



Directe typering van *Giardia lamblia* en *Cryptosporidium* door middel van een multiplex Real-Time PCR

Direct differentiation of *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium* by Real-Time PCR



Michiel Kroes

Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu

11 november 2012 – 30 juni 2013



**Directe typering van *Giardia lamblia* en *Cryptosporidium*
door middel van een multiplex Real-Time PCR
Direct differentiation of *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium*
by Real-Time PCR**

**Michiel Kroes
November 2012 – juni 2013**

**Opleiding informatie:
Hogeschool Utrecht
Institute for Life Sciences and Chemistry
3572 JE Utrecht
Schoolbegeleider:
Ninette Tjoeng**

**Stageplaats informatie:
Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu (RIVM)
Centrum Infectieziekteonderzoek, Diagnostiek en Screening (IDS)
Afdeling Parasitologie (PAM)
3720 BA Bilthoven
Stagebegeleiders:
Dr. Jeroen Roelfsema,**



Voorwoord

In de periode november 2012 t/m juni 2013 heb ik afstudeerstage gevolgd bij het Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu afdeling parasitologie. Deze afstudeerstage heb ik gevolgd voor de opleiding Biologie en medisch laboratoriumonderzoek, afstudeerrichting microbiologie aan de Hogeschool Utrecht. Mijn afstudeeropdracht was het ontwikkelen van een Multiplex quantitative Polymerase Chain Reaction (qPCR) voor de directe typering van *Giardia lamblia* en *Cryptosporidium*. Dit verslag zal de afstudeeropdracht beschrijven.

Ik wil graag Dr. Jeroen Roelfsema bedanken voor de goede begeleiding, vele uitleg en het nakijken van het verslag. Het was een drukke hectische periode bij het RIVM tijdens mijn stage. Toch heb ik me hier thuis gevoeld en heb ik een ontzettend leuke periode achter de rug. Hiervoor wil ik iedereen van de afdeling PAM bedanken!



Samenvatting

Giardia lamblia en *Cryptosporidium* zijn veel voorkomende darmparasieten wereldwijd.

In immunocompetente patiënten zullen de infecties doorgaans niet tot ernstige complicaties leiden. Voor immunogecompromitteerde patiënten is dit bij *Cryptosporidium* niet het geval en kan de infectie chronische en levensbedreigend zijn. Beide parasieten zijn te behandelen met medicijnen, dit is in het geval van immunocompetente *Cryptosporidium* patiënten niet nodig want de infectie is daar zelflimiterend.

De detectie van deze twee parasieten wordt bij het RIVM gedaan d.m.v. een qPCR. Dit is een snelle manier, alleen in sommige gevallen is het ook van belang om het typen van de parasiet te weten voor epidemiologische doeleinden. Voor de typering van deze twee parasieten moeten bij het RIVM meerdere testen worden uitgevoerd. Dit zijn vaak dure testen die lang duren en de typering is lang niet altijd mogelijk bij alle monsters waar *G. lamblia* of *Cryptosporidium* sp. is aangetoond. Het is daarom wenselijk dat er nieuwe, snelle en goedkope testen komen voor de typering. In dit project wordt dit gerealiseerd door het ontwikkelen van twee multiplex qPCR's die in staat zijn direct een onderscheid te maken tussen de typen van de parasieten. Voor *Giardia lamblia* moet de qPCR instaat zijn om assemblage A en B van elkaar te onderscheiden. Er zijn meer assemblages dan A en B alleen deze worden niet gevonden bij humane infecties. Bij *Cryptosporidium* moet onderscheid gemaakt worden tussen de soorten *Cryptosporidium hominis* en *Cryptosporidium parvum*. Het doel was om met deze qPCR's 80% van de monsters succes te kunnen typeren.

Voor *Giardia lamblia* werden twee verschillende primersets, ontworpen door Vanni et. al. 2012, uit de literatuur gehaald om deze te testen. Deze PCR werd uitgevoerd op de klassieke manier. Testen op de LightCycler® 480 met SYBR Green maakte duidelijk dat één van de twee sets het niet goed genoeg deed op de LightCycler® 480. Daarom werd met de andere primerset doorgewerkt en hiervoor werden ook probes ontworpen. Na een aantal optimalisatietesten werd een reeks van 206 *Giardia lamblia* positieve monsters getypeerd, dit werd ook gedaan met de voorgaande methoden alleen werden hier 137 monsters getest. Met de qPCR was 68.9% succesvol te typeren, lager dan dat het doel was, maar bij de voorgaande methoden was echter maar 16.8% succesvol te typeren. De qPCR is dus wel een behoorlijke vooruitgang.

Voor de *Cryptosporidium* qPCR werd gekozen voor een primerset inclusief probes van S. J. Hadfield et al., 2011. Deze primers zijn niet specifiek maar de probes moeten het verschil maken tussen de verschillende typen. Een klassieke PCR zonder die probes is dus zinloos. Er werd daarom snel overgegaan naar de LightCycler® 480 hier bleek opeens dat de *C. parvum* reactie niet werkte en alle monsters werden aangetoond als *C. hominis*. Na meerdere dingen tevergeefs te hebben geprobeerd om de qPCR werkende te krijgen werd gekozen zelf een nieuwe qPCR te ontwikkelen. Met het uitvoeren van deze PCR werd duidelijk dat deze op precies dezelfde manier als de S. J. Hadfield PCR niet werkten. Vervolgens werd er getest met een andere set monsters. Hier werd opeens een monster positief in de *C. parvum* reactie. Dit werd herhaald met de S. J. Hadfield PCR en ook hier was het monster *C. parvum* positief. Dit betekende dat er monsterverwisseling was opgetreden in de voorgaande monsterset. Om dit te achterhalen zijn alle 448 monsters uit deze monsterset opnieuw getypeerd. Omdat er nog geen probes aanwezig waren voor de zelf ontworpen PCR werd dit gedaan met de PCR ontworpen door S. J. Hadfield. In de 448 monsters werden 18 discrepanties aangetoond. Deze discrepanties werden herhaald met de voorgaande techniek ter controle en werden allemaal bevestigd. Met de luxe van twee goed werkende qPCR's kon nu bepaald worden welke het beste was. De combinatie van de zelf ontworpen *C. hominis* reactie en de door S. J. Hadfield ontworpen *C. parvum* reactie bleek het beste te zijn. Met deze qPCR was het mogelijk 92% van de 448 monsters succesvol te typeren.



Summary

Giardia lamblia and *Cryptosporidium* are two intestinal parasites that occur often worldwide. In immunocompetent patients an infection usually won't cause serious complications. *Cryptosporidium* will be self-limiting, *Giardia lamblia* is not but there are medicines to treat the disease. In immunocompromised patients *Cryptosporidium* can cause serious complications and it could become chronic and life threatening.

At the RIVM the detection of these two parasites is done with a qPCR. This is a fast method, only sometimes it's also valuable to characterize the parasite mostly for epidemiological purposes. To accomplish this at the RIVM they had to carry out multiple tests which cost a lot of money, are time consuming and a successful characterization is not possible in many cases. New, fast and cheap tests were desired for the characterization of *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium* sp. In this project we will realize this by creating two multiplex qPCR's which will be able to directly characterize two subspecies of both parasites. The *Giardia lamblia* qPCR will be able to characterize assemblage A and B. There are more assemblages but those do not occur in human infections. The *Cryptosporidium* qPCR will be able to characterize the species *C. hominis* and *C. parvum*. There are also other *Cryptosporidium* species which can cause human infections but those will almost never occur. The goal is to be able to successfully characterize 80% of the samples.

For *Giardia lamblia* there were used two different primersets, designed by Vanni et al. 2012. With two primersets it would be possible to compare both and chose the one giving the best result. This PCR was carried out in the classic way. While testing on the LightCycler® 480 with SYBR Green it became clear that one of the primersets did not work good enough on the LightCycler® 480 so the work continued with the other primerset. Now probes could be designed and ordered. After some optimization tests it was time to characterize 206 *Giardia lamblia* positive samples and compare the result of that with the previous method. With the qPCR it was possible to successfully characterize 68.9% of the samples, lower than the goal that was set but it is still a big improvement on the previous method which was only able to characterize 16.8% of 137 samples.

For the *Cryptosporidium* qPCR we chose a primerset including probes, designed by S. J. Hadfield et al., 2011. The primers of this set were not specific, the probes included in the primerset had to distinguish the two species. Since you only measure the fluorescence of the probes in the LightCycler® 480, it doesn't matter if there is amplification with the other parasite type as long as the probes only anneal to the right parasite type. A classic PCR without the probes is meaningless. The PCR was quickly converted to the LightCycler® 480. Here we found out that the *C. parvum* reaction was completely negative and all the samples were shown as *C. hominis*. This wasn't right since there was added a sample of both parasite species. After failing to try and get the qPCR working the decision was made to design a new qPCR. The moment the testing began it became clear that this PCR failed the same way the S. J. Hadfield PCR failed. Afterwards we started testing with a different set of monsters. Here a sample became positive in the *C. parvum* reaction. This sample was confirmed to contain *C. parvum* DNA with the S. J. Hadfield PCR. This meant there had to be a failure in the documentation of the precious set of samples. To locate the discrepancies all the 448 *Cryptosporidium* samples had to be characterized again. Because there were not any probes for the self-designed qPCR yet, this was done with the S. J. Hadfield qPCR. There were found 18 discrepancies in the 448 samples, after confirming these discrepancies with the previous method it could be said with certainty that the documentation was wrong.

Now there were two working qPCR's instead of none and is it possible to compare these to determine the optimal qPCR. The combination of the self-designed *C. hominis* reaction and the *C. parvum* reaction, designed by S. J. Hadfield, was the best option. With this PCR it was possible to successfully characterize 92% of the 448 samples.



Afkortingenlijst

Bp	Basenparen
BSA	Bovine Serum Albumin
CCKL	coördinatie commissie ter gezondheidszorg
Clb	Coördinatie Infectieziektebestrijding
Cp	Crossing point
CryptoMK	Multiplex <i>Cryptosporidium</i> GP60 qPCR Michiel Kroes
CryptoSH	Multiplex <i>Cryptosporidium parvum/hominis</i> Lib13 qPCR S. J. Hadfield
CryptoTyp	Multiplex <i>Cryptosporidium</i> Typering qPCR
D.m.v.	Door middel van
DNA	Deoxyribonucleic acid
dNTP	Deoxyribonucleotide triphosphate
ddNTP	Dideoxyribonucleotide triphosphate
GIvA	Multiplex <i>Giardia lamblia</i> A/B qPCR Vanni
GP60	60 kilo Dalton Glycoproteïne
ID	Identiteit
IDS	Infectieziekteonderzoek Diagnostiek en Screening
kDa	kilo Dalton
LVI	Laboratorium voor Infectieziekten
MGB	Minor groove binder
MPX	Multiplex
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NFQ	Nonfluorescent quencher
Ntc	Negative template control
PAM	Parasitologie en mycology
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
Ptc	positive template control
qPCR	Quantitative Polymerase Chain Reaction
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
RIVM	Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu
RNA	Ribonucleic acid
SAP	Shrimp Alkaline Phosphatase
T/m	Tot en met
T.o.v.	Ten opzichten van
TBE	Tris-borate-Ethylenediaminetetraacetic acid
Tm	Smelttemperatuur
TNA	Total nucleic acid
Tp	TaqMan Probe
TPI	Triosephosphate isomerase
UV	Ultra Violet
VWS	Ministerie van Volksgezondheid, Welzijn en Sport



Inhoudsopgaven

Voorwoord	3
Samenvatting.....	4
Summary	5
Afkortingenlijst	6
1. Inleiding	9
1.1 Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu	9
1.1.1 KizSS studie	9
1.2 literatuur.....	9
1.2.1 <i>Giardia lamblia</i> (syn. <i>G. intestinalis</i> , <i>G. duodenalis</i>).....	9
1.2.2 <i>Cryptosporidium</i>	11
1.2.3 Polymerase Chain Reaction	12
1.2.4 Sequencing	15
2. Materiaal en methoden	16
2.1 DNA isolatie	16
2.2 Gel elektroforese.....	16
2.3 <i>Giardia lamblia</i>	16
2.3.1 Monsters.....	17
2.3.2 Primers en probes	17
2.3.3 Klassieke PCR	17
2.3.4 qPCR.....	18
2.4 <i>Cryptosporidium</i>	19
2.4.1 Monsters.....	19
2.4.2 Primers en probes	20
2.4.3 Klassieke PCR	21
2.4.4 qPCR.....	22
2.5 Sequencing	23
3. Resultaten.....	24
3.1 <i>Giardia lamblia</i>	24
3.1.1 Klassieke PCR	24
3.1.2 qPCR.....	25
3.1.3 Hydrolyse probe	27
3.2 <i>Cryptosporidium</i>	29
3.2.1 CryptoSH.....	29
3.2.2 CryptoMK.....	31
3.2.3 CryptoSH of CryptoMK?	32



4.	Conclusie/discussie.....	35
5.	Bronnenlijst	37
6.	Bijlagen	39
6.1	Werken in de vier V3 PCR laboratoria en de LightCyclerruimte V307	39
6.2	Het aanleveren van monsters bij de sequence faciliteit	44



1. Inleiding

Giardia lamblia en *Cryptosporidium* sp. zijn twee darmparasieten die veel voorkomen in de hele wereld (Vanni et al. 2012, T. Shirley et al., 2012). Hierdoor is het belangrijk een efficiënte manier te hebben om deze parasieten te kunnen diagnosticeren. Voor epidemiologische doeleinden is het ook van belang het typen van de parasieten te kunnen bepalen. Bij het RIVM waren er meerdere testen nodig voordat het typen van de parasiet kon worden bepaald. Deze testen werkten niet optimaal waardoor er maar een klein percentage succesvol getypeerd kon worden. Door het ontwikkelen van twee nieuwe multiplex (MPX) qPCR's voor de directe typering van *Giardia lamblia* of *Cryptosporidium* kan veel tijd en geld bespaard worden. Het doel is met de qPCR's 80% van de monsters succesvol te kunnen typeren. Voor *Cryptosporidium* zal er ook mogelijk een subtype specifieke qPCR worden opgezet die het subtype *Cryptosporidium hominis* IbA10G2 kan detecteren. Dit subtype is het meest voorkomend in de monsters die bij het RIVM binnenkomen.

1.1 Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu

Het RIVM is een onafhankelijk kennis- en onderzoeksinstituut, gericht op de bevordering van volksgezondheid en een gezond en veilig leefmilieu. Het is opgericht in 1909 en begonnen als klein laboratorium in Utrecht. In 1934 werd dit laboratorium samengevoegd met het Rijks-serologisch instituut en ontstond het Rijksinstituut voor Volksgezondheid. In 1984 was er opnieuw een samenvoeging, nu met het Rijksinstituut voor Drinkwatervoorzieningen en de Stichting Verwijdering Afvalstoffen en zo ontstond het RIVM. Nu is het een instituut waar ca. 1500 mensen werken. Jaarlijks worden er ongeveer 300 projecten gedaan.

RIVM is een agentschap van het Ministerie van Volksgezondheid, Welzijn en Sport (VWS).

Het effectief bestrijden van infectieziekten, mensen gezond houden, goede zorg bieden, de veiligheid van consumenten bewaren en een gezonde leefomgeving bevorderen. Dit zijn thema's waar het RIVM wereldwijd kennis over verzameld. Deze kennis wordt toegepast en verspreid onder de mensen die hier baat bij hebben.

Coördinatie Infectieziektebestrijding (CIb) is een onderdeel van het RIVM. Hier gaat het om effectieve preventie, hoge waakzaamheid en snelle reactie bij uitbraak. Binnen het CIb zit het centrum Infectieziekteonderzoek Diagnostiek en Screening (IDS). Binnen het IDS zit de afdeling parasitologie (PAM). Het IDS heeft een accreditatie van de coördinatie commissie ter gezondheidszorg (CCKL), dit betekent dat er een kwaliteitsgarantie is. Om een CCKL accreditatie te krijgen moeten laboratoria aan bepaalde kwaliteitseisen voldoen, deze eisen zullen regelmatig getoetst worden door CCKL in de vorm van een audit.

1.1.1 KizSS studie

Kinderdagverblijven zijn een plek waar kinderen elkaar gemakkelijk kunnen besmetten met infectieziekten. KizSS is een langdurende studie naar het voorkomen van diverse infectieziekten in kinderdagverblijven. Een onderdeel hiervan is het screenen van faeces op gastro-enteritis verwekkers. Vanuit 104 participerende kinderdagverblijven worden faeces monsters opgestuurd naar het Laboratorium voor Infectieziekten (LVI). Hier wordt TNA (DNA en RNA) uit geïsoleerd. Bij het LVI wordt een screening gedaan op de bacteriële verwekkers en een gedeelte van het TNA wordt opgestuurd naar het RIVM voor een screening op de virale en parasitaire ziekteverwekkers. Veel monsters afkomstig uit deze studie zullen gebruikt worden bij dit onderzoek (Enserink et al., 2012).

1.2 literatuur

1.2.1 *Giardia lamblia* (syn. *G. intestinalis*, *G. duodenalis*)

Giardia lamblia is een flagellaten darm protozoa van ongeveer 10-20µm die in staat is de dunne darm van veel verschillende soorten dieren te infecteren en zo giardiasis te veroorzaken (van der Giessen et al., 2006). In de dunne darm plakken de trofozoïeten aan de darmwand met een cytoskelet organel, de ventral disk. De parasiet is dus niet invasief (R. Gargantini et al., 2012). De transmissie



vindt plaats via de faecaal-orale route door het inslikken van infectieuze cysten (Vanni et al. 2012). De infectie dosis bij mensen is ongeveer 10-100 infectieuze cysten. Na uitscheiding zijn de cysten direct infectieus en kunnen weken tot maanden overleven in de buitenwereld (Almeida et al., 2010). Eenmaal geïnfecteerd zal de cyste zich ontwikkelen in een trofozoïet welke het ziektebeeld veroorzaakt. Deze trofozoïeten kunnen op hun beurt ook weer differentiëren in cysten, dit proces wordt encystatie genoemd (R. Gargantini et al., 2012). Wereldwijd wordt geschat dat er 280.000.000 geïnfecteerde mensen zijn. Jaarlijks worden naar schatting 500.000 nieuwe mensen geïnfecteerd en overleiden er 40.000 tot 100.000 (World Health Organisation 1997 (WHO)). De meeste infecties komen voor in ontwikkelingslanden door slechte sanitaire voorzieningen, maar ook in westerse landen is het een veel voorkomende parasitaire darminfecties (Verweij et al. 2003). Giardiasis komt het meest voor bij mensen tussen de 30-39 jaar en jonge kinderen (Breathnach et al., 2010).

Behandeling

Behandeling wordt over het algemeen gedaan met metronidazole, dit is een 5-nitroimidazole antibioticum. Het wordt gebruikt tegen anaerobe bacteriën en protozoa. Het antibioticum wordt in een niet toxische vorm toegediend. Deze vorm wordt opgenomen door de protozoa en wordt door verschillende reacties in de cel omgezet in de toxische vorm. Deze vorm gaat een reactie aan met verschillende cel componenten wat leidt tot celdood (Leitsch et al., 2011). Er zijn al stammen beschreven die resistent zijn tegen metronidazole. Dit kan in 20% van de infecties voorkomen. Auranofin is een medicijn die alsnog werkzaam is tegen deze resistente stammen (Noa Tejman-Yarden et al., 2013).

Diagnostiek

Over het algemeen wordt de diagnostiek gedaan door middel van microscopie. Dit is een goedkope methode waardoor er vaak voor wordt gekozen. De sensitiviteit en de specificiteit zijn echter niet zo goed en als er geen goed getrainde analist aanwezig is kan het alsnog veel geld kosten door de lange tijd die het dan kost. Daarom wordt er ook steeds vaker moleculaire diagnostiek gedaan. Deze technieken zijn duurder maar hebben wel een zeer hoge sensitiviteit en specificiteit. Omdat deze methoden duurder zijn kan er vaak niet voor worden gekozen in ontwikkelingslanden. Het uitvoeren van een multiplex PCR kan de kosten wel weer omlaag brengen omdat hier meerdere testen in één reactie worden gedaan (Nazeer et al., 2012).

Moleculair onderzoek

Moleculair onderzoek heeft aangetoond dat er tenminste acht verschillende assemblages A t/m H zijn. Morfologisch is er heel weinig tot geen verschil in de assemblages. Identificatie hiervan wordt bepaald door middel van moleculaire testen. Alleen assemblages A en B worden gevonden bij humane infecties (Vanni et al. 2012). Binnen deze twee assemblages zijn ook weer sub-assemblages geïdentificeerd AI, AII, AIII, BIII en BIV (Sprong et al. 2009). Sub-assemblage AIII komt alleen voor bij dieren. Beide assemblages veroorzaken een zelfde ziektebeeld alleen assemblage A veroorzaakt significant vaker koorts dan assemblage B (Breathnach et al., 2010). Fylogenetisch is aangetoond dat *Giardia lamblia* een van de eerst vertakte eukaryoten organismen is en dus mogelijk veel kan bijdragen aan de kennis over de basis van celprocessen (R. Gargantini et al., 2012).

Immuunsysteem

Giardia lamblia is in staat om zijn membraanantigenen aan te passen. Dit geeft de parasiet een groot voordeel in de strijd met het immuunsysteem. Door het aanpassen van de antigenen is het immuunsysteem minder snel in staat de parasiet te herkennen. *Giardia lamblia* heeft ongeveer 200 verschillende genen voor de membraan antigenen. Na een aantal generaties zal het antigeen veranderen en wordt de parasiet niet meer herkend (R. Gargantini et al., 2012).



1.2.2 *Cryptosporidium*

Cryptosporidium is een obligaat intracellulaire darmprotozoa van ongeveer 3-6 µm. Deze parasiet infecteert de epitheelcellen van de dunne darm van mensen en dieren en veroorzaakt hier cryptosporidiose (McDonald et al., 2012). Er zijn meer dan 20 *Cryptosporidium* soorten bekend waarvan *C. hominis* en *C. parvum* vooral bij mensen voorkomen. Andere soorten infecteren over het algemeen andere dieren. Een aantal van deze soorten zijn ook wel aangetoond in mensen maar dit komt niet vaak voor (Ryan et al., 2012). *Cryptosporidium* is als eerst beschreven als een verwekker van gastro-enteritis in 1976 (T. Shirley et al., 2012). *Cryptosporidium* kan al bij innamen van minder dan 10 parasieten een infectie veroorzaken en is dus behoorlijk virulent. Verspreiding gaat via de faecaal-orale route, meestal via gecontamineerd water. Tot aan 2010 waren er 185 uitbraken vanuit gecontamineerd water geïdentificeerd en beschreven. Hier tegen over staan maar 20 uitbraken veroorzaakt door gecontamineerd voedsel. Gezonde personen hebben meestal weinig last van een infectie en deze zal na een aantal weken weer weg zijn. Er kunnen een aantal weken nadat de symptomen weg zijn nog steeds infectieuze oöcysten uitgescheiden worden. De hoeveelheid uitgescheiden oöcysten kan oplopen tot 10^9 per volledige ontlasting (T. Shirley et al., 2012). Deze oöcysten zijn zeer robuust en zijn in staat om meerdere maanden te overleven in een koude en vochtige omgeving en zijn ongevoelig voor chloor (Chalmers, 2012). In juist gechloreerd recreatie wateren zijn de oöcysten in staat meer dan 10 dagen te overleven. Omdat de incubatietijd ongeveer 7 dagen is duurt het vaak lang voordat infecties gesignaleerd zijn. In deze periode zijn de oöcysten wel infectieus waardoor er veel mensen onopgemerkt geïnfecteerd kunnen worden (T. Shirley et al., 2012).

Immunogecompromitteerde patiënten en kinderen hebben een hoger risico en hier kan de ziekte een aantal maanden duren. In deze gevallen bestaat er ook een kans dat *Cryptosporidium* niet beperkt blijft tot de dunne darm maar dat deze zich verspreid naar andere delen van het lichaam. De *Cryptosporidium* kan ook voorkomen in de longen, dit is vooral in kinderen waargenomen (T. Shirley et al., 2012). *Cryptosporidium* kan diarree, uitdroging, darm krampen en mogelijk koorts veroorzaakt (Angus et al., 2012). Een infectie bij kinderen onder de 2 jaar kan leiden tot ondervoeding en groeistoornissen. Deze kinderen hebben ongeveer 10% meer kans op deze aandoeningen dan kinderen die de infectie niet hebben doorgemaakt (T. Shirley et al., 2012).

Behandeling

Behandelen van *Cryptosporidium* is lastig omdat het een intracellulaire parasiet is maar zich niet in het cytoplasma bevindt. De behandeling wordt dan ook gericht tegen de symptomen en niet zo zeer tegen de parasiet zelf. In de EU is er geen erkend medicijn gericht op de parasiet, in de US is nitazoxanide een erkend specifiek medicijn voor immunogecompromitteerde patiënten boven de één jaar (Chalmers, 2012).

Diagnostiek

De diagnostiek wordt normaal gesproken gedaan door onderzoek van de faeces. Dit kan doormiddel van het aantonen van oöcysten met behulp van microscopie dit wordt het meest gedaan, aantonen van oöcyst antigenen doormiddel van serologie of het aantonen van oöcysten DNA door middel van PCR. PCR is de meest betrouwbare test op het moment. De test is echter wel erg duur waardoor het lang niet voor elk lab mogelijk is om dit te doen. Ook is het mogelijk histologisch onderzoek te doen op een darm biopsie.

Typering wordt over het algemeen gedaan door een PCR op het gen van het 60 kDa Glycoproteïne (GP60) eiwit van *Cryptosporidium* gevolgd door sequencing. Bij amplificatie in de PCR moet het amplicon worden gesequenced om het uiteindelijke type te kunnen bepalen. Het GP60 eiwit is een membraan eiwit dat betrokken is bij het hechten en binnen dringen van de te infecteren cel (T. Shirley et al., 2012). Een techniek die ook vaak wordt gebruikt voor de typing, in plaats van sequencing, is restriction fragment length polymorphism (RFLP) (Stephen J. Hadfield et al., 2011).

1.2.3 Polymerase Chain Reaction

Klassieke Polymerase Chain Reaction

polymerase chain reaction (PCR) is een techniek die het mogelijk maakt om specifieke stukjes DNA te amplificeren. PCR is een in vitro amplificatie van kleine stukken DNA. Het amplificeren wordt uitgevoerd met gezuiverd DNA polymerase van *T. aquaticus* (*Taq* DNA polymerase). Dit enzym is thermostabiel, dit is belangrijk omdat er tijdens de PCR hoge temperaturen worden gebruikt (R. K. Saiki et al., 1988).

Bij het uitvoeren van een PCR wordt het target DNA gemixt met het *Taq* DNA polymerase, oligonucleotide primers en een voorraad aan nucleotiden voor de reactie. De primers zijn nodig voor het starten van de DNA synthese, die *Taq* DNA polymerase vervolgens gaat uitvoeren. Ze moeten hechten aan het te amplificeren DNA, om dit mogelijk te maken moet de sequentie van het target DNA dus bekend zijn.

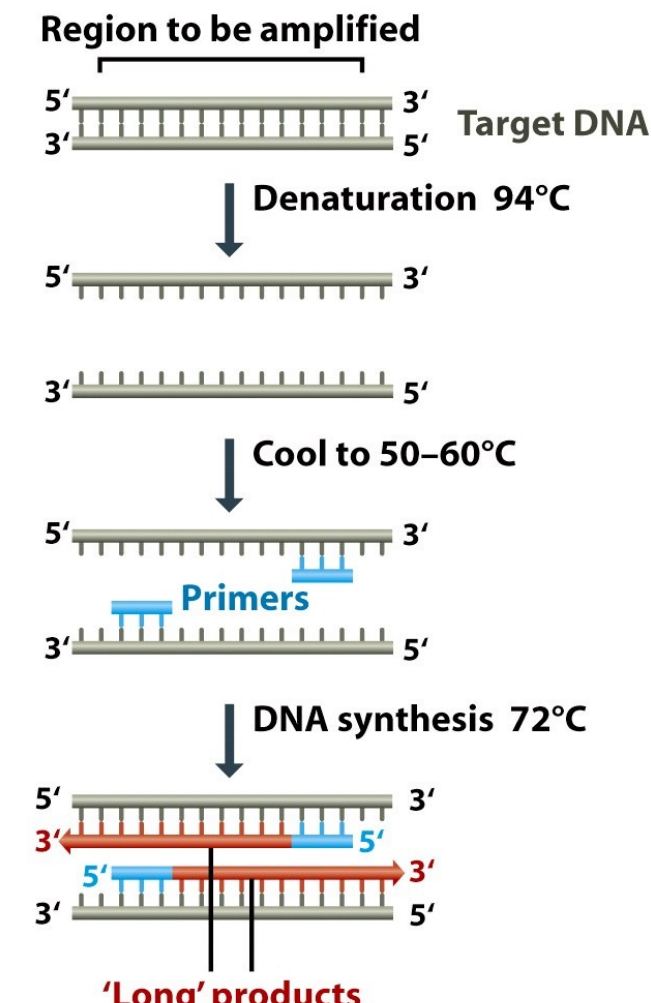
Stap 1 van de cyclus is het verwarmen van de mix tot 94-96°C. Bij deze temperatuur denatureert het DNA in twee complementaire enkelstrengs DNA moleculen. Bij stap 2 van de cyclus wordt de mix afgekoeld tot 50-60°C. De primers kunnen dan aanhechten. Stap 3 van de cyclus is het synthetiseren van de DNA streng bij de optimale temperatuur van *Taq* DNA polymerase, 72°C. Wanneer deze cyclus herhaald wordt zal de hoeveelheid target DNA exponentieel groeien. Dit kan door blijven gaan tot één van de bestandsdelen in de mix is uitgeput of tot er bestandsdelen in de mix kapot gekookt zijn. Door het gebruik van een thermostabiel DNA polymerase gebeurt het kapot koken van de mix een stuk minder snel. Na de amplificatie is er zoveel DNA dat het mogelijk is om dit amplicon te sequencen (Genomes 3).

Zonder veel moeite is het mogelijk een stuk van 5 kb te amplificeren. Als er aanpassingen worden gedaan aan de standaard techniek is het mogelijk tot 40 kb te amplificeren. Grotere stukken amplificeren gaat erg lastig worden, deze stukken zijn wel nodig voor genoom sequence projecten, hier is een PCR dus niet toepasbaar (Genomes 3).

Quantitative Polymerase Chain Reaction (qPCR)

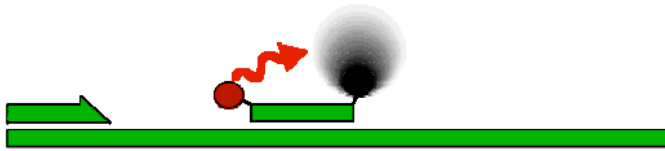
Het principe van een qPCR is hetzelfde als bij de klassieke PCR. Het verschil is echter dat tijdens de qPCR de amplificatie gevolgd kan worden. Het volgen van de amplificatie kan op meerdere manieren gebeuren. SYBR-green is een stofje dat bindt aan willekeurig dubbel strengs DNA. Op het moment dat SYBR-green kan binden aan dubbel strengs DNA zal deze een verhoogde hoeveelheid licht afgeven. Dit is echter geen specifieke methode aangezien het SYBR-green zal hechten aan al het dubbel strengs DNA. Bij een PCR ontstaat naast het PCR product ook vaak een dimeer van primers. SYBR green zal zich ook hechten aan deze primer-dimers. Daarom moet er na de PCR nog een smeltcurve analyse worden gedaan. Het PCR product zal bij een hogere temperatuur denatureren dan de primer-dimers waardoor het onderscheid gemaakt kan worden.

Het volgen van de amplificatie kan ook door middel van een hydrolyse probe ook wel TaqMan® probe genoemd. Deze probes zijn lineaire stukjes DNA die hechten aan het te amplificeren stuk DNA

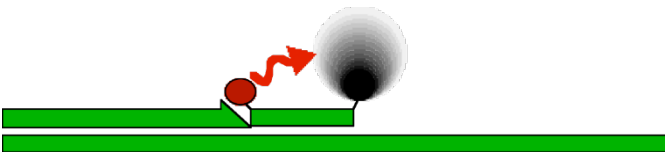


Figuur 1 De verschillende stadia van de PCR reactie (Genomes 3)

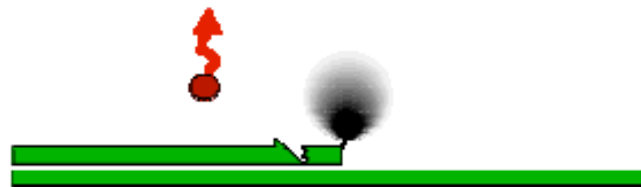
tijdens de annealing stap. De probes zijn gelabeld met een fluorochroom en een quencher. Dit fluorochroom wordt aangeslagen door licht van een bepaalde golflengte waarna het licht van een andere golflengte uitzendt. De quencher absorbeert dit uitgezonden licht. Tijdens de elongatiestap zal Taq polymerase de probe tegen komen en afbreken (Figuur 2-4). Nu wordt het licht dat het fluorochroom uitzendt niet meer geabsorbeerd door de quencher en dit leidt tot een fluorescentie toename (Figuur 5). Hoe meer PCR product er ontstaat hoe meer fluorochromen vrijkomen die ongehinderd licht kunnen uitzenden. Het signaal neemt dus toe.



Figuur 2 Een dubbel gelabelde probe hecht aan een stuk enkelstrengs DNA, het licht van de fluorochroom wordt geabsorbeerd door de quencher.



Figuur 3 Taq polymerase maakt de complementaire streng en bereikt de probe.



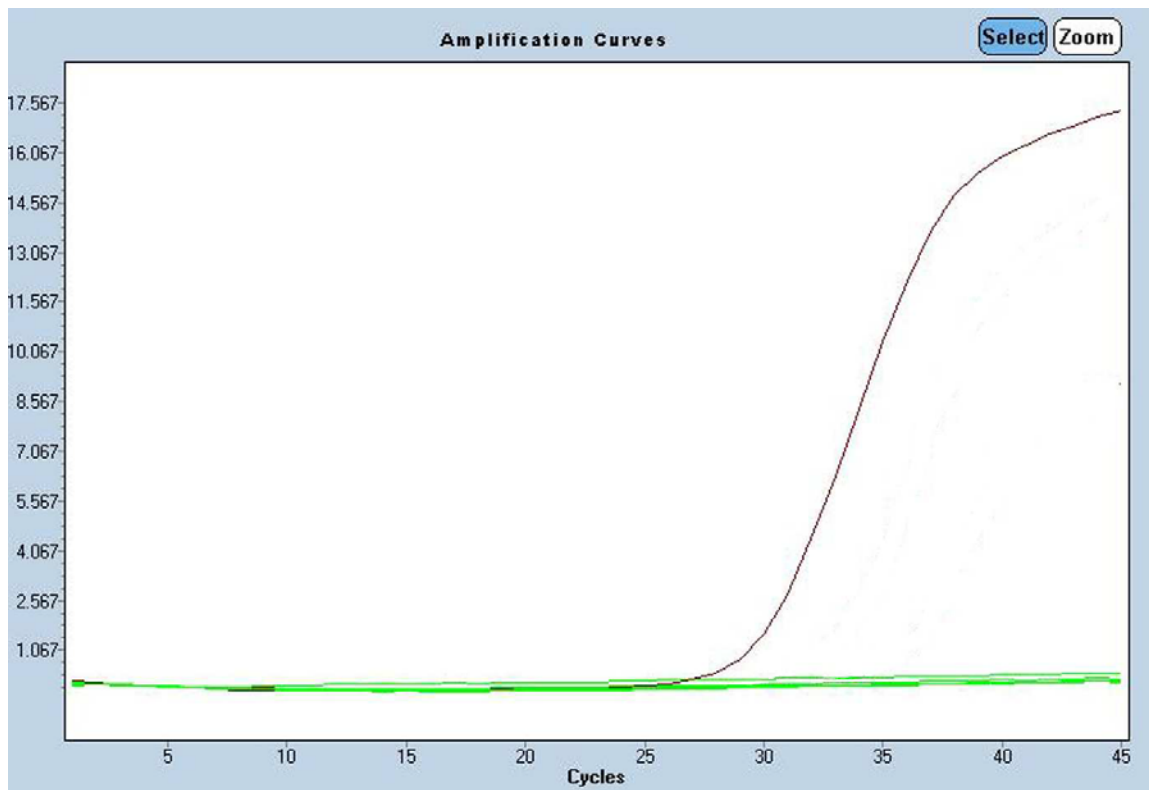
Figuur 4 Het Taq polymerase breekt de probe af en het fluorochroom komt vrij van de quencher.



Figuur 5 Het PCR product is gemaakt en het fluorochroom kan ongehinderd licht blijven uitzenden.

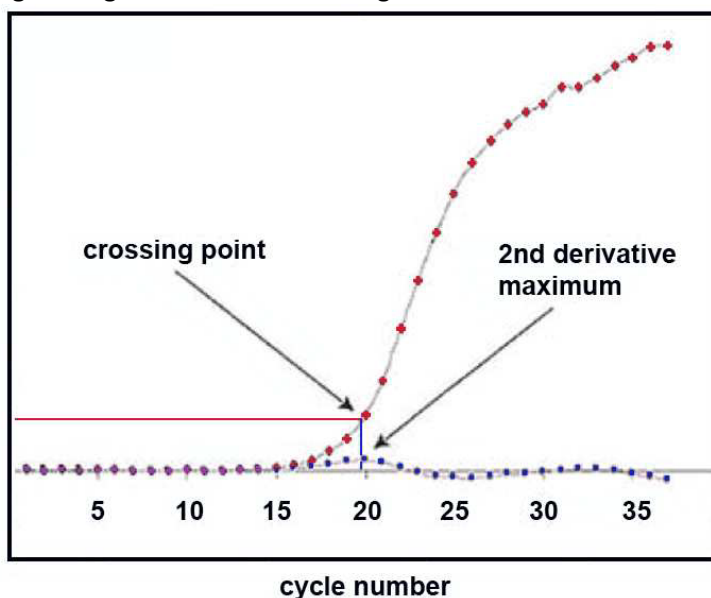


Bij een goed verlopen qPCR zal een kenmerkende S curve ontstaan (Figuur 6). De reactie loopt in eerste instantie exponentieel en raakt aan het einde uitgeput.



Figuur 6 kenmerkende S curve van een qPCR. Op de X-as zijn de cycli aangegeven en op de Y-as de hoeveelheid uitgezonden licht.

Als de monsters boven de achtergrond uitkomen dan wordt er door het programma een Cp waarde gegeven. De Cp waarde is het punt waar het product boven de achtergrond uit komt. De Cp waarde wordt berekend door het berekenen van de tweede afgeleide van de S curve (Figuur 7). De Cp waarde wordt uitgedrukt in hoeveelheid cycli die nodig zijn om boven de achtergrond uit te komen. Hoe lager het getal hoe sterker het signaal.



Figuur 7 het maximum van de tweede afgeleide van de S curve is de Cp waarde.



Multiplex qPCR

Een multiplex qPCR is een normale qPCR maar dan met meerdere reacties in één keer. Door verschillende fluorochromen op de probes te gebruiken kunnen verschillende kleuren waargenomen worden tijdens qPCR. Hierdoor kan er in één test naar meerdere targets gekeken worden.

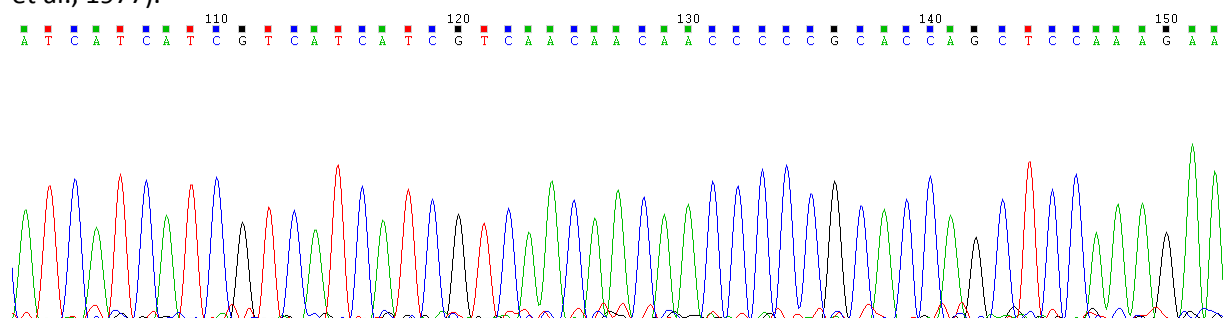
1.2.4 Sequencing

Sequencing is het bepalen van de nucleotide volgorde van een DNA

molecuul. De gebruikte sequencing methode is ontworpen door F. Sanger et al. in 1977. De sequence reactie werkt grotendeels zoals een PCR reactie, al is het een lineaire amplificatie met één primer en worden er naast de normale nucleotiden (dNTPs) ook gemodificeerde nucleotiden (ddNTPs) gebruikt. Deze ddNTPs verschillen van de normale dNTPs door het missen van de 3' –OH groep en ze hebben een gebonden fluorochroom; in tabel 1 staat welke nucleotide welke kleur fluorochroom heeft. Omdat de ddNTP geen 3' –OH groep heeft kan er na het inbouwen geen nucleotide meer worden gebonden en stopt de elongatie. Dit is een random proces waardoor er uiteindelijk heel veel verschillende DNA fragmenten zijn die allemaal net iets verschillen van lengte met als laatst gebonden nucleotiden een ddNTP. Al deze DNA producten worden vervolgens gescheiden door middel van capillair elektroforese. Dit werkt hetzelfde als gel elektroforese alleen wordt het DNA nu niet in een gel maar in een capillair gescheiden. De DNA fragmenten worden zo goed gescheiden in de capillairen dat uiteindelijk de DNA fragmenten die maar één nucleotide verschillen in lengte naast elkaar liggen. Een laser aan het eind van het capillair bepaald vervolgens de kleur van het fluorochroom en kan zo bepalen welke nucleotiden op welke plek in het DNA fragment zit. Dit levert een ABI file op, dit is een chromatogram bestand (Figuur 8) waar de uiteindelijke analyse mee gedaan kan worden (F. Sanger et al., 1977).

Tabel 1 Kleur Fluorochroom van de ddNTPs

Nucleotiden	Kleur
A	Groen
T	Rood
C	Blauw
G	Zwart



Figuur 8 Een DNA chromatogram bestand. Elke piek is een DNA fragment waaraan een ddNTP is gebonden met een fluorochroom. De pieken verschillen van hoogte, dit kan komen doordat er toevallig meer stukjes DNA waren van precies die lengte, hierdoor ontstaat er sterkere fluorescentie (Genomens 3).



2. Materiaal en methoden

2.1 DNA isolatie

Voor de isolatie van DNA uit faeces werd een kit gebruik van Roche: High Pure PCR Template Preparation Kit. Per isolatie werd ongeveer 100mg faeces gebruikt, dit is een klompje ter grootte van een halve doperwt. Dit werd gesuspendeerd in 200µl Phosphate Buffered Saline (PBS). Aan deze suspensie werd 200µl Tissue Lysis buffer en 40µl Proteïnase-K toegevoegd. Deze suspensie werd overnacht geïncubeerd in een oven van 55°C, tijdens deze overnachting werd de faeces gelyseerd door de tissue lysis buffer en werden eiwitten afgebroken door Proteïnase-K. De volgende dag werd er 200µl Binding buffer toegevoegd en dit werd geïncubeerd voor 10 minuten bij 70°C. Op deze manier werden er nog meer onzuiverheden kapot gemaakt zodat deze makkelijker gefilterd konden worden. Vervolgens werd er 100µl iso-propanol toegevoegd. Deze suspensie werd op een filterkolom gepipetteerd, hier bond het DNA aan speciale glasvezels in de filter. Het DNA werd gezuiverd door een serie van wash-and-spin stappen. Het zuivere DNA werd geëluëerd in 200µl elutie buffer van 72°C.

Tabel 2 De inhoud van de High Pure PCR Template Preparation Kit, Roche (bijsluiter kit).

Reagens	Opmerking
Tissue Lysis buffer	
Binding buffer	
Inhibitor removal buffer	Bij aanbreken van de kit 20 ml ethanol (100%) toevoegen.
Washing buffer	Bij aanbreken van de kit 80 ml ethanol (100%) toevoegen.
Elutie buffer	Voor gebruik voorverwarmen bij 72°C.
Proteïnase-K	Oplossen in 4.5 ml milli-Q water. Verdelen in porties van 40 µl in epjes en opslaan bij -20°C, maximaal 1 jaar. Na oplossen direct op ijs
Filterkolommen	
Verzamelbuisjes	

Na afloop van de DNA isolatie werden de verkregen monsters gemeten met de NanoDrop ND-1000 spectrofotometer. Dit is een kleine spectrofotometer die met een input van ongeveer 1 µl de DNA concentratie kan bepalen. Omdat verschillende componenten van de monsters bij verschillende golflengten licht absorberen kan er een indicatie gegeven worden hoe zuiver het monster is. DNA absorbeert licht van 260nm, bij 230nm absorberen vooral kleine organische bindingen. Door de ratio van deze twee te bepalen kon ingeschat worden of er veel of weinig contaminatie aanwezig is. Verder zijn er nog eiwitten en phenol bindingen die licht absorberen bij 280nm, hier werd ook een ratio van bepaald (a).

2.2 Gel elektroforese

Gel elektroforese is een methode om een PCR product zichtbaar te kunnen maken. Agarose werd opgelost in 0,5% TBE Buffer tot een eind concentratie van 1-2%. 10µl PCR product werd gemengd met 2µl Loading Buffer en vervolgens in de agarosegel gepipetteerd. Door een elektrisch potentiaal verschil aan te brengen werd het DNA gescheiden in de agarosegel omdat DNA negatief geladen is. Grote DNA fragmenten verplaatsten minder snel in de gel dan kleine DNA fragmenten vanwege de toenemende weerstand naarmate het fragment groter werd. Aan de gel werd GelRed™ toegevoegd om het DNA te kleuren. Als dit niet werd gedaan was het niet mogelijk om het DNA zichtbaar te maken. Door UV licht op het DNA met de GelRed™ te schijnen werd het DNA zichtbaar en kon een foto worden gemaakt met de software Ingenius. Door een 50bp marker toe te voegen kon de lengte van de PCR producten worden bepaald.

2.3 *Giardia lamblia*

Voor *Giardia lamblia* werd er een Assemblage specifieke qPCR ontwikkeld. Assemblage A en B zijn de enige typen die geassocieerd worden met humane infecties (Vanni et al. 2012). Eerst werd de PCR



uitgevoerd op de klassieke methode op een Biometra Tremocycler Tprofessional, omdat de probes erg duur waren moesten de primers eerst op deze manier worden getest. Vervolgens werd de PCR overgezet naar de LightCycler® 480, hier werd eerst met SYBR green getest. Na het succesvol verlopen van deze testen werden er probes ontworpen en kon de uiteindelijke qPCR worden getest en geoptimaliseerd.

2.3.1 Monsters

De gebruikte monsters komen allemaal uit de KizSS studie. Dit waren monsters waar al van bekend was dat ze *Giardia lamblia* positief waren en ook was het typen bekend. De DNA isolatie was uitgevoerd zoals beschreven in hoofdstuk 2.1.

2.3.2 Primers en probes

De primers die werden gebruikt voor de Assemblage specifieke PCR waren ontworpen door Vanni et al. 2012. Er zijn twee verschillende primersets uit het artikel gekozen en getest (Tabel 3). Primerset 4E1-HP had betere resultaten laten zien dus hier is verder mee gegaan voor een qPCR met probes. Het target gen voor 4E1-HP is een hypothetical protein gen met accession nummer GL50803_13988 GL50581_3242 voor assemblage A en GL50581_3242 voor assemblage B. Voor primerset 5C1-P21 is het protein 21.1 gen de target met accession nummer GL50581_725 voor assemblage B en GL50803_15306 voor assemblage A.

Tabel 3 Gebruikten primersets voor de assemblage specifieke PCR ontworpen door Vanni et al. 2012 en de bijbehorende smelttemperatuur (T_m), GC% (percentage G-C bindingen) en de lengte van het amplicon.

Set	Assemblage	Primer-sequentie (5'-3')	T _m (°C)	GC%	PCR product (bp)
4E1-HP	A	For: AAAGAGATAGTTCGCGATGTC	54.74	43	165
		Rev: ATTAACAAACAGGGAGACGTATG	55.91	39	
	B	For: GAAGTCATCTCTGGGGCAAG	58.25	55	272
		Rev: GAAGTCTAGATAAACGTGTCGG	54.32	45	
5C1-P21	A	For: ATGCTAGCCGTAGTTAATAAGG	53.51	41	303
		Rev: ACCGGCCTTATCTACCAGC	57.68	58	
	B	For: TTAATAGAAATGCTTTCGACACG	57.18	35	249
		Rev: TTGCTACAGCAGAAAGGTGC	57.69	50	

Er werd gebruik gemaakt van een hydrolytisch probe (Tabel 4). De probes werden zelf ontworpen met behulp van twee verschillende software programma's. Eerst werden de probes ontworpen met het programma Primer3. De ontworpen probes werden vervolgens gecontroleerd en beoordeeld met het programma LightCycler Probe Design.

Tabel 4 Probes met de T_m en GC% voor de assemblage specifieke qPCR. Ontworpen met behulp van de software Primer3 en LightCycler Probe Design

Set	Assemblage	Probe-sequentie (5'-3')	T _m (°C)	GC%
4E1-HP	A	VIC-GGCACACGGTTTACACCGT-BHQ	64.5	57.89
	B	RED-TACACTGTTCGTATGACCACTGTGCGATA-BHQ	64.8	42.86

2.3.3 Klassieke PCR

De klassieke PCR werd gebruikt om de primers te kunnen testen, eerst moest zeker zijn dat deze goed werkten voordat er dure probes konden worden ontworpen en besteld. De klassieke PCR werd uitgevoerd op de Biometra Termocycler Tprofessional. Met dit PCR apparaat was het mogelijk om een temperatuur gradiënt te gebruiken. Hierdoor was het mogelijk om de PCR bij verschillende annealing temperaturen uit te voeren zonder hier meerdere PCR's voor te doen. Na afloop van de PCR werd er een gel elektroforese uitgevoerd voor de analyse van de PCR producten.



Om alle twee de primersets te kunnen testen moesten er elke keer vier verschillende PCR mastermixen gemaakt worden (Tabel 5). Deze draaiden wel allemaal hetzelfde PCR programma (Tabel 6). Om de PCR te optimaliseren werd de test vaak herhaald met alles hetzelfde behalve één variabele, zodat de invloed hiervan kan worden bepaald. Met de klassieke PCR werd de test gedaan met verschillende annealing temperaturen en hoeveelheden DNA input.

Tabel 5 *Giardia lamblia* A/B Klassieke PCR mastermixen, beide mastermixen moeten twee keer worden gemaakt één keer met de assemblage A specifieke primers en één keer met de assemblage B specifieke primers.

µl/reactie	Reagens	µl/reactie	Reagens
2.5	10 x buffer II	2.5	10 x buffer II
0.625	dNTPs (10mmol)	0.625	dNTPs (10mmol)
4	MgCl ₂ (25 mmol)	4	MgCl ₂ (25 mmol)
0.125	Ampli Taq Gold	0.125	Ampli Taq Gold
0.5	GI-4E1-HP-A/Bf (10 pmol)	0.5	GI-5C1-P21-A/Bf (10 pmol)
0.5	GI-4E1-HP-A/Br (10 pmol)	0.5	GI-5C1-P21-A/Br (10 pmol)
14.25	H ₂ O	14.25	H ₂ O
2,5	DNA	2,5	DNA
25	Totaal	25	Totaal

Tabel 6 *Giardia* A/B Klassieke PCR Programma.

Stap	Temperatuur (°C)	Tijd	Cycli
1. Denaturatie	94	10 min	1
2. Denaturatie	94	30 sec	}
3. Annealing	55	30 sec	
4. Elongatie	72	45 sec	}
5. Elongatie	72	2 min	1

Tabel 7 GIVa mastermix.

2.3.4 qPCR

Voordat de qPCR, GIVa (Multiplex *Giardia lamblia* A/B qPCR Vanni et al), met probes werd uitgevoerd op de LightCycler 480® werd dit eerst met SYBR Green gedaan (Tabel 8). Deze reactie werd geanalyseerd met een smeltcurve en gel elektroforese zoals beschreven in 2.2. De smeltcurve analyse werd direct na de reactie uitgevoerd door de LightCycler® 480. Als duidelijk was dat dit goed werkte konden de probes worden besteld en getest (Tabel 7). Bij de klassieke PCR bestond de mastermix uit allemaal losse reagentia. Bij de qPCR werd gebruik gemaakt van een kit, dit zijn suspensies waar al de juiste concentraties dNTPs, MgCl₂, buffer en DNA polymerase in zit. Bij PAM werd standaard gewerkt met de LightCycler® TaqMan® Master kit (Tabel 9). Ook werd er bij de qPCR Bovine Serum Albumin (BSA) toegevoegd aan de mastermix, dit zorgt voor stabilisatie van de enzymen.

µl/reactie	Reagens
5	LightCycler® Taqman® Master
0.5	BSA (8mg/ml)
1	4E1-HP-Atp (5pmol)
1	4E1-HP-Af (10pmol)
1	4E1-HP-Ar (10pmol)
1	4E1-HP-Btp (5pmol)
1	4E1-HP-Bf (10pmol)
1	4E1-HP-Br (10pmol)
11.5	H ₂ O
2	DNA
25	Totaal



Tabel 8 *Giardia lamblia* qPCR SYBR Green mastermix, beide mastermixen moeten twee keer worden gemaakt één keer met de assemblage A specifieke primers en één keer met de assemblage B specifieke primers.

µl/reactie	Reagens	µl/reactie	Reagens
2	LightCycler® SYBR Green	2	LightCycler® SYBR Green
4	LightCycler® TaqMan® Master	4	LightCycler® TaqMan® Master
0.5	GI-4E1-HP-A/Bf (10pmol)	0.5	GI-5C1-P21-A/Bf (10 pmol)
0.5	GI-4E1-HP-A/Br (10 pmol)	0.5	GI-5C1-P21-A/Br (10 pmol)
17	H ₂ O	17	H ₂ O
1	DNA	1	DNA
25	Totaal	25	Totaal

Tabel 9 inhoud van de LightCycler® TaqMan® Master PCR kit (LightCycler® TaqMan® Master, instruction manual september 2004).

Epje	Inhoud	Functie
1a (witte dop)	Enzyme	Na toevoegen van 10µl 1a in 1b, ready-to-use hotstart PCR reactie mix.
1b	Reactie mix	
2	H ₂ O, PCR grade*	Volume aanpassing van PCR reactie mix

Met de SYBR Green PCR werd het optimale PCR programma (Tabel 10) vastgesteld en deze werd vervolgens toegepast bij de qPCR met hydrolyse probe. Bij het testen met SYBR Green werd duidelijk dat de 5C1-P21-A primers niet goed genoeg werkten op de LightCycler® 480 waardoor er vanaf hier verder is gewerkt met primerset 4E1-HP.

Tabel 8 PCR programma voor de GIVa.

Stap	Temperatuur (°C)	Tijd	Cycli
1. Denaturatie	95	10 min	1
2. Denaturatie	95	10 sec	}
3. Annealing	60	20 sec	45
4. Elongatie	72	20 sec	}

2.4 *Cryptosporidium*

Bij de *Cryptosporidium* is er uiteindelijk gewerkt met twee verschillende PCR's. Beide PCR's moesten in staat zijn om *C. hominis* en *C. parvum* van elkaar te onderscheiden. *C. hominis* komt vrijwel alleen bij mensen voor, *C. parvum* komt ook bij dieren voor. Dit zijn wel de enige twee typen die met humane infecties worden geassocieerd. *C. meleagridis* en *C. andersoni* komen af en toe ook voor bij mensen maar dit komt zeer weinig voor (Ryan et al., 2012). De CryptoSH (Multiplex *Cryptosporidium parvum/hominis* LIB13 qPCR Stephen J. Hadfield) is een eerder door Stephen J. Hadfield et al. 2010 ontworpen qPCR. Deze qPCR was al geheel ontworpen met primers en probes en werd dus meteen op de LightCycler® 480 uitgevoerd. De CryptoMK (Multiplex *Cryptosporidium* GP60 qPCR Michiel Kroes) is een geheel zelf ontworpen qPCR. Deze werd eerst als klassieke PCR getest op een Biometra Thermocycler Tprofessional. Als dit goed werkte konden de probes worden ontworpen en besteld.

2.4.1 Monsters

In september 2012 was er een *Cryptosporidium* uitbraak in Nederland, het RIVM heeft aan vele laboratoria gevraagd om alle *Cryptosporidium* positieve monsters uit deze periode op te sturen om deze monsters te kunnen vergelijken. Dit zijn de monsters die over het algemeen zijn gebruikt. Verder zijn er ook een aantal *Cryptosporidium* positieve monsters uit de KizSS studie gebruikt. De monsters uit de KizSS studie waren faeces, uit deze is DNA geïsoleerd op de methoden beschreven in



hoofdstuk 2.1. De monsters van de uitbraak waren al DNA isolaten dus hier hoefden geen DNA isolatie op uitgevoerd te worden.

2.4.2 Primers en probes

De primers en probes voor de CryptoSH zijn ontworpen door S. J. Hadfield et al. 2010. De qPCR bestaat uit een enkele forward primer die werkt voor zowel de *C. hominis* als de *C. parvum* PCR. Er zijn wel twee verschillende reverse primers, deze zijn echter niet specifiek voor de twee verschillende soorten. Dit betekende dat het onderscheid werd gemaakt door de probes, deze zijn wel specifiek. Bij de qPCR werd er gebruik gemaakt van een Minor Groove Binding (MGB) probe, dit MGB molecuul zorgt ervoor dat er een sterkere binding ontstaat tussen de probe en het target DNA. De target van de qPCR is het LIB13 gen de sequenties komen van het National Center for Biotechnology Information (NCBI) GenBank.

Tabel 11 Primers en probes voor de CryptoSH. De target van de qPCR is het LIB13 gen, GenBank accession numbers: B78618 (*C. parvum*), AF190627 (*C. hominis*). Bij de primers de bijbehorende Tm, GC percentage en de lengte van het PCR product. MGB, minor groove binder + NFQ, nonfluorescent quencher.

* TaqMan Probe (Tp)

Set	Target	Primer/Probe sequentie(5'-3')	Tm (°C)	GC%	PCR product (bp)
CRULib13	<i>C. parvum</i>	For: TCCTTGAAATGAATATTTGTGACTCG	61.62	35	166
		Rev: TTAATGTGGTAGTTGCGGTTGAAC	60.92	42	
		Tp: VIC-TATCTCTTCGTAGCGGCGTA MGB-NFQ	57.23	50	
	<i>C. hominis</i>	For: TCCTTGAAATGAATATTTGTGACTCG	61.62	35	169
		Rev: AAATGTGGTAGTTGCGGTTGAAA	61.38	39	
		Tp*: RED-CTTACTTCGTGGCGGCGT MGB-NFQ	60.78	61	

De tweede *Cryptosporidium* PCR (CryptoMK) is zelf ontworpen. Dit is gedaan met de software Primer3 (v. 0.4.0). Voor beide *Cryptosporidium* soorten zijn aparte primers en probes ontworpen, deze zijn allemaal specifiek. De *C. parvum* reverse primer kan ook hechten aan *Cryptosporidium tyzzeri*. Dit is geen probleem aangezien *C. tyzzeri* over het algemeen alleen bij muizen voorkomt, er is twee keer een cases bij mensen beschreven (IM Sulaiman et al. 2005, V. Rasková et al. 2012). Het is alleen de reverse primer die aanhecht op *C. tyzzeri* DNA, dit zal geen positieve reactie opleveren. De target van de PCR is het GP60 gen, de sequenties zijn afkomstig van de NCBI GenBank.

Tabel 12 Primers en probes voor de CryptoMK. Primers en probes ontworpen door Michiel Kroes m.b.v. de software Primer3. De target van de PCR is het GP60 gen. De accession numbers van de targets: JF727788 (*C. hominis*) en HQ398323 (*C. parvum*).

Set	Target	Primer/Probe sequentie (5'-3')	Tm (°C)	GC%	PCR product (bp)
GP60typ	<i>C. parvum</i>	For: CCACTACTCCAGCTCAAAGTGA	59.54	50	174
		Rev: CGGGATCTGTTTGGTCTTTTAT	59.37	41	
		Tp: GGTTCGGAGAAGGTACCCAGCT	67.77	61	
	<i>C. hominis</i>	For: AAAGAACAATGAAGAAAGCCAAA	59.32	30	151
		Rev: GGTAGAAGGTTGGGTAGCACTCT	60.07	52	
		Tp: TCAAGGTGGCTCCAAGGAGACG	68.86	57	

De voorgaande techniek om *Cryptosporidium* te typeren was het amplificeren en sequencen (beschreven in hoofdstuk 2.5) van het GP60 gen. De amplificatie werd gedaan d.m.v. een klassieke PCR (Tabel 13). Dit was de GP60PCR, als dit amplicon werd gesequenced dan kon er door het tellen van de repeats in het gen en het bepalen van de aminozuur volgorde vastgesteld worden om welk typen en subtypen het ging. Deze PCR is ontwikkeld door Sprong et al., 2000.



Tabel 13 De primers voor de GP60PCR ontworpen door Sprong et al., 2000. Met de bijbehorende Tm en GC%.

Set	Primer sequentie (5'-3')	Tm (°C)	GC%	PCR product (bp)
GP60	For: ATGAGATTGTCGCTCATTATC	49	38.10	505
	Rev: AGATATATCTTGGTGCG	44	41.18	

Er was ook nog een genotype specifieke qPCR ontworpen door Dr. Jeroen Roelfsema deze qPCR moest in staat zijn om het genotype *C. hominis* IbA10G2 te onderscheiden. Ongeveer 80% van alle *Cryptosporidium* monsters bij het RIVM zijn dit genotypen. Het zou dus goed zijn om deze direct te kunnen onderscheiden. Deze PCR moest als derde PCR in de CryptoSH worden toegevoegd.

Tabel 14 Primers en probe van de IbA10G2 specifieke qPCR ontworpen door Dr. Jeroen Roelfsema.

Set	Primer sequentie (5'-3')	Tm (°C)	GC%	PCR product (bp)
IbA10G2	For: ATGAGATTGTCGCTCATTATCGT	52	39.13	281
	Rev: GAGCCACCTTGAGTATCTTGTC	57	52.17	
	Tp: FAM- TTGTTCTTTCTTCTCCGCCATCTGCT MGB-NFQ	58	44.44	

2.4.3 Klassieke PCR

Alleen de CryptoMK is eerst als klassieke PCR uitgevoerd. Aangezien de CryptoSH ontworpen en gevalideerd was door S. J. Hadfield et al. en er maar kleine aanpassingen werden uitgevoerd was het niet noodzakelijk om eerst de primers te testen in een klassieke PCR. Uiteraard werd de GP60PCR ook klassiek uitgevoerd aangezien dit een klassieke PCR was. Alle klassieke PCR's werden uitgevoerd op de Biometra Thermocycler Tprofessional. Als de PCR afgelopen was werd het PCR product geanalyseerd d.m.v. gel elektroforese zoals beschreven in paragraaf 2.2. Het kleine verschil in PCR product lengte bij de CryptoMK maakt het lastig om deze van elkaar te onderscheiden m.b.v. gel elektroforese. De PCR werd dus uitgevoerd als één *C. parvum* PCR en één *C. hominis* PCR. Er werden altijd twee verschillende mastermixen (Tabel 15) gemaakt die wel bij hetzelfde PCR programma (Tabel 16) draaiden.

Tabel 15 PCR mastermixen voor de CryptoMK klassiek. Bij het testen zijn verschillende waarden gevarieerd om zo een optimum te bepalen.

µl/reactie	Reagens	µl/reactie	Reagens
11,75	H ₂ O	11,75	H ₂ O
4	MgCl ₂ (25mmol)	4	MgCl ₂ (25mmol)
2,5	10 x buffer II	2,5	10 x buffer II
0,625	dNTPs (10mmol)	0,625	dNTPs (10mmol)
0,125	Ampli Taq Gold	0,125	Ampli Taq Gold
0,5	ChomGP60f (10pmol)	0,5	CparGP60f (10pmol)
0,5	ChomGP60r (10pmol)	0,5	CparGP60r (10pmol)
5	DNA	5	DNA
25	Totaal	25	Totaal

Tabel 16 PCR programma voor de CryptoMK klassiek. Met de Biometra Thermocycler Tprofessional was het mogelijk een temperatuur gradiënt toe te passen waardoor de temperaturen gemakkelijk gevarieerd konden worden om het optimum te bepalen.

Stap	Temperatuur (°C)	Tijd	Cycli
1. Denaturatie	94	10 min	1
2. Denaturatie	94	30 sec	}
3. Annealing	60	30 sec	40
4. Elongatie	72	45 sec	}
5. Elongatie	72	2 min	1

De GP60PCR heeft een mastermix van totaal 50µl/reactie (Tabel 17), vrijwel alle andere PCR's hebben een mastermix van 25µl/reactie. Dit is omdat er met dit PCR product nog een vervolg test moet worden uitgevoerd, de sequence reactie. Bij de andere PCR's is dit niet het geval en zal er dus minder mastermix per reactie nodig zijn.

Tabel 17 Mastermix van de GP60PCR

µl/reactie	Reagens
14.5	H ₂ O
25	Hotstart mix
0.5	BSA (5mg/ml)
4	GP60f (10pmol)
4	GP60r (10pmol)
2	DNA
50	Totaal

Tabel 18 PCR programma voor de GP60PCR

Stap	Temperatuur (°C)	Tijd	Cycli
1. Denaturatie	94	10 min	1
2. Denaturatie	94	30 sec	}
3. Annealing	50	1 min	40
4. Elongatie	72	45 sec	}
5. Elongatie	72	2 min	1

2.4.4 qPCR

De CryptoSH werd direct op de LightCycler® 480 uitgevoerd, want de qPCR werd zonder enige modificatie van de primers of probes uit het artikel overgenomen. De PCR mastermix (Tabel 20) is net iets anders dan beschreven in het artikel. Dit kwam doordat de PCR zoals beschreven in het artikel werd uitgevoerd op een Rotorgene 6000 real-time PCR instrument, bij het RIVM werd de LightCycler® 480 gebruikt. Ook bij de *Cryptosporidium* qPCR's werd gebruik gemaakt van de LightCycler® TaqMan® Master PCR kit (Tabel 9).

De CryptoSH werd later ook nog samen gevoegd met de CryptoMK omdat deze PCR wat complicaties had. In tabel 19 is de mastermix van de samenvoeging te zien. Beide PCR's draaiden hetzelfde programma als de GIVa (Tabel 8)



Tabel 19 PCR mastermix van de CryptoTyp

µl/reactie	Reagens
9.75	H ₂ O
5	LightCycler® Taqman® Master
0.5	BSA (8mg/ml)
1.5	ChomGP60f (10pmol)
1.5	ChomGP60r (10pmol)
1	ChomGP60Tp (5pmol)
1	CRULib13F (10pmol)
1	CRULib13RCp (10pmol)
0.75	CRULib13TpCpar (5pmol)
3	DNA
22	Totaal

Tabel 20 PCR mastermix van de CryptoSH, er werd één algemene forward primer gebruikt.

µl/reactie	Reagens
9.75	H ₂ O
5	LightCycler® Taqman® Master
0.5	BSA (8mg/ml)
2.5	CRULib13f (10pmol)
1	CRULib13rCp (10pmol)
1.5	CRULib13rCh(10pmol)
0.75	CRULib13TpCpar (5pmol)
1	CRULib13TpChom (5pmol)
3	DNA
25	Totaal

2.5 Sequencing

Voordat er een sequence reactie kon worden uitgevoerd moest er eerst een positieve reactie verkregen worden in de GP60PCR. Dit PCR product moest vervolgens d.m.v. een ExoSAP reactie worden geïnactiveerd (Tabel 21). Het exonuclease breekt enkelstrengs DNA af, dus de primers. De losse nucleotiden worden gedefosforyleerd door de Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP) waardoor ze niet gebruikt kunnen worden door het DNA polymerase voor de synthese van DNA. Omdat bij de sequence reactie dNTP's en ddNTP's in een nauwkeurig afgestelde verhouding nodig zijn en omdat bij de sequencing één primer gebruikt moet worden is het noodzakelijk om de dNTP's en primers van de PCR te inactiveren.

Tabel 21 Mastermix en programma voor de ExoSAP reactie, de mastermix bestaat uit twee enzymen Exonuclease I inactieveert enkelstrengs DNA en SAP die de losse dNTP's inactieveert. Het ExoSAP programma start met 15 minuten op 37°C om de enzymen optimaal te laten werken. Vervolgens wordt het verhit naar 80°C om de enzymen te inactiveren.

µl/reactie	Reagens	Temperatuur (°C)	Tijd
5	PCR product	37	15 min
2	ExoSAP	80	15 min

Na de exoSAP stap werd de sequence reactie (Tabel 22, 23) uitgevoerd. Vervolgens moesten de voorbereide monsters ingeleverd worden bij de sequence faciliteit van het RIVM. Dit gaat via speciale richtlijnen (Bijlagen 2), via een Acces database moest worden aangegeven wat er was ingeleverd om te laten sequencen en een aantal dagen later konden de ABI bestanden via dezelfde Acces database gedownload worden. Deze ABI bestanden zijn chromatogram bestanden die met de software BioNumerics 6.6.4 geanalyseerd werden.

Tabel 22 Mastermix voor de sequence reactie. *De primer die was gebruikt om het eerste PCR product te verkrijgen moet ook hier worden toegevoegd. Alleen de forward of alleen de reverse primer moet worden toegevoegd zodat er maar één streng wordt geamplificeerd en gesequenced. Als het nodig is de sequentie van beide strengen te weten moeten er dus twee reacties worden uitgevoerd.

µl/reactie	Reagens
10	H ₂ O
7	Buffer!?!?!?
1	BigDye® terminator
1	Primer f/r* (5pmol/µl)
1	ExoSAP product

Tabel 23 Programma van de sequence reactie

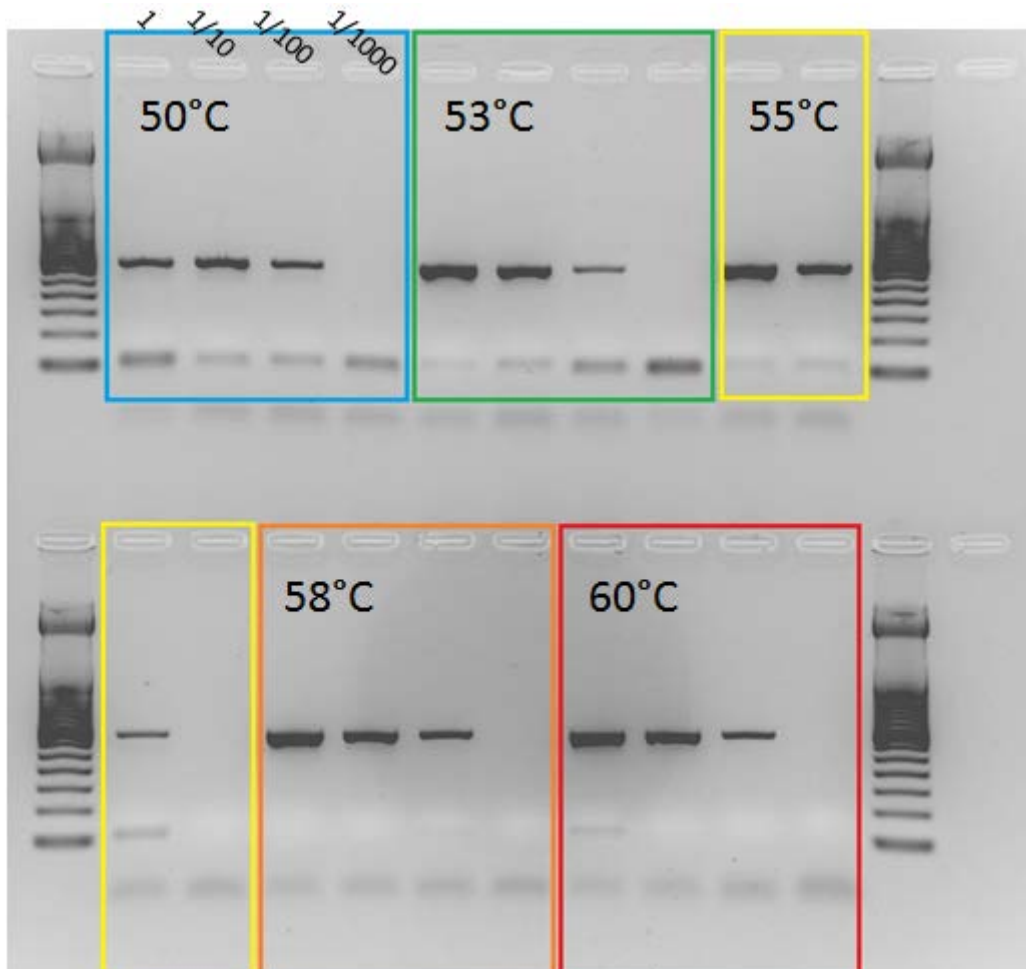
Stap	Temperatuur (°C)	Tijd	Cycli
1. Denaturatie	96	10 min	
2. Denaturatie	96	10 sec	}
3. Annealing	50	30 sec	25
4. Elongatie	60	4 min	}

3. Resultaten

3.1 *Giardia lamblia*

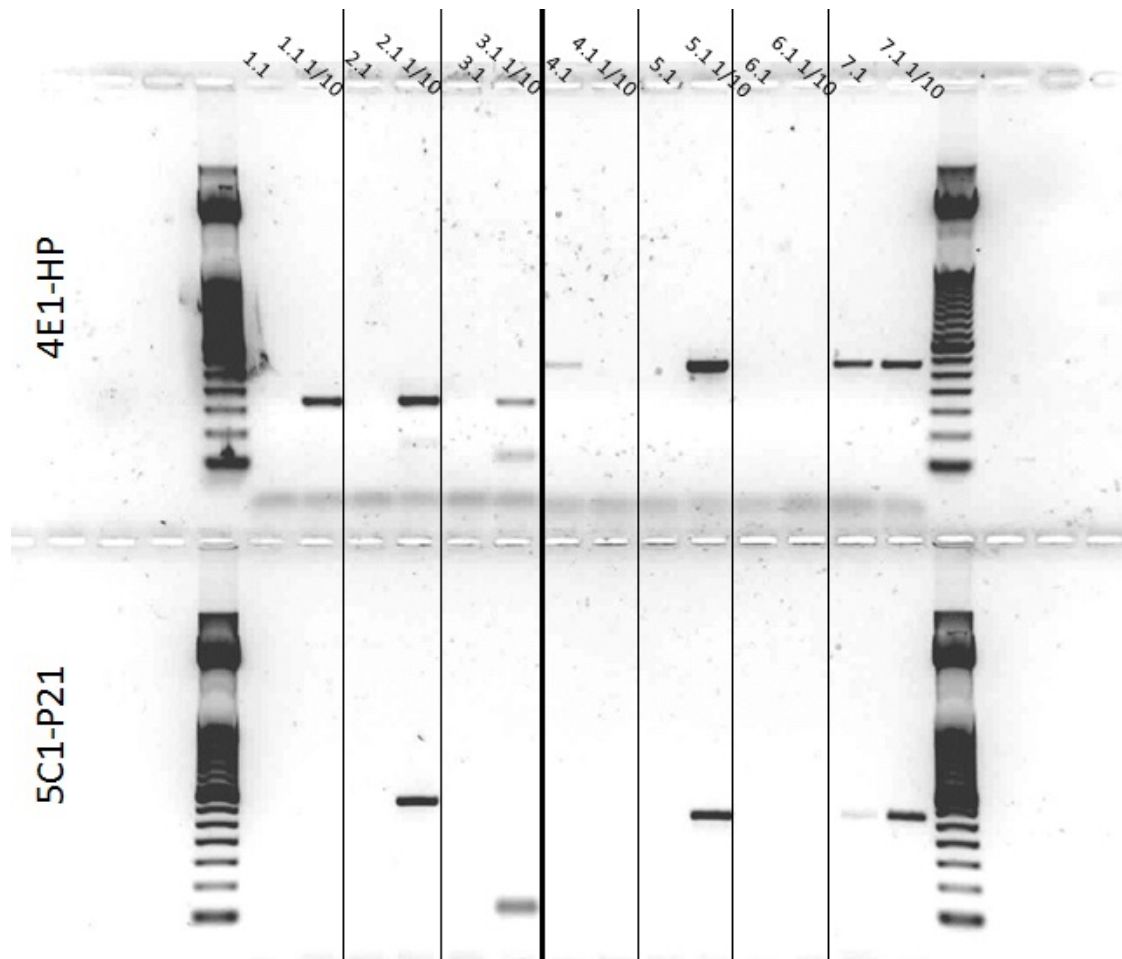
3.1.1 Klassieke PCR

Als eerst werd de optimale annealing temperatuur voor de klassieke PCR bepaald voor de primersets 4E1-HP en 5C1-P21. Beide primersets werden bij 5 verschillende temperaturen tussen de 50°C - 60°C getest (Figuur 9). Duidelijk is dat de reactie bij 50°C minder sterk verloopt dan bij een hogere annealing temperatuur. Tussen de andere annealing temperaturen zit niet veel verschil, 60°C begint weer een klein beetje minder sterk te worden. Er wordt gekozen om met een annealing temperatuur van 55°C verder te testen.



Figuur 9 *Giardia lamblia* kPCR annealing temperatuur optimalisatie. Per annealing temperatuur werd een verdunningsreeks van 1, 1/10, 1/100 en 1/1000 gebruikt.

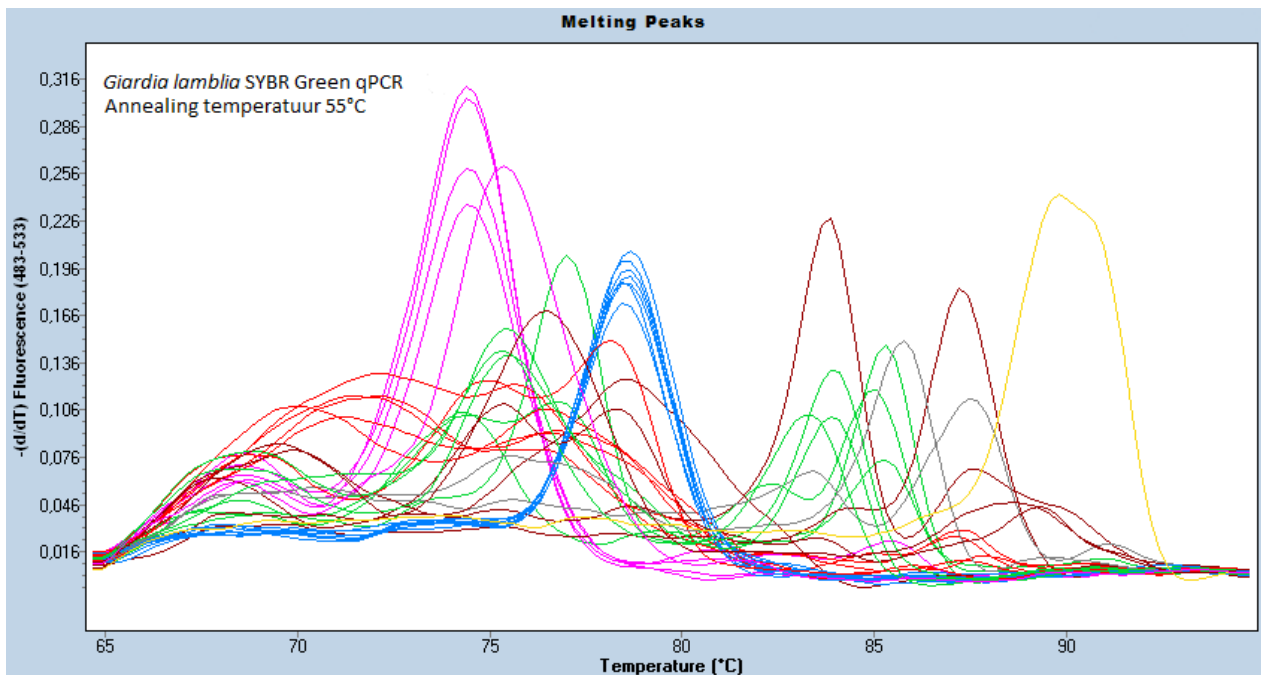
Deze test (Figuur 9) werd gedaan met gezuiverd *Giardia lamblia* DNA. Dit heeft als gevolg dat er nooit remming op kan treden. Bij het uitvoeren van de PCR met DNA geïsoleerd uit faeces werd duidelijk dat er behoorlijk wat remming optrad in de PCR. Beide primersets gaven in de meeste gevallen pas een positieve reactie op het moment dat er werd getest met een 1/10 verdunning van het monster (Figuur 10). Dit probleem kon worden opgelost door simpelweg het DNA te verdunnen. In figuur 10 is te zien dat de 4E1-HP primerset betere resultaten gaf dan de 5C1-P21 primerset.



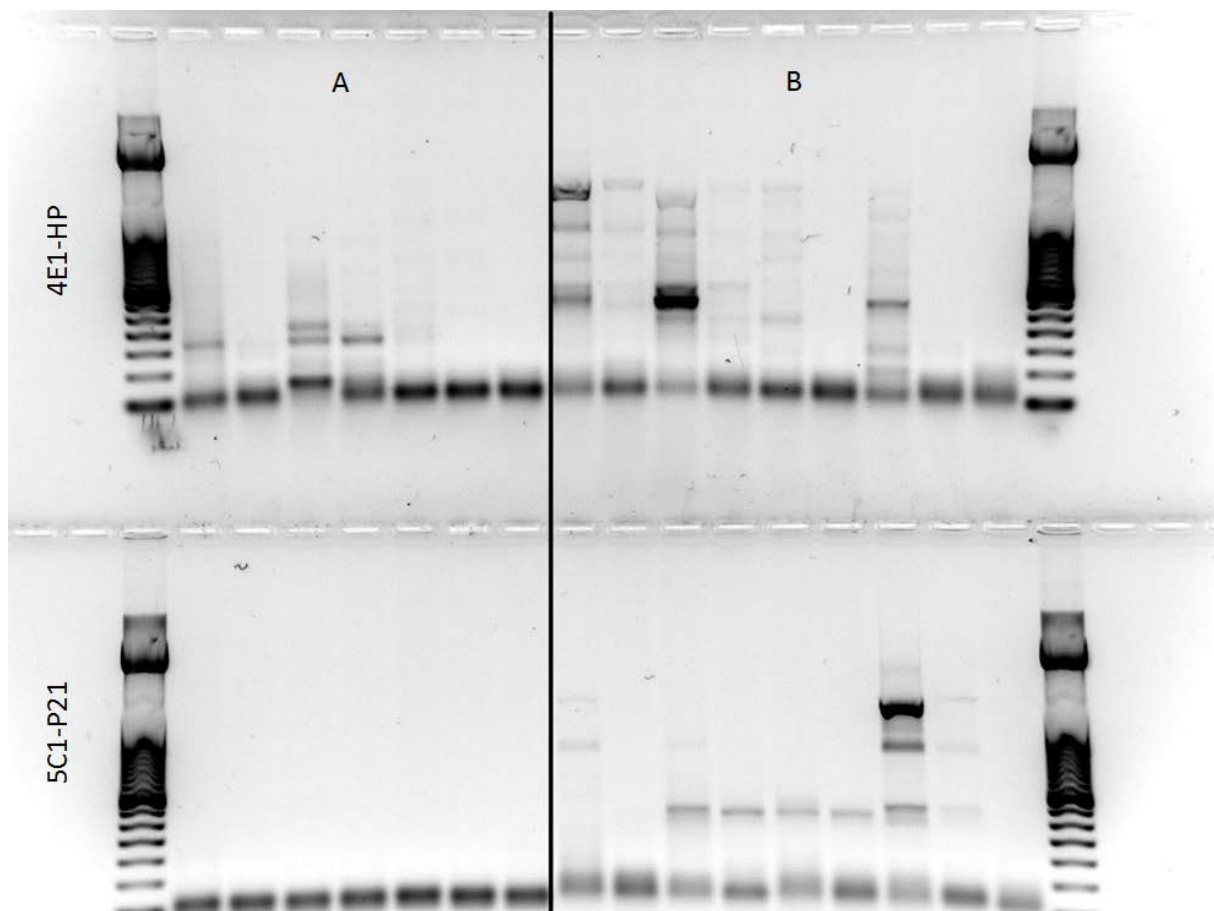
Figuur 10 *Giardia lamblia* Klassieke PCR met monsters geïsoleerd uit faeces. De bovenste rij geeft de reactie weer met de 4E1-HP primerset, onder de reactie met 5C1-P21, links van de dikke streep assemblage A specifiek en rechts assemblage B specifiek. Duidelijk is dat bijna alle onverdunde monsters negatief zijn maar de 1/10 verdunningen niet. Dit is te verklaren door het optreden van remming in de PCR.

3.1.2 qPCR

In eerste instantie werd de GIVa uitgevoerd met SYBR Green. Na de reactie werd een smeltcurve analyse uitgevoerd door de LightCycler® 480 (Figuur 11). Met de smeltcurve was vrijwel niks specifiek zichtbaar. Als er een specifieke reactie had opgetreden dan zou er een piek van meerdere monsters op één lijn moeten zitten tussen de 80-90°C. PCR producten zijn relatief groot en zullen dus smelten bij een hoge temperatuur. Om iets beter te kunnen zien wat er nou precies was gebeurd in de reactie werd gel elektroforese uitgevoerd met alle monsters (Figuur 12). Op de gel zijn ontzettend veel aspecifieke bandjes te zien. Er was bijna niks specifiek geamplificeerd, na het bepalen van een optimale annealing temperatuur van 55°C was dit niet verwacht. Een verklaring hiervoor is dat de primers zich wat anders gaan gedragen op het moment dat ze in een LightCycler 480® met een net andere mastermix werden gedaan. De 5C1-P21-A reactie heeft zelfs helemaal geen amplificatie laten zien. Omdat er veel aspecifieke amplificatie optrad was de volgende stap om met een hogere annealing temperatuur te testen om zo aspecifieke aanhechting van de primers tegen te gaan.

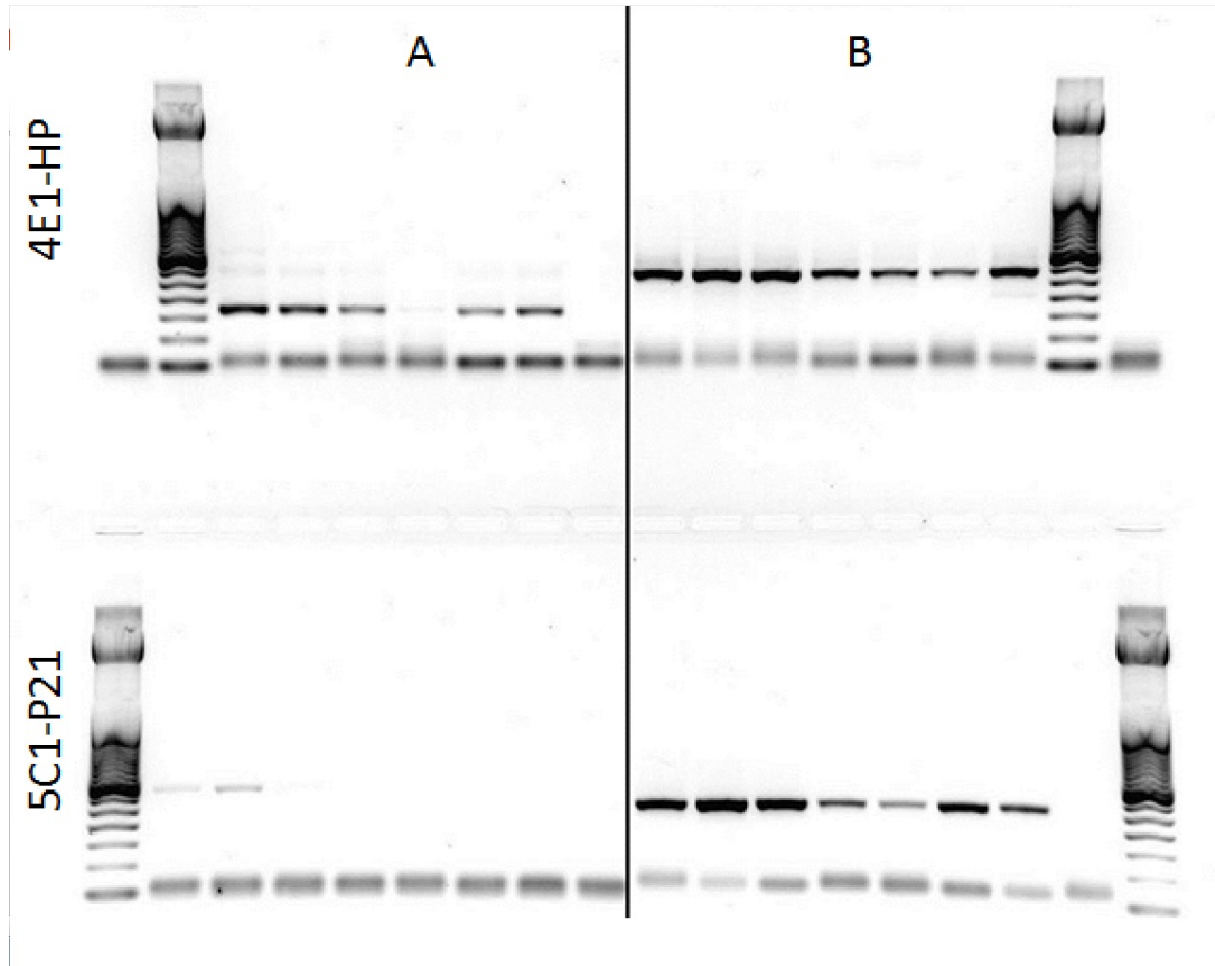


Figuur 11 Smeltcurve analyse *Giardia lamblia* SYBR Green qPCR bij een annealing temperatuur van 55°C. Er is duidelijk te zien dat er vrijwel niks specifiek is geamplificeerd aangezien er bijna geen pieken op één lijn zitten tussen de 80-90°C. Alleen de blauwe lijnen zitten mooi op één plek maar waarschijnlijk is dit een te lage temperatuur om een amplicon te zijn en zullen het primer-dimers zijn



Figuur 12 *Giardia lamblia* SYBR Green qPCR Annealing temperatuur 55°C. Er zijn bijna geen specifieke bandjes, dit was wel verwacht na het resultaat van de smeltcurve analyse. Bij de 5C1-P21 A reactie is helemaal geen amplificatie te zien, de 5C1-P21 B reactie laat het minst aspecifieke bandjes zien maar is nog zeker niet mooi.

Na het testen bij verschillende annealing temperaturen kon er weer een optimum worden bepaald. In figuur 13 is te zien dat de qPCR met een annealing temperatuur van 60°C helemaal goed verloopt. Zelfs bij de 5C1-P21 A reactie is amplificatie te zien. Dit was bij geen enkele andere annealing temperatuur zichtbaar. Dit verandert echter niet het feit dat de 5C1-P21 primerset niet goed genoeg werkt op de LightCycler® 480. Er moesten dus probes ontworpen worden voor de 4E1-HP primerset omdat hier veder mee gewerkt gaat worden.



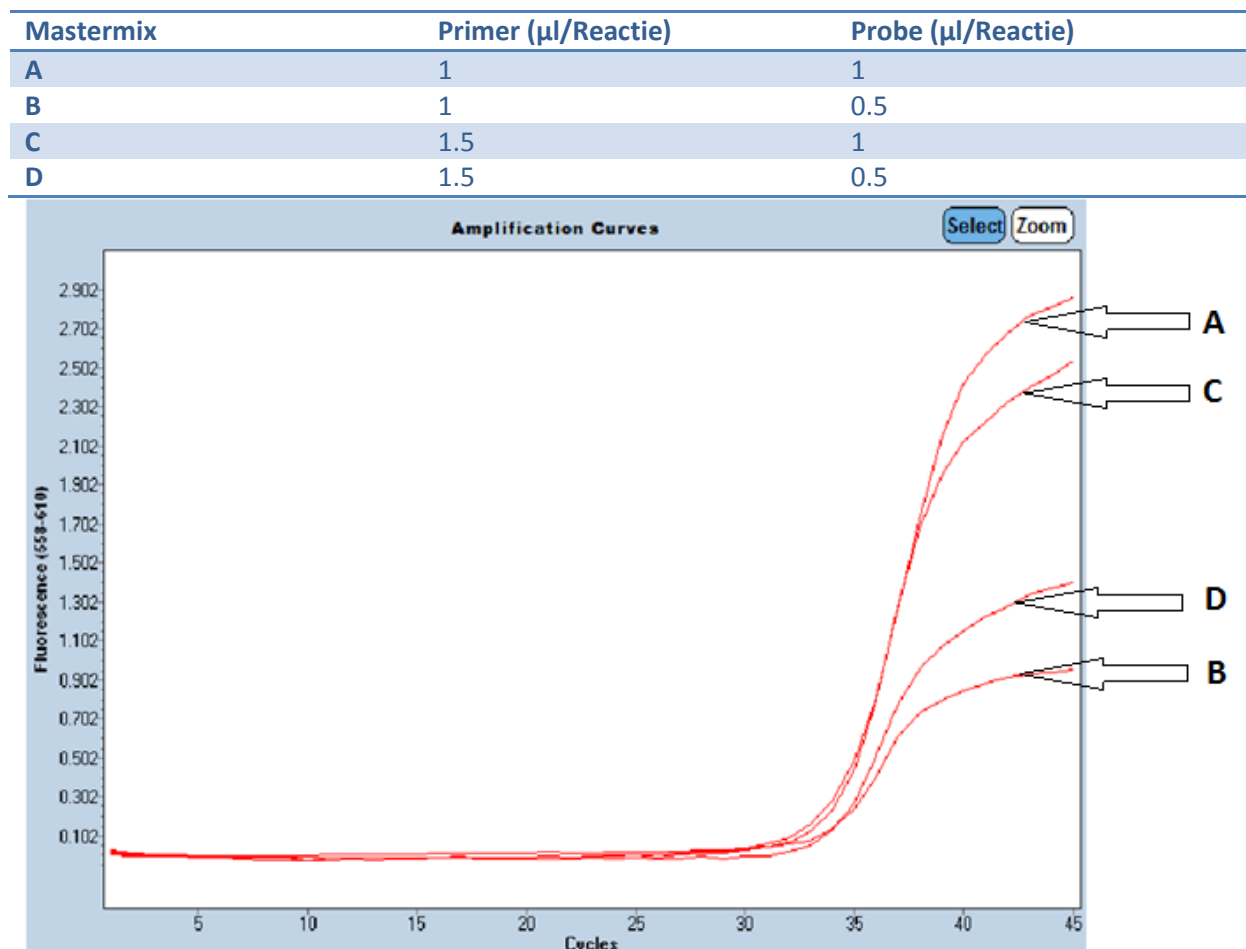
Figuur 13 *Giardia lamblia* SYBR Green qPCR annealing temperatuur 60°C. De 4E1-HP PCR is mooi verlopen, de A reactie is wel iets minder sterk dan de B reactie maar is nog steeds duidelijk positief. De 5C1-P21 A reactie is nog steeds niet goed, de B reactie is erg mooi maar het is duidelijk dat er veder getest gaat worden met de 4E1-HP primerset.

3.1.3 Hydrolyse probe

Met de hydrolyse probes is de GIVa compleet, om te beginnen werd de optimale primer-probe verhouding bepaald. Door de GIVa met vier verschillende mastermixen met verschillende primer-probe verhoudingen uit te voeren kon dit worden bepaald (Tabel 24). Aangezien de GIVa als multiplex werd uitgevoerd, werden de primers en probes van zowel assemblage A als B in één mastermix gedaan. In figuur 14 is te zien hoe de verschillende mastermixen reageren in de GIVa. Wat meteen opvalt, is dat de mastermixen A en C ruim twee keer zoveel fluorescentie hebben dan mastermixen D en B. mastermixen A en C hebben meer probe per reactie dan mastermixen B en D en zijn dus in staat om een sterkere fluorescentie te laten zien. Het effect van extra primer per reactie toe te voegen is minimaal, in het geval van A en C zwakt de extra 0,5µl primer de reactie zelfs af. In het geval van D en B is er wel een lichte versterking te zien.



Tabel 24 Door de GIVa met vier verschillende primer-probe verhoudingen uit te voeren kan worden bepaald in welke verhouding de GIVa het beste werkt.



Figuur 14 GIVa optimale primer-probe verhouding bepaling. De pijlen met de letters aan de rechter kant corresponderen met de verschillende mastermixen weergegeven in tabel 24. Er is een duidelijk verschil te zien tussen A en C aan de ene kant en D en B aan de andere kant. De mastermixen met 1µl probe per reactie (A, C) zijn ruim twee keer zo sterk dan de andere twee mastermixen (D, B). Als er gekeken wordt naar de invloed van meer primer per reactie is te zien dat dit de reactie niet versterkt en in het geval van C zelfs afzwakt.

Nu bepaald is bij welke annealing temperatuur en met welke mastermix de GIVa optimaal werkt kunnen alle *Giardia lamblia* positieve monsters uit de KizSS studie worden getypeerd met de GIVa. Dit waren in totaal 206 monsters, deze zijn allemaal met de GIVa getest. Een aantal van deze monsters werd ook met de voorgaande techniek getypeerd. Deze techniek omvat het amplificeren en sequencen van het TPI gen. Voor deze techniek zijn op het RIVM twee protocollen aanwezig, met beide protocollen zijn een aantal monsters getypeerd. In tabel 25 is te zien hoe de verschillende testen hebben gescoord. De GIVa is er in geslaagd 68.93% van de monsters succesvol te typen. Het eerste TPI protocol doet het erg slecht met slechts 16.79%, Het tweede protocol doet het al wel beter met 51.35% maar is nog steeds duidelijk minder goed.

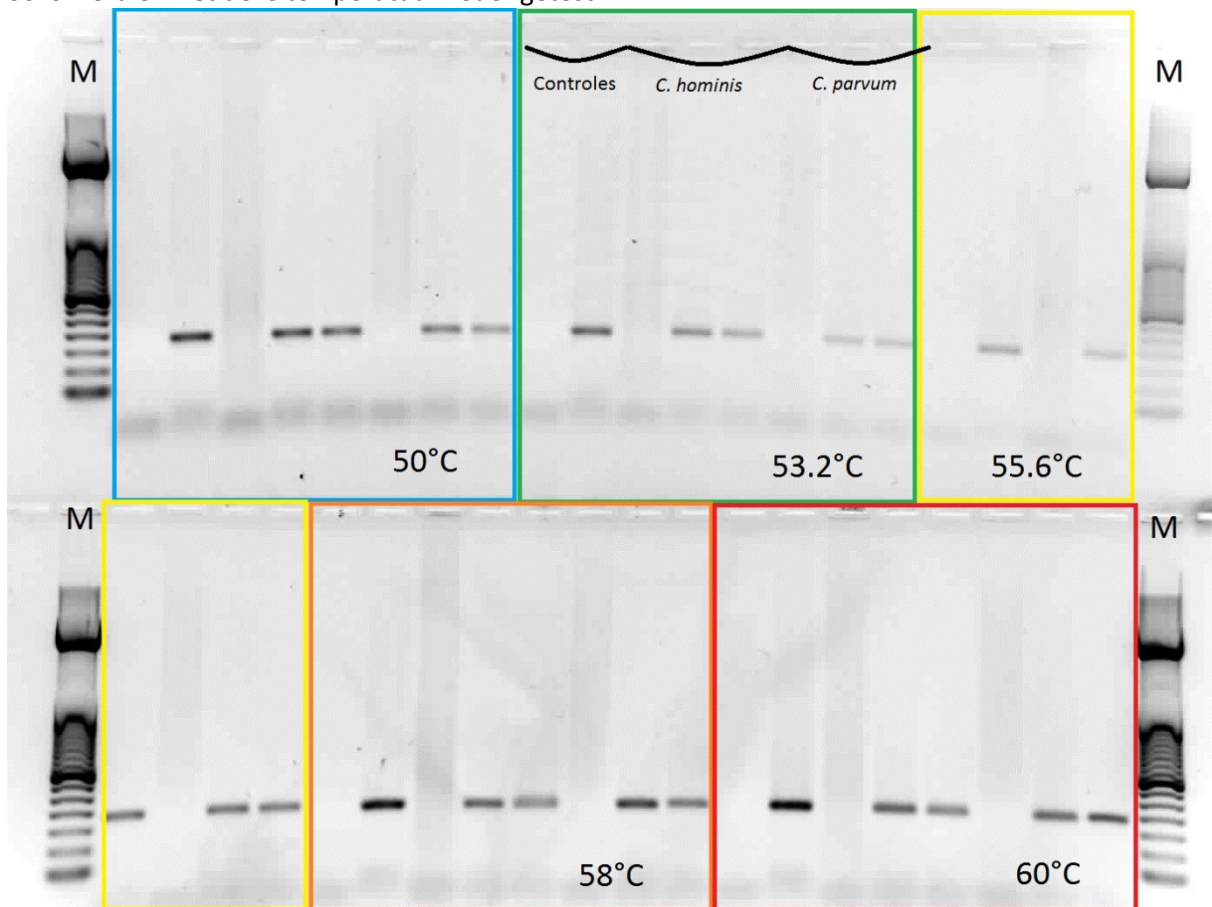
Tabel 25 In de eerste kolom is de test weergegeven, vervolgens wordt er per test aangegeven bij hoeveel monsters het is gelukt een positieve uitslag te genereren en ook bij hoeveel dit niet is gelukt. Met de GIVa is het gelukt om 68.93% van alle monsters succesvol te typen. Met het eerste TPI protocol was dit slechts 16.79%, met het tweede TPI protocol was dit al hoger (51.35%) maar dit was nog steeds slechter dan met de GIVa. Alle testen hebben iets vaker Assemblage B aangetoond dan Assemblage A maar dit is geen groot verschil.

Test	Assemblage A	Assemblage B	Negatief	Totaal
GIVa	65 (31.55%)	77 (37.38%)	64 (31.07%)	206
TPI	7 (5.11%)	16 (11.68%)	114 (83.21%)	137
TPI 2	9 (24.32%)	10 (27.03%)	18 (48.65%)	37

3.2 *Cryptosporidium*

3.2.1 CryptoSH

Het eerste dat gedaan moest worden was het bepalen van de optimale annealing temperatuur. Dit werd gedaan als klassieke PCR. Er werd bij vijf verschillende temperaturen tussen de 50-60°C getest (Figuur 15). Per temperatuur werden er acht reacties gedaan, een negatieve en een positieve controle, een *C. hominis* positief monster onverdund, 1:10 en 1:100 verdund en een *C. parvum* positief monster met dezelfde verdunningen. In Figuur 15 is te zien dat de reacties bij 58°C en 60°C de dikste bandjes geven en dat de sterkte van de reactie afneemt als de annealing temperatuur daalt. De reactie bij 50°C daarentegen is wel weer iets sterker dan de reacties bij 53.2°C en 55.6°C. Aangezien de voorspelde T_m rond de 60°C lag en de test laat zien dat het een sterke reactie geeft bij 60°C werd er met deze temperatuur verder getest.



Figuur 15 Bepaling van de optimale annealing temperatuur voor de CryptoSH. Dit werd als klassieke PCR uitgevoerd op de Biometra thermocycler Tprofessional. Er zijn vijf verschillende temperaturen getest tussen de 50°C en de 60°C. Bij elke temperatuur werden acht reacties uitgevoerd, een negatieve en een positieve controle en vervolgens drie verdunningen van *C. hominis* en *C. parvum*.

Met de optimale annealing temperatuur bekend kon de optimale primer-probe verhouding bepaald worden op de LightCycler® 480. Ook werd de *C. hominis* IbA10G2 genotype specifieke qPCR nu bij de MPX reactie toegevoegd. Om de optimale primer-probe verhouding te bepalen werd de CryptoSH met vier verschillende mastermixen uitgevoerd (tabel 26). In figuur 16 zijn de resultaten te zien van de *C. hominis* reactie, het was duidelijk dat de reactie met mastermix C het sterkste was. De Cp waarde verandert vrijwel niet bij de verschillende mastermixen, alleen de maximale fluorescentie was sterk verhoogd bij mastermix C.



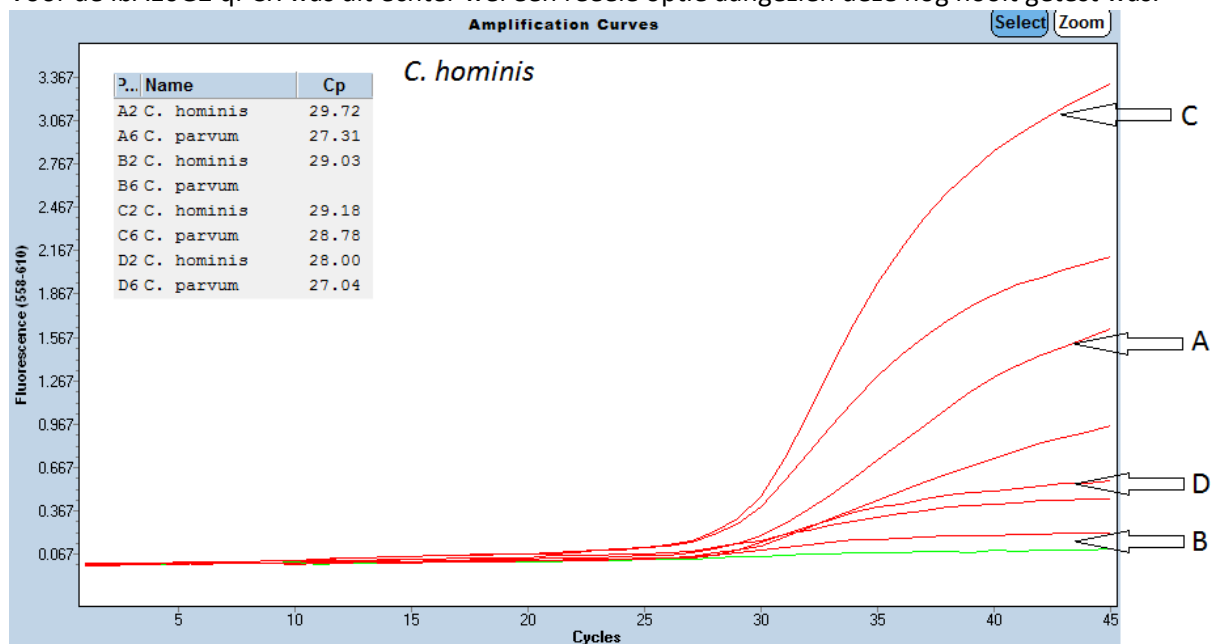
Tabel 26 Verschillende mastermixen met de verschillende primer-probe verhoudingen

Mastermix	Primer (μ l/reactie)	Probe (μ l/reactie)
A	1	1
B	1	0.5
C	1.5	1
D	1.5	0.5

De specificiteit van de CryptoSH leek echter niet in orde. De *C. parvum* monsters waren ook positief in de *C. hominis* reactie. Als de resultaten van de Iba10G2 specifieke qPCR werden bekeken bleken ook hier zowel *C. hominis* als *C. parvum* monsters positief te zijn.

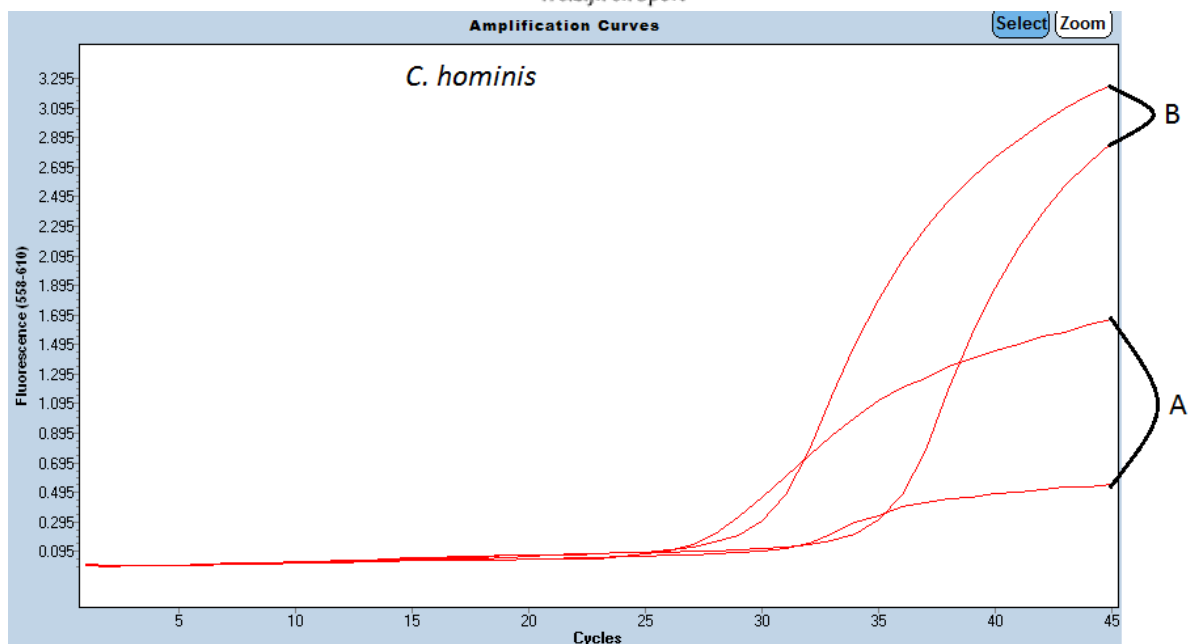
Mogelijke verklaringen zouden zijn dat de CryptoSH

niet specifiek was of dat er monsterverwisseling heeft plaats gevonden. Dit zou ervoor kunnen zorgen dat er per ongeluk twee keer een *C. hominis* monster is gebruikt en geen *C. parvum*. Een gebrekkige specificiteit is echter onwaarschijnlijk omdat de CryptoSH door een ander laboratorium ontwikkeld, getest en gepubliceerd is en daarom naar verwachting gewoon goed zou moeten zijn. Voor de Iba10G2 qPCR was dit echter wel een reële optie aangezien deze nog nooit getest was.



Figuur 16 Bepaling van de optimale primer-probe verhouding in de CryptoSH. In de *C. hominis* reactie geeft mastermix C (tabel 26) verreweg de sterkste reactie. Het klopt echter niet dat de *C. parvum* monsters positief zijn in deze reactie.

Wat ook nog een mogelijke verklaring kon zijn was dat de Iba10G2 qPCR niet samen gaat met de CryptoSH in één multiplex. Om dit te controleren werd de qPCR met twee verschillende mastermixen getest, in mastermix A zat de CryptoSH met de Iba10G2 qPCR en in mastermix B zonder. In figuur 17 is te zien dat het weglaten van de Iba10G2 qPCR ervoor zorgt dat de *C. hominis* qPCR ruim twee keer zo sterk werd. Dit laat zien dat de Iba10G2 qPCR inderdaad veel remming veroorzaakte in de multiplex. Echter was de *C. parvum* reactie nog steeds niet positief en waren de *C. parvum* monsters wel positief in de *C. hominis* reactie. Dit zou betekenen dat de *C. hominis* qPCR niet specifiek is en er dus niet mee verder gewerkt kon worden.



Figuur 17 CryptoSH remmings bepaling, reactie A is de CryptoSH met de IbA10G2 qPCR en reactie B zonder. Het is duidelijk dat de IbA10G2 qPCR remming veroorzaakt in de multiplex reactie. Mastermix A heeft ruim twee keer zoveel fluorescentie dan mastermix B.

3.2.2 CryptoMK

Door de verdenking dat de CryptoSH niet specifiek was werd besloten om een nieuwe qPCR te ontwikkelen. Als target is voor het GP60 gen gekozen want in dit gen zijn veel sequentieverschillen tussen *C. hominis* en *C. parvum* waardoor het makkelijker is om specifieke primers en probes uit te zoeken. In Figuur 18 is de alignment van deze twee sequenties te zien met de primers en probes erin verwerkt. De blauwe stukjes sequentie corresponderen met de aanhechtingsplekken van de forward primers, de groene stukjes de probes en de rode stukjes van de reverse primers.

CparGP60 aggcagctcaaga-----ttctagtggctactgaagcttctgg
ChomGP60 aga aaagaacaatgaagaaagccaaa ctcccgcctagtcctggaaagtgggtggggtgagtga
* * * * *
CparGP60 tagccagggttctgaa-----gaggaaggtagtgaagcagatgg
ChomGP60 aggacaagatac tcaagggtggctccaaaggagacgctgaggaaggcactgaagacaatga
* * * * *
CparGP60 ccaaaactagtg---ctgcttcccaacc cactactccagctcaaagtgaaggcgcaactac
ChomGP60 acaagcgcgat agagtgctacccaaccttctacc ccagggtcaaggc---tcggttaaaac
* * * * *
CparGP60 cgaaccatagaaagctactccaaaagaagaatgcggcacttcatttgtaatgt ggttcgg
ChomGP60 cgaatccacagaaactactccaaaggagaagtgcgggtacttcatttgtaatgtggttcgg
* * * * *
CparGP60 agaaggtaccgccagctgcgcattgaagtgtggtgcctacactatcgtctatgcacct at
ChomGP60 acagggtgtttccagtcgcaactttgaagtgcgggtgactatactatggtctatgcaccaga
* * * * *
CparGP60 aaaagaccaaaccagatcccc caccaagatatatctctggtgaagttacatctgtaacctt
ChomGP60 aaaggacaaaaccagatccgcaccaaga-----
* * * * *

Forward primer
Probe
Reverse primer

Figuur 18 De alignment van de verschillende sequenties voor de CryptoMK. De accession numbers van de gebruikte referentiesequenties zijn: JF727788 voor *ChomGP60* en HQ398323 voor *CparGP60*. De accession numbers verwijzen naar sequenties in GenBank, de NCBI database. De gemarkeerde stukken laten de aanhechtingsplekken van de primers en probes zien. Rekening houden met het feit dat de reverse primers eigenlijk de reverse-complementaire versie zijn van deze sequenties.

De PCR werd eerst als klassieke PCR getest om te bepalen of de primers goed werkten. Hier bleek de *C. parvum* reactie echter ook niet te werken en bij de *C. hominis* reactie waren weer beide soorten positief. Hierop werd besloten met een andere set van monsters te werken. Bij deze monsterset



bleek een monster wel positief in de *C. parvum* reactie en negatief in de *C. hominis* reactie. Dit monster is herhaald met de CryptoSH voor bevestiging met inderdaad hetzelfde resultaat. Omdat de CryptoSH en de CryptoMK op deze monsterset kennelijk wel een onderscheid tussen *C. hominis* en *C. parvum* konden maken was het waarschijnlijk dat er sprake van monsterverwisseling was in de voorgaande monsterset. Om dit te achterhalen is de gehele monsterset van de *Cryptosporidium* uitbraak opnieuw getypeerd. Deze 448 monsters zijn getypeerd met de CryptoSH omdat de probes voor de CryptoMK nog niet aanwezig waren. In Tabel 27 is de vergelijking tussen de GP60PCR en de CryptoSH te zien.

Tabel 27 Uitslag typering *Cryptosporidium* uitbraak monsters. Zowel de voorgaande techniek als de CryptoSH. Er zijn wel een aantal discrepanties tussen de uitslagen. Per test wordt bij de uitslag het absolute getal en het percentage vermeld.

Test	<i>C. hominis</i>	<i>C. parvum</i>	Negatief	Totaal	Discrepanties
Oude typering	191(42.63%)	20(4.46%)	237(47.10%)	448	18
CryptoSH	348(77.68%)	50(11.16%)	49(10.94%)	448	

Om te controleren of de opgetreden discrepanties niet mogelijk fouten van de CryptoSH waren werd een aantal van de monsters die een discrepantie vertoonde nog een keer op de oude manier getypeerd. Hieruit bleek dat elk monster overeen kwam met de uitslag die de CryptoSH had geproduceerd.

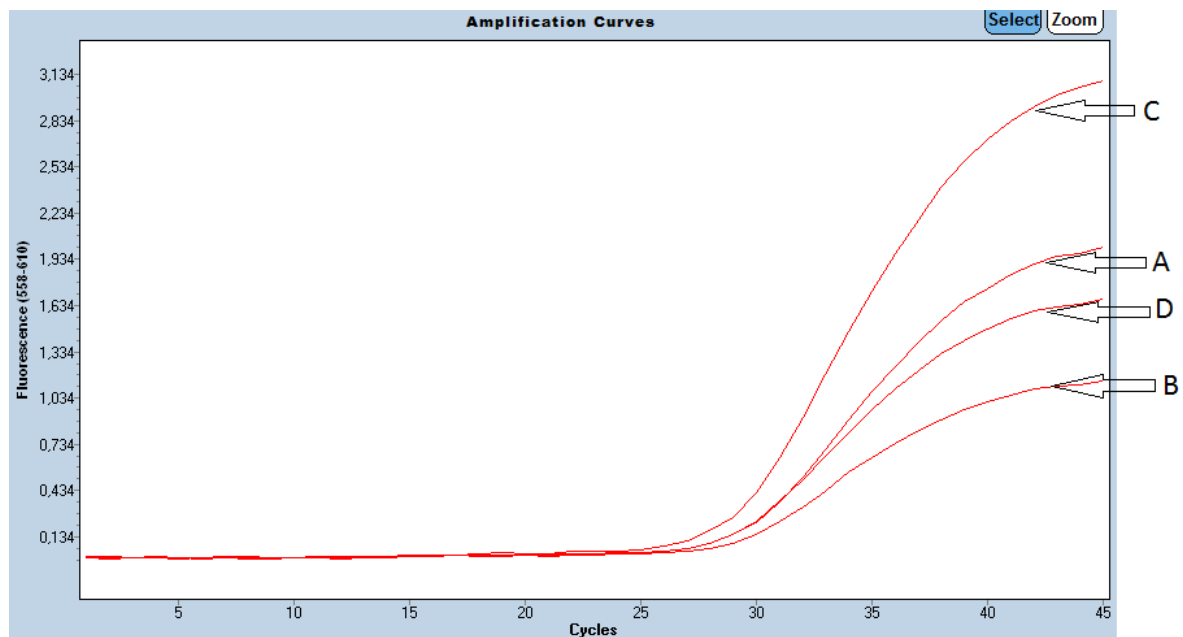
3.2.3 CryptoSH of CryptoMK?

Omdat we nu de beschikking bleken te hebben over twee PCR testen die onderscheid in beide *Cryptosporidium* sp. kunnen maken is er getest welke van de twee de optimale is. Voor de CryptoMK werden ook probes besteld zodat de twee PCR's met elkaar vergeleken konden worden om zo de optimale qPCR te bepalen.

Eerst werd een optimale primer-probe verhouding bepaald voor de CryptoMK. Dit gebeurde op dezelfde manier als bij de andere PCR's. Vier verschillende mastermixen (tabel 28) werden gemaakt, elk met een andere primer-probe verhouding. In figuur 19 is te zien dat mastermix C beduidend beter werkt dan de andere mastermixen. Dit is echter alleen de uitslag van de *C. hominis* reactie. Bij de *C. parvum* reactie was weer alles negatief. Op deze monsters is gel elektroforese uitgevoerd en bleek wel amplificatie te zijn opgetreden. Dit betekent dat de probe niet werkt want de PCR heeft wel degelijk amplificatie bewerkstelligd.

Tabel 28 Verschillende mastermixen voor de optimale primer-probe bepaling van CryptoMK

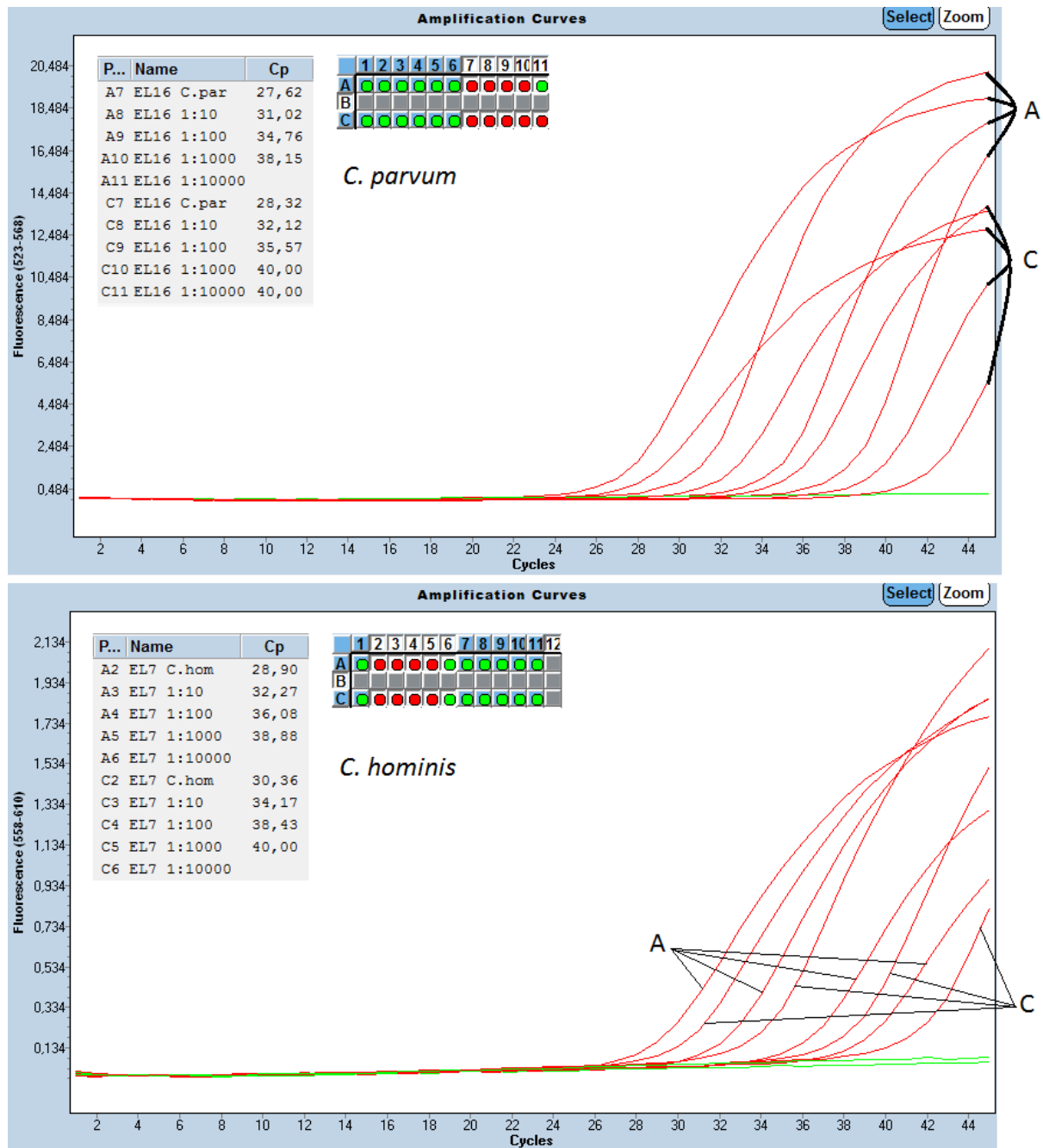
Mastermix	Primer (µl/reactie)	Probe (µl/reactie)
A	1	1
B	1	0.5
C	1.5	1
D	1.5	0.5



Figuur 19 Bepaling optimale primer-probe verhouding in de CryptoMK. Letters komen overeen met de mastermixen in Tabel 28. Resultaten van de *C. hominis* reactie.

De ideale typerings PCR is een combinatie van mijn *C. hominis* reactie en de S. J. Hadfield *C. parvum* reactie, de CryptoTyp (Multiplex *Cryptosporidium* Typering qPCR). In figuur 20 is de bepaling te zien. Reactie A is de CryptoTyp en de reactie C is de CryptoSH.

De *C. parvum* reactie laat een sterkere fluorescentie zien bij de A reactie en de Cp waarden zijn allemaal ongeveer één punt sterker dan bij de C reactie. Bij *C. hominis* is de maximale fluorescentie niet verhoogd bij de A reactie. Wel zijn de Cp waarden ruim één punt sterker dan bij de C reactie. Om aan te tonen dat deze qPCR inderdaad beter werkt dan de CryptoSH zijn de 49 niet te typeren monsters uit de *Cryptosporidium* uitbraak monsterset opnieuw getypeerd met de CryptoTyp. Deze is erin geslaagd 14 monsters alsnog te typeren. Het bleek nu mogelijk om 92.2% van de monsters te typeren met de CryptoTyp, ruim voorbij het vooraf gestelde doel van 80%.



Figuur 20 CryptoTyp en CryptoSH, bovenste helft geeft de *C. parvum* reactie weer en de onderste helft de *C. hominis* reactie. De A reactie is de CryptoTyp. De C reactie is de CryptoSH. Het is duidelijk dat overall de A reactie beter is. In beide reactie is de Cp waarde sterker bij reactie A en bij de *C. parvum* reactie is de fluorescentie ook nog hoger.



4. Conclusie/discussie

Giardia lamblia

Bij het testen op de klassieke PCR bij verschillende temperaturen werd duidelijk dat de PCR behoorlijk robuust is. Bij bijna alle temperaturen tussen de 50°C en 60°C werkte de PCR goed. Alleen bij 50°C was te zien dat de reactie iets minder sterk werd. Bij het overbrengen van de PCR naar de LightCycler 480® bleek dat de annealing temperatuur omhoog moest. Bij een annealing temperatuur van 55°C, wat volgens de klassieke PCR het optimum had moeten zijn, was op de LightCycler® 480 vrijwel geen specifieke amplificatie opgetreden. De 5C1-P21-A reactie was zelfs geheel negatief op de LightCycler® 480 met deze annealing temperatuur. Bij een verhoogde annealing temperatuur werd de PCR uiteindelijk toch nog een beetje positief maar vergeleken met de andere reacties was dit alsnog heel erg zwakjes. Er kon geconcludeerd worden dat de 5C1-P21 primerset niet gemaakt was voor de LightCycler® 480 en dat er vaker getest zou gaan worden met de 4E1-HP primerset.

Wat erg opviel bij de klassieke PCR was dat de onverdunde monsters meestal negatief waren maar de 1:10 verdunning van hetzelfde monster positief. Een verklaring hiervoor is remming. Omdat het materiaal voor de PCR werd geïsoleerd uit faeces bleef er vaak veel contaminatie achter in het materiaal. Dit reageerde in de PCR waardoor deze niet goed werkte. Dit zorgde ervoor dat bij de onverdunde monsters geen amplificatie optrad maar bij de 1:10 verdunning wel omdat hier minder remming plaats vond. Bij het uitvoeren van de GLVa vond echter vrijwel geen remming meer plaats. Dit kwam waarschijnlijk omdat er in de GLVa BSA aan de mastermix werd toegevoegd. BSA zorgt voor stabilisatie van de enzymen in de mastermix, hierdoor hebben ze minder last van remming en werkte de GLVa wel gewoon.

Bij het testen van de verschillende primer-probe verhoudingen was heel mooi zichtbaar dat 1µl probe (5pmol) per reactie veel beter is voor de reactie dan 0,5µl probe. De reactie geeft ruim twee keer zoveel fluorescentie. Dit is belangrijk omdat zwak positieve monsters nu meer kans hebben om alsnog boven de threshold te komen. Het toevoegen van 1,5 i.p.v. 1µl primer (10pmol) per reactie maakte echter bijna geen verschil. De reactie leek er zelfs iets minder sterk van te worden. Aangezien het toevoegen van extra primer per reactie geen positief effect had op de qPCR werd er gekozen om deze op 1µl primer per reactie te houden. Op deze manier wordt er minder reagens gebruikt per reactie waardoor de prijs per reactie ook omlaag gaat.

Nu alle optimale condities bekend waren voor de GLVa kon deze echt toegepast gaan worden. Dit werd gedaan door alle *Giardia lamblia* positieve KizSS monsters te typeren. Het doel was om 80% van de 206 monsters succesvol te typeren. Dit is niet gelukt, er werden in totaal 141 monsters succesvol getypeerd en dit is 68.9%. Het is echter nog steeds een stuk beter dan de resultaten die werden behaald met de voorgaande typeringsmethoden. Met deze typeringsmethoden was nog geen 20% succesvol te typeren. Het was bekend wat de Cp waarden van de monsters waren toen ze met de detectie qPCR werden aangetoond. Er was een duidelijk verband te zien tussen de monsters die niet te typeren waren en de Cp waarden van deze monsters. Vrijwel alle monsters met een Cp waarde sterker dan 31-30 werden in de GLVa positief. Was deze Cp waarde zwakker kwam het vrijwel niet voor dat deze succesvol getypeerd kon worden. Dit betekent dat de qPCR niet heel gevoelig is en dat er dus een behoorlijke hoeveelheid *Giardia lamblia* aanwezig moet zijn in het monster voordat deze getypeerd kan worden.

Cryptosporidium

Het testen van de *Cryptosporidium* PCR is met problemen gepaard gegaan. Bij de CryptoSH waren de primers niet specifiek voor de *Cryptosporidium* sp. en zonder gebruik van de probes is het onderscheid tussen *C. parvum* en *C. hominis* niet te maken. Er is wel een klein lengteverschil in PCR producten van beide soorten, 3 bp, maar dit is met een agarosegel niet te zien. Pas toen de CryptoSH op de LightCycler® 480 werd uitgevoerd, werd duidelijk dat de *C. parvum* reactie het niet deed. Misschien deed de *C. parvum* reactie het niet goed door remming of competitie van de andere reacties. Maar bij het uitvoeren van de *C. parvum* reactie als singleplex was deze nog steeds negatief. Met gel elektroforese was te zien dat er wel amplificatie was opgetreden. Er waren nu twee



mogelijkheden; de *C. parvum* probe werkt niet waardoor de primers wel voor amplificatie zorgen maar er geen werkende probe is voor de fluorescentie, of het was een *C. hominis* monster omdat deze natuurlijk ook worden geamplificeerd door de primers maar de probe kan dan niet aanhechten. De *C. hominis* reactie werd wel een stuk sterker als de IbA10G2 reactie weg werd gelaten. Met die kennis is de IbA10G2 qPCR ook even laten liggen en is er niet echt mee doorgewerkt.

Na voor ons gevoel alle mogelijkheden bekeken te hebben en nog steeds geen goed resultaat te hebben werd besloten een nieuwe PCR te ontwikkelen, de CryptoMK. Deze had wel specifieke primers en een groter verschil in PCR product lengte zodat ook op de klassieke PCR onderscheid gemaakt kon worden. De PCR mislukte echter bij de eerst poging precies op dezelfde manier als de CryptoSH.

Tijdens het testen met een andere monsterset werd er opeens een monster positief in de *C. parvum* reactie. Bij herhaling met de CryptoSH was dit monster ook positief bij *C. parvum*. Toen leek het er toch op dat constant alleen maar *C. hominis* monsters zijn getest. Om dit te achterhalen werd de gehele monsterset opnieuw getypeerd. In deze 448 monsters zaten uiteindelijk 18 discrepanties, deze zijn gecontroleerd door ze nog eens te sequencen. Dit liet zien dat de documentatie inderdaad verkeerd was. Bijna 90% van alle monsters kon succesvol getypeerd worden, dit is een mooi resultaat aangezien het doel was 80% van de monsters succesvol te kunnen typeren.

Toen waren er opeens twee werkende PCR's en werden de probes besteld en getest van de CryptoMK. Deze PCR had wel een positief effect van de 1,5µl primer per reactie dus hier werd 1,5µl primer en 1µl probe per reactie gebruikt. De *C. parvum* reactie was echter geheel negatief. Er werd gel elektroforese uitgevoerd op deze monsters en er bleek wel amplificatie te zijn. Dit betekende dat de probes niet werkte aangezien de rest van de PCR het wel had gedaan. Daarom hadden we nu nog maar één optie voor de *C. parvum* reactie en twee opties voor de *C. hominis* reactie. Bij het testen bleek de een combinatie van de *C. parvum* reactie van S. J. Hadfield en de *C. hominis* reactie van mij, de CryptoTyp, het beste werkten. Beide reacties kregen een hogere Cp waarde als mijn *C. hominis* reactie werd gebruikt. De *C. parvum* reactie kreeg ook nog een hogere fluorescentie. Blijkbaar hadden de S. J. Hadfield reacties een remmende werking op elkaar.

Om aan te tonen dat de CryptoTyp inderdaad beter is werden alle 49 niet te typeren monsters van de *Cryptosporidium* uitbraak opnieuw getypeerd. Van deze monsters werden er 14 succesvol getypeerd. Dit laat zien dat de CryptoTyp inderdaad beter is en in staat is meer monsters succesvol te typeren. Het is nu mogelijk 92.2% van de *Cryptosporidium* monsters te typeren.

Bij de detectie multiplex PCR wordt gebruik gemaakt van controle DNA. Voor de *Cryptosporidium* detectie PCR is er DNA van een *Cryptosporidium*kweek. Hiervan is relatief veel van beschikbaar. Het zou wenselijk zijn als iets dergelijks aanwezig zou zijn voor zowel *G. lamblia* als beide *Cryptosporidium* sp. Aangezien er nu geen controle DNA is voor de qPCR's. Toch is het voor het screenen van een grote hoeveelheid monsters niet direct een onoverkomelijk probleem omdat er eigenlijk altijd monsters getest zullen worden waarvan al bekend is dat ze *Giardia lamblia* dan wel *Cryptosporidium* positief zijn. Als er dan een hele reeks positieve monsters wordt getest is het zeer waarschijnlijk dat er altijd wel één monster positief uit de reactie komt. Zolang er één monster positief is in de reactie kan al met zekerheid gezegd worden dat alle PCR componenten zijn toegevoegd. Is helemaal geen monster positief dan wordt het toch wel onhandig. Dan zou de qPCR opnieuw gedaan moeten worden, is dan weer alles negatief kan je nooit met zekerheid zeggen dat alles negatief is omdat je geen positieve controle hebt. Het is dus zaak om DNA als positieve controle voor beide soorten te verkrijgen.

Ook zijn voor beide qPCR's geen gevoeligheidsbepalingen uitgevoerd. Voor een dergelijke bepaling moet er een monster aanwezig zijn waarvan precies bekend is hoeveel DNA erin zit. Dit was nog niet aanwezig op het RIVM waardoor het nog niet mogelijk was deze bepaling uit te voeren.



5. Bronnenlijst

- I. Vanni et al.; Detection of *Giardia duodenalis* Assemblage A and B in Human Feces by Simple, Assemblage-Specific PCR Assays; Plos|neglected tropical diseases; Volume 6|Number 8|e1776; 2012
- Debbie-Ann T. Shirley et al.; Burden of disease from cryptosporidiosis; Lippincott Williams & Wilkins; Volume 25|number 5; 2012
- Enserink et al.; The KlzSS network, a sentinel surveillance system for infectious diseases in day care centers; BMC Infectious Diseases; 12:259; 2012
- J. W. B. van der Giessen et al.; Genotyping of *Giardia* in Dutch patients and animals: A phylogenetic analysis of human and animal isolates; International Journal for Parasitology; volume 36|Blz. 849-858; 2006
- P. R. Gargantini et al.; Putative SF2 helicases of the early-branching eukaryote *Giardia lamblia* are involved in antigenic variation and parasite differentiation into cysts; BMC Microbiologie; 12:284; 2012
- A. Almaida et al.; Genotyping of *Giardia duodenalis* Cysts by New Real-Time PCR Assays for Detection of Mixed Infections in Human Samples; Applied and Environmental Microbiology; Volume 76|Number 6|Blz. 1895-1901; 2010
- J. J. Verweij et al.; Simultaneous Detection of *Entamoeba histolytic*, *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium parvum* in Fecal Samples by Using Multiplex Real-Time PCR; Journal of Clinical Microbiology; Volume 42|Number 3|Blz. 1220-1223; 2003
- A. S. Breathnach et al.; Prevalence and clinical correlations of genetic subtypes of *Giardia lamblia* in an urban setting; Epidemiology and Infection; Volume 138|Number 10|Blz. 1459-1467; 2010
- D. Leitsch et al.; Pyruvate:ferredoxin oxidoreductase and thioredoxin reductase are involved in 5-nitroimidazole activation while flavin metabolism is linked to 5-nitroimidazole resistance in *Giardia lamblia*; Journal of Antimicrobial Chemotherapy; Volume 66|Blz. 1756-1765; 2011
- Noa Tejman-Yarden et al.; A reprofiled drug, auranofin, is effective against metronidazole-resistant *Giardia lamblia*; American Society for Microbiology; 2013
- J. T. Nazeer et al.; Use of multiplex real-time PCR for detection of common diarrhea causing protozoan parasites in Egypt; Springer-Verlag Berlin Heidelberg; 2012
- H. Sprong et al.; Identification of Zoonotic Genotypes of *Giardia duodenalis*; PLoS|Neglected Tropical Diseases; Volume 3|Number 12; 2009
- V. McDonald; Cryptosporidiosis: host immune responses and the prospects for effective immunotherapies; Expert Review of Anti-infective Therapy; volume 9|Number 11| 2011
- R. M. Chalmers; Waterborne outbreaks of cryptosporidiosis; Ann Ist Super Santina; Volume 48|Number 4|Blz. 429-446; 2012



- R. K. Saiki; primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase; Science; 1988
- S. V. Angus et al.; Field-deployable and near-real-time optical microfluidic biosensors for single-oocyst-level detection of *Cryptosporidium parvum* from field water samples; Journal of Environmental Monitoring; Volume 14 | Blz. 3295-3304; 2012
- S. J. Hadfield; Detection and Differentiation of *Cryptosporidium* spp. In Human Clinical Samples by Use of Real-Time PCR; Journal of Clinical Microbiology; Volume 49 | Number 3 | Blz. 918-924; 2011
- F. Sanger et al.; DNA sequencing with chain-terminating inhibitors; Proceedings of the National Academy of Sciences; Volume 74 | Number 12 | Blz. 5463-5467; 1977
- U. Ryan and M. Power; *Cryptosporidium* species in Australian wildlife and domestic animals; Parasitology; Volume 139 | 1673-1688; 2012
- I. M. Sulaiman et al.; Unique Endemicity of Cryptosporidiosis in Children in Kuwait; Journal of Clinical Microbiology; Volume 43 | number 6 | Blz. 2805-2809; 2005
- V. Rasková et al.; Human Cryptosporidiosis Caused by *Cryptosporidium tyzzeri* and *C. parvum* Isolates Presumably Transmitted from Wild Mice; Journal of Clinical Microbiology; Volume 51 | Number 1 | Blz. 360-362; 2012
- W. B. Strong et al.; Cloning and Sequence Analysis of a Highly Polymorphic *Cryptosporidium parvum* Gene Encoding a 60-Kilodalton Glycoprotein and Characterization of Its 15- and 45-Kilodalton Zoite Surface Antigen Products; Infection and Immunity; Volume 68 | Number 7 | Blz. 4117-4134; 2000
- Genomes 3; edited by T.A. Brown; Garland Science Publishing 2007
- a. <http://www.u.arizona.edu/~gwatts/azcc/InterpretingSpec.pdf>



6. Bijlagen

6.1 Werken in de vier V3 PCR laboratoria en de LightCyclerruimte V307

Ruimten:

V312 (Reagens-lab) en **V316** (Toevoeg-lab) zijn ruimten met overdruk t.o.v. de sluis; alleen te betreden via een sluis met relatieve overdruk, n.l. t.o.v. van de gang.

V322 (RNA-lab) en **V313** (DNA-lab) zijn BSL2 laboratoria met onderdruk, alleen te betreden via een sluis met relatieve overdruk, n.l. t.o.v. van de gang en labruimte.

Doel:

Verhinderen van contaminatie van de hierboven genoemde schone labs, d.w.z. de reagentia en klinisch materiaal met PCR-amplicons. DUS breng NOOIT PCR-PRODUCTEN, LABJOURNAALS, IJS in deze laboratoria!

Ruimtegebruik:

1. V312 (**Reagens-lab**) wordt alleen gebruikt om buffers en PCR-mixen te maken en uit te vullen.
RNase's en DNase's zijn niet toegestaan in dit lab.
Niet voor klinisch materiaal, RNA, DNA.
2. V316 (**Toevoeg-lab**) wordt alleen gebruikt om uit-klinisch-materiaal-geïsoleerd DNA/RNA toe te voegen aan de PCR mix.
Niet voor inzetten Nested PCR.
Niet voor opslag van uit-klinisch-materiaal-geïsoleerd DNA/RNA.
3. V322 (**RNA-lab**) wordt alleen gebruikt om RNA uit klinisch materiaal te isoleren.
Niet voor opslag van uit-klinisch-materiaal-geïsoleerd DNA/RNA.
4. V313 (**DNA-lab**) wordt alleen gebruikt om DNA uit klinisch materiaal te isoleren.
Niet voor opslag van uit-klinisch-materiaal-geïsoleerd DNA/RNA.

PCR-labbeheerders:

Shireen Jenny - 4145

Bas van der Veer - 3955

Ruimtebeheerders:

1. V312 (Reagens-lab, tel:4521): Pieter Overduin - 3948
2. V316 (Toevoeg-lab, tel:4522): Willemijn Lodder - 3928
3. V322 (RNA-lab, tel:4523): Edin Jusic - 3955
4. V313 (DNA-lab, tel:4524): Manoj Fonville - 4539

Werkafspraken:

- **ROUTING:** Nooit op dezelfde dag van een vuile naar een schone ruimte gaan, waarbij de ruimten met gelelectroforese, S108 en V321 vuile ruimten zijn.
- **Reserveer** werkruimte in de agenda's of noteer dat je er gaat werken. Per dagdeel of tijdsperiode. Indien reservering niet doorgaat, doorstrepen in agenda.
- Alvorens één van de 4 LAB's naar **binnen** te **gaan**: Controleer de druk boven de deur, moet >12,5 Pa zijn.



Neem geen spullen van de 'gewone' laboratoria mee naar binnen.

Sluit de buitendeur altijd af! Of je nu weggaat of binnenkomt. Open nooit de binnendeur alvorens de buitendeur dicht is. Open nooit de buitendeur alvorens de binnendeur dicht is. De buitendeur is dus altijd op slot, of er gewerkt wordt of niet.

- Draag altijd een wegwerpjasje en handschoenen en deze in het lab, niet in de sluis, aantrekken. **Eerst jasje aantrekken en vervolgens de handschoenen.** In de LABs hangen jassen en de Schoonmaakploeg vervangt deze periodiek.
- De laminair flowkasten (DNA/RNA LABs) moeten aangezet worden.
- De down-flowkasten (ReagensLAB en ToevoegLAB) moeten **dag en nacht (dus altijd) op halve kracht aan staan.** Als je gaat werken, dan flowkast op volle kracht.
- **Als je klaar bent** met werken in de flowkast dan:
 1. Gooi je de plastic afvalzak weg.
 2. Ruim je de flowkast op.
 3. Desinfecteer je het werkoppervlak eerst met een oplossing van 1 tablet Sumatab in 1 liter water (RVS werkoppervlak corrodeert!) en vervolgens met 70% alcohol.
- **UV lampen** gaan 's nachts 2 uur aan in de down-flowkasten ter algehele sterilisatie in ReagensLAB en ToevoegLAB.
In het DNA/RNA LAB zet je de UV lamp aan na de werkzaamheden.
- Let op de **eppenvoorraden** in de LABs. Vul zonodig een bekersglas aan en zet het overnacht in de 80°C stoof. Vermeld de datum op de tape. Stoven staan in sluizen van ReagensLAB en ToevoegLAB.
- Voor het ReagensLAB geldt, dat een **ieder zijn eigen werkoplossingen** heeft en dat alle algemene reagentia in voorraad zijn (ladenblok, koelkast of vriezer). Op de lijst dien je in te tekenen wat je gebruikt en zal bijgehouden worden hoeveel er van de werkvoorraden aanwezig is. Dit geldt voor:
Olie, H₂O, dNTPs, AmpliTag, AMV RT, RNase inhibitor.
Iedereen krijgt opslagruimte toegewezen in ladenblok, koelkast en vriezer. Probeer reagentia uit de fabrikantdoosjes te verplaatsen naar de gebruikersdoosjes om ruimte te besparen. Ruimte is schaars!
- Let op filtertips, buizen, epjes etc. in de LABs en de voorraden in de sluizen. Vul **voorraden in de LABs** aan en pak je de één na laatste? Meld dit dreigende voorraadtekort bij de beheerder(s).

Calamiteiten:

Deze NOODPROCEDURES hangen ook in de labs.

- Indien de **luchtdruk** in de flowkast en/of de **overdruk** (gedeeltelijk) **wegvalt** terwijl je aanwezig bent in het lab, wordt de ruimteverantwoordelijke en/of de technische dienst gewaarschuwd.
- Als er niemand in het lab is, dan dient het lab gesloten te blijven (sleutel tijdelijk verwijderen). Laat bericht achter met Naam, Datum, Tijd, Telefoonnummer, Situatie.
- Bij uitval of ontdooien van vriezers de laden in plastic zakken verpakken, dichttappen, en in de inloop -20°C op V4 brengen.

Contaminatie van LC 480 en de ruimte doordat de seals van microtiterplaten kapot gaan wordt verwaarloosbaar geacht.

Swab procedure voor V307, V312 en V316:

Inleiding:



In een laboratorium waar PCR's ingezet worden en amplificatie plaats vindt is altijd een zeker risico op contaminatie met amplificaten aanwezig. Hetzij doordat na de run amplificaten uit de testtubes "ontsnappen" en daarmee de ruimte besmetten hetzij door insleep via kleding en handen vanuit de onbedoeld vervuilde ruimte V3.07 naar de schone ruimten en flowkasten.

Om te weten of er contaminaties opgetreden zijn, worden regelmatig swabs genomen van een vast aantal locaties en deze worden middels PCR getest op relevante targets. Eventueel geconstateerde besmettingen zijn aanleiding om de besmette tafel(s) of kast(en) grondig te decontamineren. Zie Decontaminatie en vervolgens nogmaals te swabben om te controleren of de contaminatie is verdwenen.

Praktisch:

In de praktijk worden twee maal per jaar de tafels in de Lightcyclerruimte V3.07 en de flowkasten in het reagenslab V3.12 en het toevoeglab V3.16 geswabbed.

Locaties:

A	V3.12	flowkast 1
B	V3.12	flowkast 2
C	V3.12	flowkast 3
D	V3.12	flowkast 4
E	V3.12	flowkast 5
F	V3.12	flowkast 6
G	V3.16	flowkast 1
H	V3.16	flowkast 2
I	V3.16	flowkast 3
J	V3.16	flowkast 4
K	V3.16	flowkast 5
L	V3.16	flowkast 6
M	V3.07	centrifuge rotor
N	V3.07	LC midden op de tafel
O	V3.07	LC tafel midden naast twister
P	V3.07	LC rechts naast twister
Q	V3.07	LC rechts naar LC

In totaal 17 meet punten.

Swab procedure:

Draag handschoenen tijdens het afnemen van de swabs.

1. Neem 10 ml falcon buizen met 0.5 ml Tris:EDTA 10mM:1mM pH8 (TE 10:1)
2. Dip de wattenstok in de TE en poets flink over het oppervlak van de tafel of flowkast.
3. Knip de wattenstok af zodat deze in de buis TE past.
4. Vortex de wattenstok minimaal 10 seconden en bewaar de buis bij 4 °C tot de testen gedaan zijn.

Amplificaten zijn zeer stabiel.

PCR testen:

De PCR's worden gedaan op **DNA amplificaten** en afhankelijk van de gebruikte reagentia is er **UTP** in het amplificaat ingebouwd.

De PCR's op swabs gaan daarom niet altijd op de standaard manier.



- Als je een PCR hebt waar UNG of Amperase toegevoegd wordt, moet dit weggelaten worden anders breek je eventuele amplificaten af.
- In geval van onestepkits moet de cDNA stap overgeslagen worden en ook hier GEEN UNG of Amperase toevoegen.

Te testen Targets:

Vanwege het grote aantal testen dat gedaan wordt, is gekozen om:

- 1x per jaar de targets die vaak gevonden worden of in hoge concentraties in monsters voorkomen te testen (Noro, Rota, Influenza, Rhino, BMR).
- 1x per jaar de minder frequent gevonden targets testen (Coxiella, RSV, hepatitis X).
(nb deze lijst is niet bindend, kan per keer aangepast worden).

Resultaten:

De resultaten worden centraal opgeslagen in een exelsheet op Q\LIS\Swabs PCR ruimten.

- Bij negatieve resultaten verder geen actie
- Bij positieve resultaten zal verder uitgezocht moeten worden of er sprake is van artefacten, hoe de contaminatie ontstaan kan zijn en in het vervolg voorkomen kan worden en decontaminatie van de gecontamineerde ruimte(n).
- Bij positieve resultaten moet de betreffende lokatie na het decontamineren nogmaals geswabt en getest worden.
- Leg de bevindingen en eventuele ondernomen acties vast.

Decontaminatie:

Decontaminatie op V307 vindt plaats d.m.v. het afnemen van tafels, rotor en buitenkant apparaten met een zoutoplossing (Fysiologisch zout), vervolgens met Natriumdichloorisocyanuraat (1 tablet per liter water) en ethanol.70%. De vloer wordt wekelijks door ISS met Natriumdichloorisocyanuraat (2 tabletten per 10 L water) schoongemaakt.

In PCR ruimten V316 en V312 worden de flowkasten na ieder gebruik gedecontamineerd met Natriumdichloorisocyanuraat (1 tablet per liter water) en ethanol.70%. De vloer wordt wekelijks door ISS met met Natriumdichloorisocyanuraat (2 tabletten per 10 L water) schoongemaakt.

Dweil-, opruim- en calibratieschema:

Het PCR-lab dient opgeruimd en schoon te zijn. Taken zijn uitgesplitst naar Teams, die wekelijks aanvullen en/of opruimen: Lijst met Team-leden hangt op de V3-labdeuren. De ruimtebeheerders hebben de plicht dit voor hun ruimte te controleren.

Taken zijn:

- Disposables
- WIVA-vaten afvoer en prullenbak sluis, het WIVA-vat in LC ruimte V307 moet iedere week worden vervangen ongeacht hoe vol deze is.
- Transportrekjes
- Afvoeren afval en labjassen
- Onderhoud vriezer/koelkasten
- Afvoer chemisch afval; chloor en alcohol labvoorraad

De vloeren van de 4 PCRlabs én V307 worden wekelijks gedweild door ISS-medewerker (mbv Suma-tab). Aftekenlijsten hangen in de afzonderlijke labs.



Gebruiksaanwijzing koelblokken in V3-PCR ruimten:

Er zijn drie soorten goudkleurige aluminium koelblokken:

- 1) voor 1.5-2 ml Eppendorf of Sarstedt reactievaatjes.
- 2) voor 0.5 PCR reactievaatjes.
- 3) voor 0.2 PCR reactievaatjes of 96 wells platen.

Hierbij horen: koelelementen, blauwe piepschuimen doosjes, transportrekjes (polycarbonaat), en Boehringer opslagdoosjes.

De koelelementen (1°C) en de koelblokken staan altijd in de -20°C vriezer.

Als onderstaande procedure wordt aangehouden zal de temperatuur van een oplossing van 20°C binnen enkele minuten tussen 0°C en 4°C zijn. De temperatuur loopt vervolgens met 2°C per uur op. Dus bij kritische applicaties op tijd koelelement en blok vervangen.

Het is **ABSOLUUT VERBODEN** om:

- 1) de koelelementen in te drukken omdat het materiaal dan niet meer in zijn oorspronkelijke vorm terugkomt.
- 2) epjes in de rand van de piepschuimen doosjes te drukken.
- 3) de koelblokken mee te nemen naar een ander ruimte.
- 4) de Boehringer opslagdoosjes mee te nemen naar een ander ruimte.
- 5) transportrekjes te gebruiken voor opslag.

Procedure:

- 1) haal koelblok uit de vriezer en plaats in de kast, er vormt zich rijp op het blok
- 2) laat het blok ontdooien totdat de rijp overgaat in water (circa 10 min.)
- 3) haal een koelelement uit vriezer en plaats dat in een piepschuimen doosje
- 4) veeg het water op het blok weg met tissue en plaats het blok op het koelelement in het piepschuimen doosje
- 5) plaats op het blok een geschikt transportrekje
- 6) voer werkzaamheden uit
- 7) haal transportrekje van het koelblok en zet het zolang op een Boehringer opslagdoosje
- 8) maak koelblok, koelelement, en piepschuimen doosje schoon
- 9) plaats koelblok en koelelement weer terug in de vriezer
- 10) doe labjas en handschoenen uit
- 11) neem de buisjes op het transportrekje mee naar de volgende ruimte (Boehringer opslagdoosje dus NIET meenemen, in de volgende ruimte staan weer Boehringer opslagdoosjes waar je het rekje op kunt zetten)
- 12) plaatst het transportrekje met buisjes op het volgende koelblok, zet de buisjes over in een PCR apparaat, of berg de buisjes op een geschikte locatie op.
- 13) breng het transportrekje naar V402 en doe het daar in de chloorbak.

Naast de bovengenoemde koelblokken zijn er ook koelblokken voor grotere buizen. Deze koelblokken uit de vriezer halen. Laten ontdooien tot de rijp overgaat in water. Dan kunnen vloeistoffen in het koelblok geplaatst worden.



6.2 Het aanleveren van monsters bij de sequence faciliteit

De trays waarin de monsters ingeleverd moeten worden zijn af te halen in ruimte S2.16. Na de deur staan ze rechts op het schap. Er mogen niet meer dan 3 trays per persoon mee genomen worden. Even afschrijven hoeveel trays er meegenomen zijn.

Gebruik losse 0,2 ml eppen zonder deksel. Gebruik geen strips. Gebruik van een **96 well PCR tray** is **alleen toegestaan als je een volle plaat hebt (96 monsters)**.

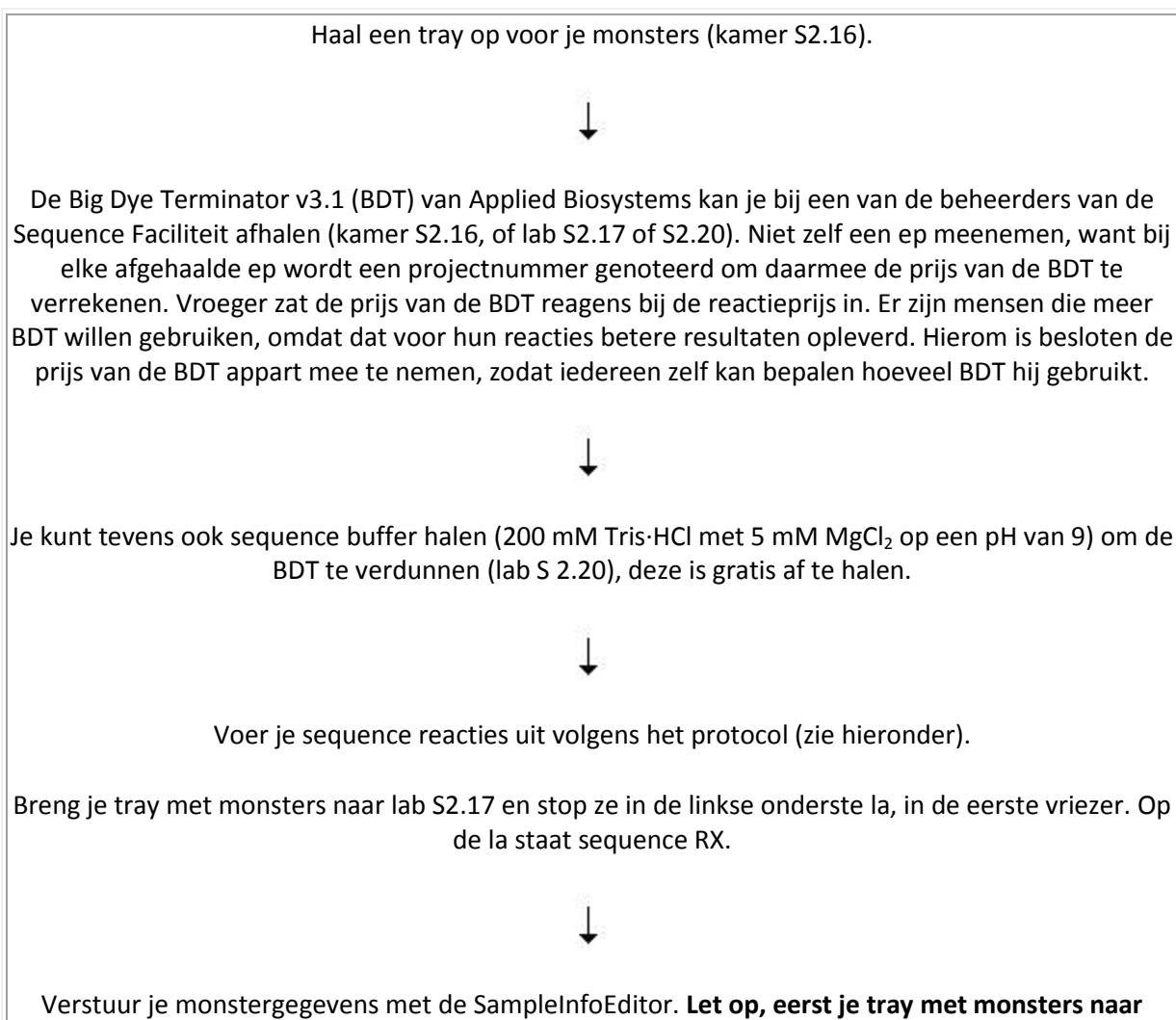
Elke tray heeft een unieke naam + nummer (SQ001 t/m SQ030). **Let op, alleen de trays van de sequence faciliteit mogen gebruikt worden.** Gebruik geen eigen tray met eigen nummering, behalve dan als je een volle 96 well PCR tray aanlevert.

Positioneer je monsters zoals op de sample sheet staat aangegeven. (de sample sheet kan voor eigen gebruik geprint worden). Let op de positionering van de eppen in je tray, sla geen posities over, en let op de juiste richting; A1, B1, C1, en niet A1, A2, A3

Dek je eppen goed af met een plastic plaatafdekker met klevende achterkant, of iets gelijkwaardigs, om verdamping van je monsters te voorkomen.

Let erop dat er geen luchtballen onder in de eppen zitten voordat ze het PCR apparaat ingaan. Dit verstoort de reactie.

Werk schema





S2.17 brengen en daarna pas de monstergegevens versturen. Als de monstergegevens verstuurd zijn, gaan we ervan uit dat de monsters gebracht zijn en kan het voorkomen dat ze al geselecteerd zijn voor een run.



Na analyse van de monsters, komt de sequence data op de "KADMOS" server te staan. Kopieer je data met behulp van de SampleInfoEditor van de server naar de harde schijf van je computer voor verdere verwerking.



Na twee maanden worden de files van de server gehaald, maar de data blijft wel beschikbaar in de vorm van een back up. Heb je files nodig die ouder zijn dan twee maanden, neem dan contact op met de Sequence Faciliteit om de data terug te halen.