerse wereld terwijl reservoir in de tropen

Mogelijk systematisch fout negatieve resultaten ??
Is dit een probleem ? → selectie voordeel (conform HRP2 neg *P. falciparum*)
vaak/soms geen 'klinisch vangnet'

Genomische informatie parasieten

Tov overige micro-organismen

- Weinig informatie over vrijlevende/niet parasitaire verwante eukaryoten species

Mogelijk systematisch fout positieve resultaten ??

Is dit een probleem ? → over behandeling ?
andere oorzaak gemist ?

Genomische informatie parasieten

Is de beschikbare informatie voldoende voor uitsluiting systematische fouten ?

Is structurele monitoring nodig en zo ja hoe?

aanvullende techniek ?

structureel sequencing ?

Verificatie en validatie

ISO 15189 norm:

1) Verificatie voor “gevalideerde onderzoeksprocedures” die niet gewijzigd zijn!
   Objectief bewijs door laboratorium dat prestatie claims juist zijn.

2) Validatie voor alle overige onderzoeksprocedures
   Kwalitatief
   - analytische en diagnostische specificiteit en sensitiviteit,
   - detectielimiet

   Kwantitatief
   - juistheid,
   - accuraatheid,
   - precisie (incl. herhaalbaarheid en meetonzekerheid)
   - kwantificatielimiet (incl. meetinterval)

Verificatie en validatie

ISO 15189 norm:

1) Verificatie voor “gevalideerde onderzoeksprocedures” die niet gewijzigd zijn!
   Objectief bewijs door laboratorium dat prestatie claims juist zijn.

Wat is ongewijzigd?

Aanpassing aan lokale work flow
- Voorbehandeling (lysisbuffer, additieven, vries-dooi, etc.)
- Standaardisatie annealing temperatuur (met mogelijk aanpassing primer/probe)
- Standaardisatie PCR cycli

Verificatie en validatie

Erasmus MC

ISO 15189 norm:

1) Verificatie voor “gevalideerde onderzoeksprocedures” die niet gewijzigd zijn!
   Objectief bewijs door laboratorium dat prestatie claims juist zijn.

Wat is ongewijzigd?

Aanpassing aan lokale work flow
- Voorbehandeling (lysisbuffer, additieven, vries-dooi, etc.)
- Standaardisatie annealing temperatuur (met mogelijk aanpassing primer/probe)
- Standaardisatie PCR cycli

Externe QC laat zien dat er grote verschillen in performance zijn tussen laboratoria, die wel dezelfde apparatuur en DNA targets gebruiken

Verificatie

Erasmus MC

Commerciële testen waren niets wordt veranderd

- GeneXpert, Hologic Panther, etc.

Trend observatie in SKML externe QC
- Toename in gebruik commerciële systemen

Problemen:
- Geen inzicht in ‘pimer/probes’ ; geen inzicht in kwaliteit van onderzoek !!
- Voor verificatie is veel positief materiaal nodig
  → voor veel parasitaire infecties is dit zeer beperkt!

Oplossing ??

Validatie

Validatie voor alle overige onderzoeksprocedures

Kwalitatief

- analytische en diagnostische specificiteit en sensitiviteit,
- detectielimiet

Beter inzicht in de 'in silico' karakteristieken van onderzoek,

maar langere ISO eisenlijst
→onmogelijk om aan te voldoen vanwege beperkte beschikbaarheid POS materiaal ??

Wat zou hier een oplossing kunnen zijn?

- Confirmatie positieve bevindingen (Cq < 30) met andere techniek?
  - Minimalisering fout positieve resultaten
- Combinatie onderzoek met andere technieken in 3^{e} lijns expertise centra
  - Minimalisering fout negatieve resultaten

Borging

Alle ISO 15189 systematiek:

- Negatieve controles
- Positieve controles
  - moet dit altijd een materiaal controle zijn, of is DNA controle voldoende?
  - beschikbaarheid positief materiaal !

- Deelname externe QC
  - Niet voor alle PCRs beschikbaar (*Leishmania, Acanthamoeba*, etc.)
  - Uitwisseling andere labs met zelfde techniek of confirmatie met andere techniek?

Klinische aspecten borging/validatie

Voorgaande punten betreffen technische aspecten

- Hoe betrouwbaar is onderzoek X naar parasiet Y

Klinische aspecten:

Wat voor onderzoek vraagt een arts aan bij welke symptomen?

Koorts uit de tropen

Erasmus MC

Onderzoek naar malaria

PCR onderzoek naar malaria (hoog sensitief voor *Plasmodium*)

Maar parasitaire DD is breder (Medische Parasitologie, NVP 2017):

- Malaria
- Acute schistosomiasis
- Trypanosomiasis
- Viscerale leishmaniasis

- Spirocheten (relapsing fever/borreliosis)

Volstaat een moleculair diagnostisch negatief resultaat voor malaria bij koorts uit tropen?

Chronische diarree

Erasmus MC

Onderzoek naar darmparasieten

PCR onderzoek naar *Giardia, Cryptosporidium, Entamoeba histolytica*

+ tropen reisanamnese of immuun gecompromitteerd

Voorstel NvMM richtlijn: aanvullend onderzoek nodig

parasitaire DD is breed:
- worminfecties
- Overige protozoa (cyclosporiasis, isosporiasis, sarcocystose, balantidiasis)
- Opportunisten (microsporidiosis)

Kan moleculair diagnostisch onderzoek alles dekken?
Zo nee, is dat acceptabel of zijn aanvullende technieken nodig?

Erasmus MC

Bij vervanging van allround onderzoek door hoog sensitief maar ‘smaller’ onderzoek:

Is het erg als door de diagnostische work-flow sommige exotische parasitaire infecties nooit gedetecteerd kunnen worden?

- Antwoord is afhankelijk van
  - setting (1e lijn vs laatste lijn)
  - ernst van infectie

- Zijn infecties exotisch omdat deze niet voorkomen of omdat de gebruikte technieken deze niet detecteren?

Snelheid

Naast kwaliteit van onderzoek (sensitiviteit en specificiteit) is soms snelheid ook belangrijk:

Malaria

Niet alleen focus op alleen het voorkomen van fout negatief resultaat bij patiënten met niet-ernstige lage parasitaemie *P. falciparum* of non-falciparum *Plasmodium*
(kan leiden tot hoog-sensitieve maar trage diagnostiek).

Fout negatieve malaria antigeentesten komen veel minder vaak voor dan ernstige malaria!
Voor ernstige malaria is snelheid geboden!!

Malaria antigeen als snelle screening	(voor snelle detectie van ernstige malaria)
Microscopie voor parasitaemie bepaling	(sneller dan kwantitatieve PCR)

Dankwoord

Alle personen betrokken bij parasitologische rondzendingen SKML

- Sectieleden

- Rotterdam SKML team: Rob Koelewijn, Nicolette v.d. Ham, Touria Azar, Yvonne IJsselstijn