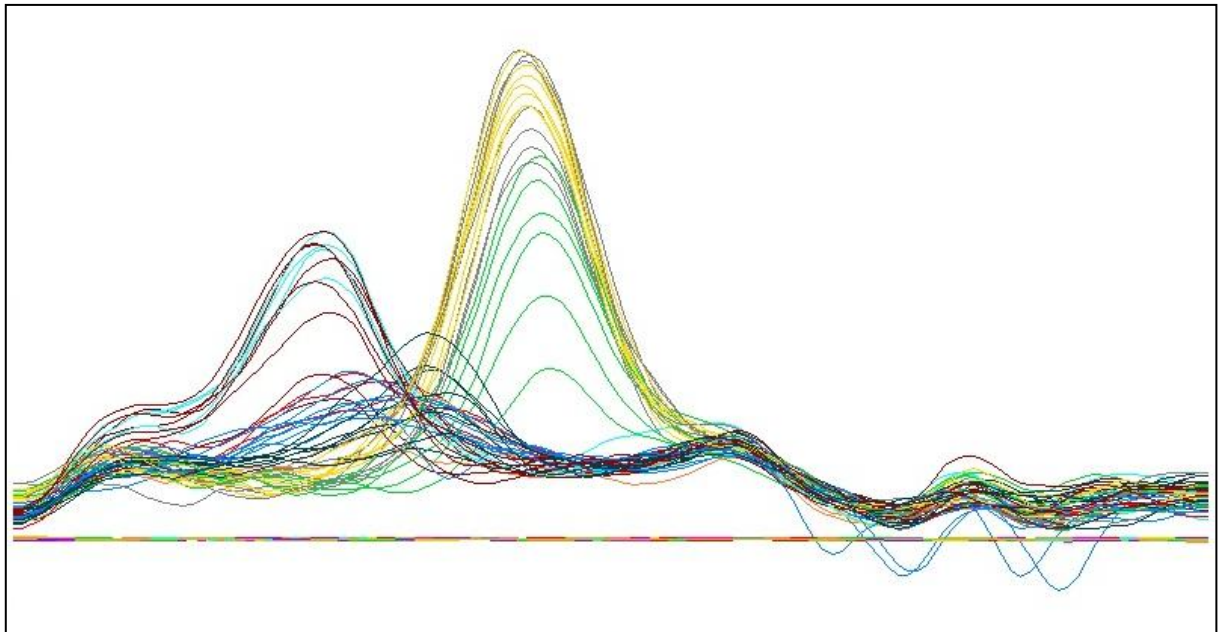




AANPASSING, IMPLEMENTATIE EN VALIDATIE VAN DERMATOFYTEN PCR VOOR DE LIGHTCYCLER 480

Adaptation, validation and implementation of
dermatophytes PCR for the LightCycler 480



Student: Eline Koole

Datum: 14-05-2014

Afstudeerplek:
Stichting Medische
Microbiologie

AANPASSING, VALIDATIE EN IMPLEMENTATIE VAN DERMATOFYTEN PCR

Naam student	Eline Koole
Afstudeerplaats	Stichting Medische Microbiologie Roosendaal-Bergen op Zoom
Stagebegeleiders Stichting Medische Microbiologie	Dr. A.M.C Bergmans (Medisch Moleculair Microbioloog) M. van der Ent (Senior Analist)
AO begeleider Hogeschool Utrecht	H. Nottet
Opleiding	Biologie en Medisch Laboratoriumonderzoek
Stageperiode	11-11-2013 tot 12-06-2014

VOORWOORD

(10-05-2014) De afgelopen 7 maanden heb ik stage gelopen op de moleculair biologische afdeling van de Stichting Medische Microbiologie Roosendaal – Bergen op Zoom. Deze periode heb ik als zeer prettig maar vooral als zeer leerzaam ervaren. Mijn kennis wat betreft de moleculaire biologie was voor dat ik met deze stage begon beperkt tot de basis. Maar tijdens mijn stage is, door de goede begeleiding, mijn kennis op dit gebied sterk toe genomen.

Mijn opdracht, het aanpassen, implementeren en valideren van de dermatofyten PCR, zette mij onder andere aan tot: zelfstandig werken, het tonen van eigen initiatieven, het bedenken van experimenten en het oplossen van problemen binnen de PCR. Deze opdracht heeft er voor gezorgd dat ik het principe van de moleculaire biologie ben gaan begrijpen maar bovenal ben gaan waarderen.

Graag wil ik Martijn v.d. Ent bedanken voor de goede praktijkbegeleiding, het geven van adviezen voor vervolgexperimenten en het ondersteunen van mijn leerproces met betrekking tot moleculaire biologie.

Mijn grote dank gaat uit naar Dr. Anneke Bergmans. Voor het delen van haar kennis, de begeleiding bij het bedenken van de experimenten en het interpreteren van de uitslagen, het oplossen van problemen, voor de tijd die er voor me is genomen en voor de begeleiding bij het schrijven van dit verslag.

Ook wil mijn andere collega's binnen de Stichting Medische Microbiologie bedanken voor de prettige samenwerking.

SAMENVATTING

Het doel van dit afstudeeronderzoek was het optimaliseren, valideren en implementeren van de dermatofyten Polymerase Chain Reaction (PCR) voor het real-time PCR apparaat LightCycler 480. De dermatofyten PCR is in staat 11 dermatofyten-species uit de genera *Microsporum*, *Trichophyton* en *Epidermophyton*, binnen een paar uur, rechtstreeks uit klinisch materiaal zoals haren, nagels en huidschilfers, te detecteren en te determineren. De detectie vindt plaats door middel van de amplificatiecurve en de determinatie gebeurt aan de hand van een smeltcurve-analyse.

Het overzetten van de PCR van de LightCycler 2.0 naar de LightCycler 480 was nodig omdat de huidige dermatofyten PCR op de LightCycler 2.0:

- Onvoldoende capaciteit heeft (32 monsters/run)
- Gebruikt maakt van dure reagentia (Multiplex Master Hyb.)
- Werkt met glazen capillairen die erg breekbaar en duur zijn

De PCR op de LightCycler 480 maakte daarentegen gebruik van een plastic 96 Wells plaat. Dit was naast een verdrievoudigde capaciteit ook een stuk makkelijker en goedkoper om mee te werken. Als mastermix werd er LightCycler Genotyping Mastermix (1x) gebruikt welke een stuk goedkoper was dan de master mix voor de LightCycler 2.0.

De aanpassingen die voor het overzetten van de dermatofyten PCR van de LightCycler 2.0 naar de LightCycler 480 nodig waren, zijn;

- De interne controle en *Epidermophyton floccosum* moesten worden overgezet naar een ander detectiekanaal. Daarvoor hebben de probes van beide targets een ander fluorescentielabel gekregen. De probe voor de interne controle is met een 610 label gelabeld en *Epidermophyton floccosum* met een 660 label. Ook is de probe van de interne controle langer gemaakt om de Tm curve ten opzichte van *Microsporum canis* te verhogen.
- In de LightCycler 480 kwamen de Tm curven van de species *Trichophyton rubrum* en *Trichophyton violaceum* te dicht op elkaar te liggen, waardoor deze niet goed van elkaar te onderscheiden waren. Om dit te verhelpen is de acceptor probe voor *Trichophyton rubrum* en *violaceum*, met zes basen verlengd, zodat er twee basen verschilde met de probe in plaats van één waardoor de Tm curven van deze species beter van elkaar te onderscheiden waren.

Ter optimalisatie van de PCR werd de concentratie van de reverse primer van de dermatofyten verhoogd van 1000 nM naar 1500 nM, de probeconcentratie van de interne controle verlaagd van 100 naar 50 nM, is de concentratie per dermatofyten probe geoptimaliseerd en is het runprotocol van de PCR aangepast (hogere denaturatietemperatuur bij zowel amplificatie als smeltcurve analyse).

Ter validatie is de smelttemperatuur-range per dermatofyt bepaald. Deze range wordt gebruikt bij het interpreteren van de smeltcurven, om het species van de gedetecteerde dermatofyt te bepalen.

De meest gebruikte methoden voor dit onderzoek zijn:

- Handmatige DNA opwerking uit gekweekte schimmelstammen met de QIA-Amp DNA mini-KIT van QIAGEN
- Real-time Polymerase Chain Reaction (PCR), inclusief smeltcurve-analyse met behulp van hybridisatie probes
- Het opwerken van DNA uit direct klinisch materiaal zoals haren, nagels en huidschilfers, met behulp van de MagNA Pure LC.

Naaste het onderzoek aan de dermatofyten PCR zijn ook real-time PCR's voor Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) en *Yersinia enterocolitica* geïmplementeerd. De resultaten hiervan staan beschreven in bijlage 5 en 6.

ABSTRACT

The aim of this research project was to optimize, validate and implement the dermatophytes Polymerase Chain Reaction (PCR). This PCR is able to detect and determinate 11 dermatophyte species within the three dermatophyte genera *Trichophyton*, *Microsporum* and *Epidermophyton* from clinical samples such as hair, nails and skin scales, within a few hours. The detection occurs with the amplification curves and the determination is done by means of melting curve analyses.

The transfer from the LightCycler 2.0 to the LightCycler 480 was necessary because the current dermatophytes PCR on the LightCycler 2.0:

- Has insufficient capacity (32 samples/run)
- Uses expensive reagents (Multiplex Master Hyb 5x.)
- Works with glass capillaries which are very fragile and expensive.

The dermatofyte PCR for the LightCycler 480 uses a plastic 96 wells plate. This is, besides a tripling capacity also easier and cheaper to work with. The master mix used by the LightCycler 480 is the LightCycler Genotyping Mastermix (1), which is cheaper than the master mix for the LighCycler 2.0.

The adjustments that were necessary for the transfer of the dermatophyte PCR from the LightCycler 2.0 to the LightCycler 480 are:

- The internal control and *Epidermophyton floccosum* had to be replaced to another detection channel. Therefore both targets were labelled with another fluorescence label. The internal control was labelled with a 610 fluorescence label and *Epidermophyton floccosum* with a 660 label;
- It was not possible to determine the melting curves of the PCR with the LightCycler 480 in addition to the species *Trichophyton rubrum* and *Trichophyton violaceum*, because they came to lay too close to each other. In order to solve this problem, the acceptor probe for both species with the fluorescence label, was extended with six bases. This resulted in a two bases difference between the two species instead of one, and thus in a larger T_m difference between them

In order to optimize the PCR, the concentration of the reverse primer for the dermatofytes was increased from 1000 to 1500 nM, the probe concentration of the internal control was reduced from 100 to 50 nM, the concentration for each dermatofyte specified probe is optimized and the run protocol for the PCR was modified (increased denaturing temperature during amplification and melting temperature analysis).

As a validation test, the melting temperature ranges have been determined for each dermatofyte. Those ranges will be used to identify the amplified dermatophyte species by means of their melting curves.

The methods used for this project are:

- Manual DNA isolation from cultured fungal strains by using the QIA-Amp DNA mini-KIT from QIAGEN
- Real time- Polymerase Chain Reaction (PCR)
- DNA isolation from clinical samples (nail, hair and skin scales) by using the MagNA Pure LC

Besides the research to the dermatophytes PCR also two Real-time PCR's for Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and *Yersinia enterocolitica* were implemented. The results are described in annex 5 and 6.

AFKORTINGENLIJST

Ail:	Attachment and Invasion Locus
BSA:	Bovine Serum Albumin
CFU:	Colony- Forming Unit
DNA:	Deoxyribonucleic acid
ds:	Dubbel strengs
es:	Enkel strengs
LC:	LightCycler
LOD:	Limit of Detection
MMB:	Stichting Medische Microbiologie Roosendaal- Bergen op Zoom
IC:	Interne Controle
ITS1:	Internal Transcribed Spacers
PCR:	Polymerase Chain Reaction
PDV:	Phocine Distemper Virus
PhHV:	Phocine Herpes Virus
PPM:	Primer Probe Mix
QCMD:	Quality Control for Molecular Diagnostics
STEC:	Shiga- toxin producing <i>Escherichia coli</i>
Tm:	melting Temperature
TE:	Tris-EDTA
YstB:	<i>Yersinia</i> stable toxin B

INHOUDSOPGAVE

1. Inleiding	1
2. Theoretische achtergrond	2
2.1 Dermatofyten	2
2.2 Polymerase chain reaction	5
2.3 Dermatofyten PCR.....	7
2.3.1 Probes	9
2.3.2 Kanalen	10
2.3.3 Aanpassingen voor LC 480.....	11
3. Materiaal en Methode	12
3.1. DNA opwerking Dermatofyten	12
3.2 De PCR.....	12
3.3 Optimalisatie Dermatofyten primers en probes.....	13
3.4 Optimalisatie interne controle	14
3.5 Optimalisatie kanaal 640/660	16
3.6 Validatie	17
4. Resultaten	18
4.1 Optimalisatie dermatofyten primers en probes	18
4.2 Optimalisatie interne controle	21
4.3 Optimalisatie 640/660 kanaal	25
4.4 Validatie.....	28
5. Discussie/Conclusie.....	31
5.1 Optimalisatie.....	31
5.2 Validatie.....	33
5.3 Advies vervolgonderzoek.....	33
Literatuurlijst	I

Bijlagen

Bijlage 1 Voorschrift MPLC

Bijlage 2 Voorschrift DNA-isolatie van gekweekte schimmelstammen

Bijlage 3 Pipetteerschema dermatofyten PPM

Bijlage 4 IC-combi en SBPP

Bijlage 5 STEC PCR

Bijlage 6 *Yersinia enterocolitica* PCR

Bijlag 7 Feces opwerking m.b.v. MPLC

1. INLEIDING

Het zeven maanden durende afstudeeronderzoek is opgedeeld in twee onderdelen. De eerste drie maanden is er gewerkt aan het valideren en implementeren van de STEC en *Yersinia enterocolitica* PCR's in de routine diagnostiek van de PCR afdeling binnen de Stichting Medische Microbiologie. De redenen voor de implementatie van deze PCR's waren ten eerste omdat deze testen altijd naar een ander laboratorium opgestuurd werden om daar te worden uitgevoerd. Dit kost meer tijd en geld dan wanneer de test intern uitgevoerd wordt. Ten tweede omdat de moleculaire feces diagnostiek van het Admiraal de Ruyter Ziekenhuis in Goes met ingang van 9-1-'14 naar Roosendaal kwam. In Goes werden de STEC en *Yersinia* PCR al gedaan.

Nadat de STEC en *Yersinia* PCR waren gevalideerd en geïmplementeerd is er begonnen aan de Dermatofyten (huidschimmel) PCR. Deze moest overgezet worden van de LightCycler 2.0 naar de LightCycler 480 (beide real-time PCR apparaten van Roche). Dit was nodig omdat;

- De LightCycler 2.0 maar een capaciteit heeft van 32 monsters. Omdat de Dermatofyten PCR maar twee keer per week wordt gedraaid is dit vaak te weinig. De LightCycler 480 werkt met een 96 Wells plaat waardoor de capaciteit drie keer zo hoog wordt.
- De LightCycler 2.0 werkt met glazen capillairen. Deze capillairen zijn erg breekbaar waardoor het lastig is om er mee te werken. Ook kunnen ze minder makkelijk gepipetteerd worden door de Qiagility (pipetteerrobot). Daarnaast zijn de glazen capillairen vergeleken met de plastic 96 Wells plaat een stuk duurder.
- De LC 2.0 PCR mix is veel duurder dan de LC 480 PCR mix.

Omdat de Dermatofyten PCR de hoofdopdracht was van het afstudeeronderzoek zal dit verslag daaraan gewijd worden. De verslagen van de implementatie en validatie van de STEC en *Yersinia* PCR zijn te vinden in bijlage 5 en 6.

De opbouw van het verslag is als volgt. In hoofdstuk 2 zal de theoretische achtergrond worden behandeld waarna in hoofdstuk 3 t/m 5 respectievelijk de materiaal en methode, resultaten, conclusie en discussie zullen worden beschreven.

Het doel van het onderzoek is het aanpassen, optimaliseren, valideren en implementeren van de dermatofyten PCR voor de LightCycler 480 waardoor de diagnostiek van pathogene dermatofyten binnen de Stichting Medische Microbiologie kan worden verbeterd en versneld.



2. THEORETISCHE ACHTERGROND

2.1 DERMATOFYTEN

De term **Dermatofyt** staat voor een groep schimmels die infecties van de nagels, huid en haren veroorzaakt. De drie genera welke vallen onder dermatofyten zijn; *Trichophyton*, *Microsporum* en *Epidermophyton*. De schimmels uit deze genera gebruiken keratine uit de nagels, huid en het haar als voedingsstof gedurende de infectie ervan. Een andere naam voor dermatofyt is dan ook keratinofiel schimmel.(1)

Alle schimmel species binnen de dermatofyten zijn onderverdeeld in zoöfiele, geofiele en antropofiele schimmels, afhankelijk van waar ze oorspronkelijk het meest voorkomen (dieren, aarde of de mens). Zoöfiele schimmels veroorzaken 30% van de schimmelinfecties bij de mens. Dit zijn meestal acute infecties. 70% van de dermatomycosen bij de mens wordt veroorzaakt door de antropofiele schimmels. Infecties met antropofiele schimmels uiten zich het meest chronisch of langzaam progressief.

De transmissie van dermatofyten verloopt via direct contact met geïnfecteerde mensen of dieren, of via besmet materiaal zoals kleding of meubilair. Er is een verhoogde kans op infectie wanneer de huid al is beschadigd.

De symptomen van de infectie zijn afhankelijk van welke schimmel de infectie veroorzaakt en de conditie van de patiënt zelf. Zo dringen infecties bij immuungecompromitteerde patiënten dieper door in de subcutane weefsels dan bij patiënten met een gezond immuun systeem.

Ziektebeeld(1)

Dermatofyten kunnen drie verschillende ziektebeelden veroorzaken. Namelijk ringworm, favus en onychomycose. Deze ziektebeelden zullen nu één voor één worden besproken.

Ringworm

Dit zijn circulaire laesies van de huid met een verhoogde, schilferige rode omlijning. De laesies kunnen ontstaan door directe activiteit van de schimmel, maar kunnen ook veroorzaakt worden door een overgevoeligheidsreactie van de patiënt op de schimmel of de metabole producten ervan. De huid rondom de laesies jeukt en is rood.

De schimmel beperkt zich bij dit ziektebeeld tot de oppervlakte van de huid.

De keratine uit de huid wordt door de schimmel als voedingsstof gebruikt. Hierdoor worden metaboliëten geproduceerd die de infectie veroorzaken. Door de infectie wordt de hoornlaag van de huid zichtbaar en schilferig. De geïnfecteerde gebieden worden geleidelijk groter. Het helingsproces van de huid begint vanuit het midden van de laesie.



Afbeelding 1: Ringworm infectie

De classificatie van een ringworm infectie is afhankelijk van de plaats van infectie(2)

- **Tinea pedis:** dit is een ringworm infectie aan de voetzool of de ruimte tussen de tenen. De weke, vochtige huid tussen de tenen is geïnfecteerd, de hoornlaag van de huid is beschadigd en er kunnen pijnlijke kloven ontstaan. Deze infectie wordt meestal veroorzaakt door *Trichophyton rubrum* of *Epidermophyton floccosum*.
- **Tinea manuum:** hierbij bevinden zich kleine laesies tussen de vingers welke later de gehele hand kunnen infecteren. De schimmel infecteert de opperhuid en veroorzaakt huiduitslag wat zichtbaar is als rimpels in de handpalm. Daarnaast wordt de huid schilferig. *Trichophyton rubrum* is de voornaamste verwekker van deze infectie.
- **Tinea corporis:** deze ringworm infectie uit zich in laesies op de onbehaarde gedeelten van het lichaam, zoals het gezicht, de armen en de buik. Het zijn voornamelijk kinderen die deze infecties oplopen. De overdracht van tinea corporis is meestal van dier op mens. De verwekkers van deze infectie zijn: *Microsporum canis*, *Trichophyton interdigitale*, *Trichophyton verrucosum*, *Trichophyton tonsurans* en *Trichophyton violaceum*.
- **Tinea imbricata:** dit is een speciale vorm van tinea corporis. Deze vorm komt veel voor in Polynesië en is te herkennen aan regelmatige ringen op de huid. De verwekker is *Trichophyton concentricum*.
- **Tinea cruris:** dit zijn jeukende laesies op de harige huid rond de genitaliën. Hierbij komt af en toe een secundaire bacteriële infectie voor. Verwekkers van deze ringworm infectie zijn: *Epidermophyton floccosum*, *Trichophyton interdigitale* en *Trichophyton rubrum*.
- **Tinea barbae:** bij deze infectie zitten de laesies in de behaarde gedeelten van het gezicht, veroorzaakt door *Trichophyton rubrum* en *Trichophyton verrucosum*.
- **Tinea capitis:** deze infectie vindt plaats op de hoofdhuid of de wenkbrauwen. Hierbij wordt niet de huid zelf, maar de haren geïnfecteerd. Dit gebeurt endothrix (binnen in de haren) of ectothrix (op de haren). De metabole producten die vrij komen gedurende de infectie kunnen ontstekingsreacties veroorzaken. Dit gebeurt op een behaarde huid aanzienlijk vaker dan op een haarloze huid.
Een andere infectie welke vaak wordt gezien bij tinea capitis is folliculitis. Hierbij raakt het haarzakje ontstoken. Folliculitis wordt vooral gezien bij een infectie met *Trichophyton verrucosum* of *Microsporum canis*. Ander verwekkers van deze ringworm infectie zijn; *Trichophyton interdigitale*, *Trichophyton tonsurans*, *Trichophyton schoenleinii*, *Trichophyton violaceum*, *Microsporum audouinii* en *Microsporum ferrugineum*.

Favus

Bij deze schimmelinfectie veroorzaakt door o.a. *Trichophyton schoenleinii* veroorzaken de hyfen van de schimmel kale plekken op de hoofdhuid. Dit gebeurt door de afbraak van het haarzakje. Hierdoor worden de haren definitief verloren en ontstaat er een blijvende kale plek op het hoofd. De aangetaste huid is korstig en bevat littekens.



Afbeelding 2: Favus infectie.



Onychomycosis

Dit is een chronische schimmelinfectie van de nagel en het nagelbed. Meestal worden de teennagels geïnfecteerd.

De infectie begint aan de rand van de nagel en trekt daarna naar het midden waardoor de nagel wordt verheven van het nagelbed.



Afbeelding 3: Onychomycose in verschillende stadia

Door hyperkeratose (sterke afbraak van keratine in de nagel) van de schimmel raakt de nagel uiteindelijk helemaal los van het nagelbed.

Het laatste stuk van de nagel breekt meestal af of verkrumelt. De nagels naast de geïnfecteerde nagel worden over het algemeen niet geïnfecteerd.

De meest voorkomende verwekkers van deze infectie zijn *Trichophyton rubrum* en *Trichophyton interdigitale*.

Determinatie

De determinatie van dermatofyten is erg ingewikkeld. Ondanks dat er verschillende dermatofyten PCR's zijn ontwikkeld berust de determinatie van dermatofyten meestal nog op macroscopische /microscopische determinatie en metabolische testen. Naast het feit dat dermatofyten qua kolonievorm en microscopie moeilijk van elkaar te onderscheiden zijn, is het een erg tijdrovende methode. Het in kweek brengen van een stam vanuit klinische materialen duurt gemiddeld 2 tot 4 weken. Daar komt nog bij dat de gevoeligheid van de kweek maar maximaal 70% is.

Bij de Stichting Medische Microbiologie wordt de determinatie van de dermatofyten gedaan aan de hand van kweek en PCR. De huidige PCR is aan de hand van het artikel "Evaluation of a single-tube real-time PCR for detection and identification of 11 dermatophyte species in clinical material" van Bergmans et. al.(3)

Behandeling

Bij voorkeur wordt een dermatofytose niet behandeld omdat de behandeling van dermatofyten meestal erg lang en duur is. Dit komt omdat er middelen uit de allylamine en azole klasse worden gebruikt, voornamelijk itraconazol en terbinafine. Itraconazol is een fungicide middel dat het plasmamembraan van de dermatofyt beschadigd. Door de beschadigingen verandert de membraanpermeabiliteit en kunnen er belangrijke celbestanddelen verloren gaan(4). Terbinafine is ook een fungicide middel wat de werking van het enzym squaleenepoxidase in het celmembraan van de dermatofyt remt. Dit enzym is nodig voor de biosynthese van sterol wat onder andere wordt gebruikt voor de opbouw van het celmembraan. Remming van squaleenepoxidase heeft als resultaat dat er een tekort ontstaat aan sterolen en dat squaleen, wat een onderdeel is van bijvoorbeeld cholesterol, intracellulair neer slaat. Dit leidt uiteindelijk tot celdood(5).

Afhankelijk van de status van het immuunsysteem van de patiënt kan er om het genezingsproces te versnellen een direct middel samen met een oraal middel worden voorgeschreven. Directe middelen zijn over het algemeen poeders of zalfjes.(1)

2.2 POLYMERASE CHAIN REACTION

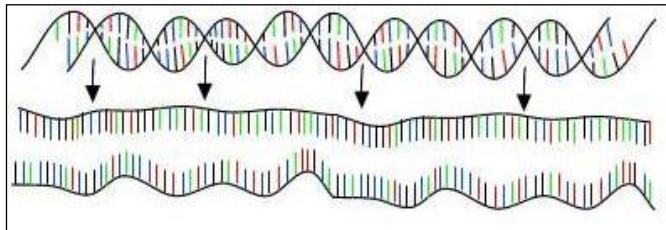
De Polymerase Chain Reaction (PCR) is een veelgebruikte techniek welke voor verschillende doeleinden kan worden gebruikt. Een aantal voorbeelden waarbij PCR een belangrijke rol speelt bij het aantonen en determineren van micro-organismen, het detecteren van pathogene mutaties in het DNA, het kloneren van DNA en gen-analyse.

De eerste PCR werd in 1985 uitgevoerd door Prof. Dr. Kary Mullis met als doel een specifiek stuk menselijk DNA te vermeerderen(6). Tegenwoordig zijn er al duizenden verschillende PCR's en er komen er wekelijks meer bij.

Het basis principe van de PCR is als volgt:

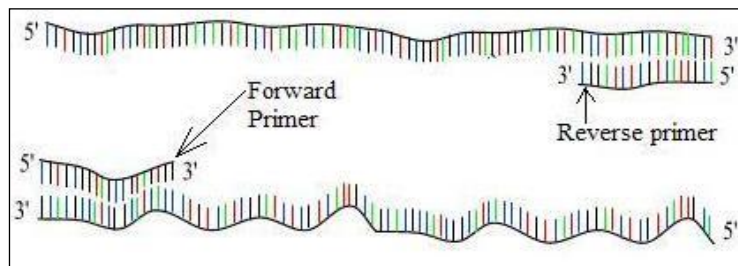
Er wordt altijd uitgegaan van een stuk template DNA ofwel target dat vermenigvuldigd moet worden. Om deze vermenigvuldiging plaats te laten vinden moet het template DNA drie stappen ondergaan. Deze drie stappen worden gedurende de gehele PCR reactie steeds herhaald.

1. **Denaturatie:** Deze stap gebeurt bij een temperatuur van 95 °C. Door het verhitten worden de waterstofbruggen tussen de twee DNA strengen verbroken. Hierdoor wordt het dubbel strengs (ds) template DNA uitgesmolten tot enkelstrengs (es) DNA(7).



AFBEELDING 1: Denaturatie van ds DNA in es DNA(8)

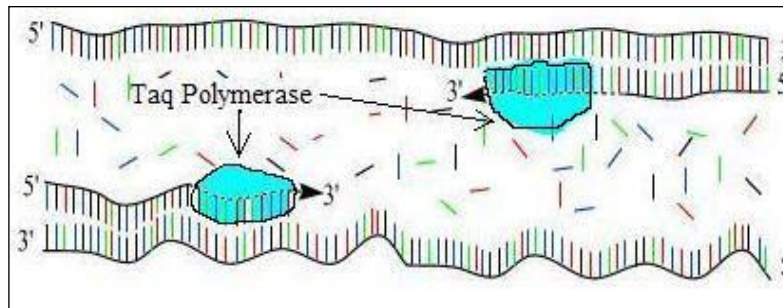
2. **Annealing:** De annealing vindt plaats bij 50-60°C, afhankelijk van de samenstelling van de primers. Bij deze stap hechten de primers aan het complementaire enkelstrengs template DNA. De primers zijn zo ontworpen dat ze hechten aan de uiteinden van het stuk DNA waarin men geïnteresseerd is. Hierdoor wordt uiteindelijk het DNA tussen de twee primers vermenigvuldigd(7).



AFBEELDING 2: Annealing van de primers aan het complementaire es DNA(8)



3. **Elongatie:** De elongatiefase gebeurt bij een temperatuur van 72°C. Dit is namelijk de optimale temperatuur voor de werking van het polymerase. Tijdens deze stap wordt het DNA daadwerkelijk verdubbeld. Het hittestabiele enzym Taq DNA polymerase bindt aan de primers en verlengt deze met losse nucleotiden die zich in de PCR mix bevinden. Dit proces gaat door tot de nieuwe cyclus weer begint bij de denaturatie (95°C)(7)



AFBEELDING 3: Elongatie van het Es DNA door het enzym Taq DNA polymerase(8)

Deze drie stappen worden gedurende 40-45 cycli herhaald waardoor er een exponentiële vermenigvuldiging plaats vindt van de kopieën van het stuk DNA tussen de twee primers(7).

Tijdens een real-time PCR, zoals die gebruikt wordt in dit onderzoek, wordt het aantal kopieën gedurende de gehele reactie gemeten door middel van fluorescentie. De hoogte van de fluorescentie is een maat voor het aantal kopieën dat er gevormd is. Het meten van de fluorescentie kan op drie verschillende manieren:

1. Sybr Green. Dit is een fluorescerende stof die bindt aan al het dubbelstrengs DNA in de PCR. Dit is de goedkoopste maar minst specifieke manier om PCR product te detecteren. Het is aspecifiek omdat het namelijk aan al het dubbelstrengs DNA bindt, dus ook aan primer dimeren. Hierdoor kan er een vals positief resultaat worden gegeven.

2. Hydrolyse probes. Hydrolyse- of TaqMan probes zijn korte DNA sequenties die aan de 3' en 5' kant zijn gelabeld en vlak naast de primers op het DNA hechten. Aan de 5' kant hangt een Reporter die een bepaalde golflengte uitzendt en aan de 3' kant hangt een Quencher die, wanneer de probe intact is, de fluorescentie van de reporter uitdooft. Echter wanneer het Taq polymerase aan de primers bindt en begint met de elongatie, breekt deze tegelijkertijd de probe af. Dit gebeurt in de richting van 5' naar 3'. Hierdoor komt de reporter los in de oplossing en kan het signaal dus niet meer worden uitgedoofd door de quencher. Het signaal van de reporter kan zo gemeten worden door de camera van het desbetreffende PCR apparaat. In dit geval de LightCycler 480.

3. Hybridisatie probes. Het principe van deze probes wordt uitgebreid behandeld in paragraaf 2.3.1. waar de gehele dermatofyten PCR wordt uitgelegd.

Het gemeten signaal wordt door het real-time apparaat weergegeven in een amplificatiecurve. Deze curve stijgt evenredig met het aantal kopieën dat na een bepaald aantal cycli aanwezig is in de reactie. Wanneer producten die nodig zijn voor het vermenigvuldigen van het target DNA, zoals primers, probes of nucleotiden, op zijn gebruikt, zal de curve afplatten tot deze uiteindelijk in een plateaufase zal komen.

Bij het aflezen van een PCR wordt er vooral gelet op de vorm van de amplificatiecurven en op de Ct-waarde ervan. De Ct-waarde staat voor cycle threshold en deze geeft aan bij hoeveel cycli de curve de gestelde threshold overschrijdt. Wanneer de curve boven de threshold komt, betekent dit dat het target DNA vermenigvuldigd is en het monster dus positief is voor het desbetreffende target. De Ct-waarde geeft aan hoe sterk positief het monster is. Een lage Ct-waarde betekent dat er aan het begin van de PCR al veel target DNA aanwezig is en het fluorescentie signaal dus al na een klein aantal cycli de threshold overschrijdt, dus dat het monster sterk positief is. Een hoge Ct-waarde betekent dat er weinig target DNA in het monster aanwezig was. Het monster is dan dus zwak positief.

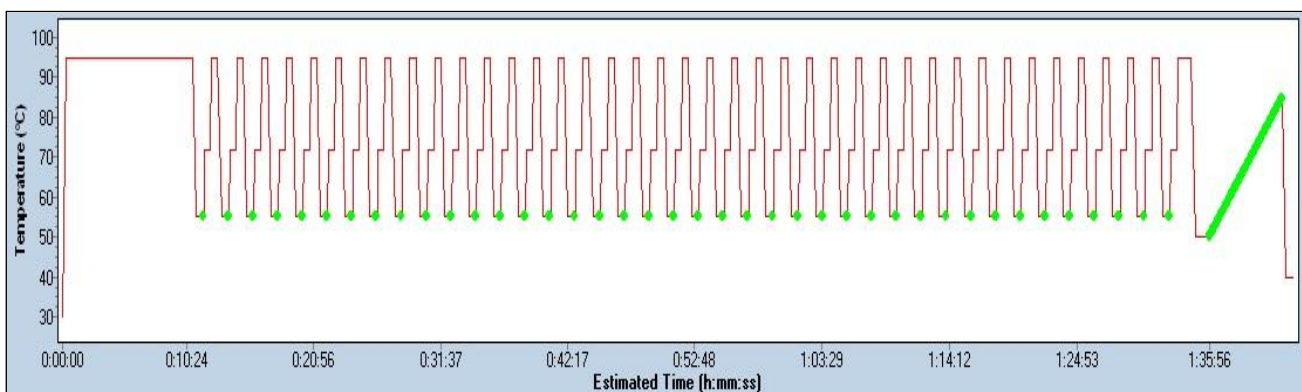
2.3 DERMATOFYTEN PCR

De dermatofyten PCR kan de volgende 11 dermatofyten aantonen:

- *Trichophyton rubrum*
- *Trichophyton violaceum*
- *Trichophyton verrucosum*
- *Trichophyton interdigitale*
- *Trichophyton tonsurans*
- *Trichophyton erinacei*
- *Trichophyton erinacei/concentricum*
- *Trichophyton mentagrophytes*
- *Microsporum canis*
- *Microsporum audouinii*
- *Epidermophyton floccosum*

Het principe van de dermatofyten PCR verschilt van dat van de meeste real-time PCR's. De dermatofyten PCR gebruikt namelijk andere soort probes dan Taqman probes en bij het aflezen van de PCR wordt er niet alleen gekeken naar de amplificatie curve maar wordt er ook een smeltcurve analyse gedaan. Het basisprincipe is echter wel hetzelfde. Deze PCR bestaat namelijk ook uit 40-45 cycli met elk een denaturatie, annealing en elongatie fase.

Het runprotocol voor de dermatofyten ziet er als volgt uit:



AFBEELDING 4: Runprotocol Dermatoftyten PCR. Het runprotocol van de dermatofyten PCR bestaat uit drie fasen. de denaturatie fase, de amplificatie fase en de smeltfase. Tijdens de denaturatie wordt polymerase geactiveerd en het oorspronkelijke DNA uitgesmolten tot enkelstrengs DNA waarna tijdens de amplificatiefase het DNA vermenigvuldigd kan worden. Tijdens de smeltfase wordt het template DNA, met de daarop gehechte probes, langzaam uitsmolten. (deze

In de eerste tien minuten vindt activatie van het polymerase en denaturatie van het DNA plaats. Tijdens deze stap waarbij er wordt verhit tot 95°C, wordt het oorspronkelijke ds DNA uitgesmolten tot es DNA. Daarna begint de amplificatie fase van de PCR.



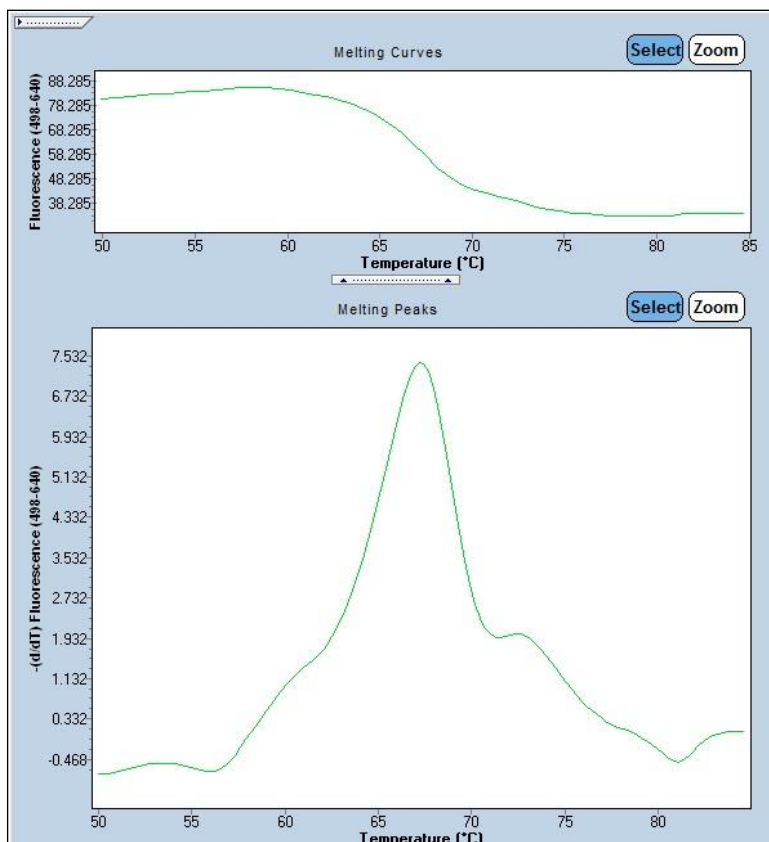
Tijdens deze fase wordt het oorspronkelijke DNA doormiddel van de annealing en elongatie 40 cycli lang vermeerderd. Aan het einde van de annealingfase van elke cyclus vindt er een meetmoment plaats waarbij de fluorescentie op dat moment wordt gemeten.

Na de laatste annealingfase in de 40^{ste} cyclus start de smeltfase. Tijdens deze fase wordt het hybride product (PCR product + probe) los gesmolten.

Dit gebeurt met een temperatuurstijging van 0.1°C/seconde tot uiteindelijk 80 °C. Tijdens de smeltfase vindt er constant meting plaats van de hoeveelheid fluorescentie.

Van deze meting wordt een smeltcurve gemaakt en van de smeltcurve wordt een T_m (smeltpunt) bepaling gedaan.

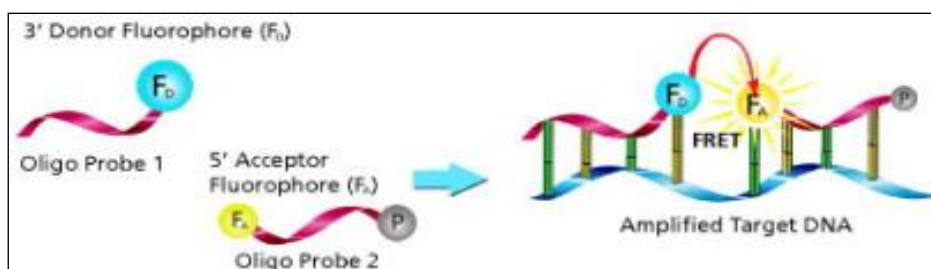
Voor de T_m-bepaling wordt de negatieve afgeleide van de smeltcurve genomen. Hierdoor ontstaat er een piek die aangeeft bij welke temperatuur de helft van de probes van het DNA is afgesmolten. Dus het moment waarop de helft van de beginfluorescentie gemeten wordt. Een voorbeeld van een smeltcurve en T_m-analyse is te zien in afbeelding 5.



AFBEELDING 5: Smeltcurve en T_m-analyse van dermatofyten PCR. De bovenste afbeelding is de smeltcurve van het hybride product (PCR product + probe) van de PCR. Deze curve laat de daling in fluorescentie zien, wat wordt veroorzaakt door het losraken van de probes van het DNA. Van deze curve wordt de negatieve afgeleide genomen om de onderste afbeelding te verkrijgen. De onderste afbeelding geeft de T_m waarde van het target weer. Dit is het punt waarop de helft van het DNA met probes is uitgesmolten. Dus het moment waarop de helft van de beginfluorescentie wordt gemeten. (Deze afbeelding komt van een eigen run met de LightCycler 480)

2.3.1 PROBES

De probes die voor de dermatofyten PCR gebruikt worden zijn hybridisatie probes. Dit zijn sets van twee probes die onafhankelijk van elkaar niet de juiste fluorescentie golflengte voor de camera van het PCR apparaat kunnen uitzenden. Het probesetje bestaat uit een probe met een **donor** fluorofoor, deze bevat een fluoresceïne label, en een probe met een **acceptor** fluorofoor, deze bevat een LC-610, LC-640 of LC-660 label. Deze twee probes hechten naast elkaar op het template DNA. Wanneer de probes naast elkaar op het DNA zitten, straalt het PCR apparaat licht uit van 480 nm, dat door de donor fluorofoor opgenomen kan worden. Deze straalt vervolgens fluorescentie van een hogere golflengte uit wat door de acceptor fluorofoor opgenomen kan worden, waardoor deze een fluorescentie van een golflengte uit gaat zenden die door het PCR apparaat gedetecteerd kan worden(9). Afbeelding 5 geeft het principe van hybridisatie probes weer(10).



AFBEELDING 5: Het principe van hybridisatie probes. Hybridisatie probes kunnen fluoresceren wanneer beiden op het template DNA zijn gehecht. Wanneer dit gebeurt straalt de donor fluorofoor de acceptor fluorofoor aan, waardoor deze gaat fluoresceren. Deze fluorescentie kan vervolgens door het PCR apparaat

In dermatofyten PCR worden vijf van dit soort probe sets gebruikt die elk meerdere (verschillende) dermatofyten kunnen aantonen. De probes zijn genoemd naar de dermatofyten die ze kunnen aantonen. De volgorde van de naam is bepaald aan de hand van de T_m van de betreffende dermatofyten. De dermatofyt met de hoogste T_m staat voorin de probe naam en de dermatofyt met de laagste T_m achteraan. Een zesde probeset detecteert de interne controle (PhHV: Phocine Herpes Virus). In tabel 1 staan de zes probe sets weergegeven met de dermatofyten species die ermee worden gedetecteerd. De FL probes hebben de donor fluoroforen en de LC probes hebben de acceptor fluoroforen.

TABEL 1: PROBESETS DERMATOFYTEN PCR MET BIJBEHORENDE DERMATOFYTEN SPECIES.

Probeset	Dermatofyten
Mcaau 1S (LC-610) Mcaau 1A (FL)	<i>Microsporum canis/audouinii</i>
Tveerco 1S (LC-640) Tveerco 1A(FL)	<i>Trichophyton verrucosum/erinacei</i> (1+2)/concentricum
Truvi Snw2 (LC-640) Truvi 1A(FL)	<i>Trichophyton rubrum/violaceum</i>
Tinmeto 1S (FL) Tinmeto 3A (LC-660)	<i>Trichophyton</i> <i>interdigitale/mentagrophytes/tonsurans</i>
Efloc 4S (LC-660) Efloc 1A (FL)	<i>Epidermophyton floccosum</i>
PhHV R1-610 PhHV P2 (FL)	Interne controle PhHV



2.3.2 KANALEN

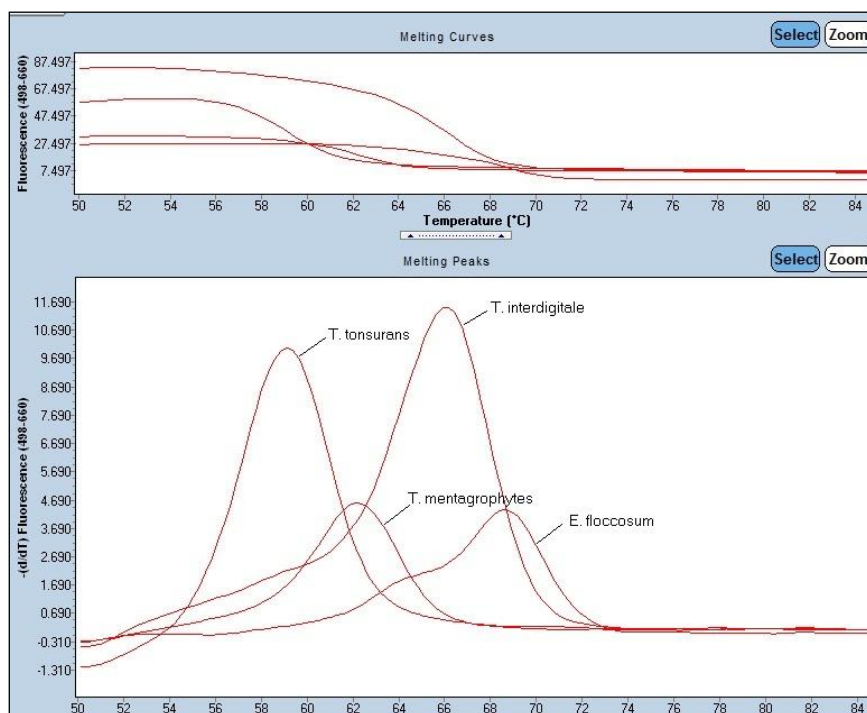
De LightCycler 480 heeft 6 verschillende kanalen waarin fluorescentie kan worden gemeten. Dit zijn de kanalen 488, 510, 580, 610, 640 en 660. Voor de dermatofyten PCR worden drie kanalen gebruikt. Dit zijn de kanalen 610, 640 en 660 omdat alleen in deze kanalen hybridisatie probes aangestraald kunnen worden. De vijf dermatofyten probes en de probes voor PhHV zijn verdeeld onder de drie kanalen, afhankelijk van het acceptor fluorescentie label van de probe. De verdeling is als volgt:

TABEL 2: VERDELING DERMATOFYTEN EN PHHV PROBES OVER KANALEN VAN DE LICHTCYCLER 480.

Kanaal	Probesets
610	Mcau en PhHV
640	Truvi en Tveerco
660	Tinmeto en Efloc

In het kanaal 640 kunnen uiteindelijk vijf dermatofyten species aangetoond worden. De determinatie ervan gebeurt vervolgens door middel van de T_m bepaling. De T_m waarde met de betreffende probe is namelijk voor elke dermatofyt verschillend.

Dit komt omdat de species per probe elk een verschillend aantal mismatches hebben met de probe. De dermatofyt met de minste mismatches (0) heeft de hoogste T_m waarde. Deze is namelijk het stevigst gebonden op de probe omdat deze de meeste waterstofbruggen heeft met de probe. De dermatofyt met de meeste mismatches heeft de laagste T_m . De T_m waarde wordt gebruikt om een dermatofyt te kunnen determineren. Hier wordt in paragraaf 3.6.1 "Bepaling T_m ranges" nog verder op in gegaan.



AFBEELDING 6: Kanaal 660 met de dermatofyten species van probes Tinmeto en Efloc. De dermatofyten zijn gedetermineerd op grond van hun T_m waarde.

2.3.3 AANPASSINGEN VOOR LC 480

Voor het overzetten van de dermatofyten PCR van de LightCycler 2.0 naar de LightCycler 480 moesten verschillende aanpassingen worden gedaan omdat:

- In de LightCycler 480 het 705 kanaal uit de LightCycler 2.0 verviel(3). Hierdoor moesten de twee targets uit dat kanaal (*Epidermophyton floccosum* en de interne controle) verplaatst worden naar een ander kanaal in de LC 480. *E. floccosum* werd bij de species van de Tinmeto probe in het 660 kanaal geplaatst. Hiervoor hoefde de LC probe van *E. floccosum* alleen een ander label te krijgen. Namelijk een 660 label in plaats van een 705 label. De Tm-range van de Efloc probe was namelijk al voldoende verwijderd van de Tm-ranges van de Tinmeto probe.
Voor de interne controle werd het 705 label vervangen voor een 610 label. De interne controle werd namelijk bij de species van de Mcaau probe in het kanaal 610 geplaatst. Het vervangen van het label was echter niet genoeg. De Tm-curve van de interne controle lag te dicht bij de Tm-curve van *M. canis*. Om deze reden moest de probe voor de interne controle wat worden verlengd om zo een hogere smelttemperatuur te realiseren.
- In de LightCycler 480 waren de species *T. rubrum* en *T. violaceum* op het gebied van de Tm-curve niet meer van elkaar te onderscheiden, terwijl dit in de LC 2.0 wel kon. Daarom moest de Truvi probe worden aangepast om de twee Tm-curven wat verder uit elkaar te krijgen.



3. MATERIAAL EN METHODE

3.1. DNA OPWERKING DERMATOFYEN

Dermatofyten kunnen op meerdere manieren worden opgewerkt ten behoeve van de DNA extractie, afhankelijk van het materiaal. Direct patiëntenmateriaal zoals nagels, haren of huidschilfers werden opgewerkt door middel van de extractierobot MagNA Pure LC (MPLC). Dit werd gedaan aan de hand van het protocol "DNA/RNA extractie van klinische materialen met behulp van MPLC" (bijlage 1). Het principe van deze opwerk methode was als volgt:

Een deel van het materiaal werd met behulp van een wegwerpsscalpel in kleine stukjes gesneden en toegevoegd aan 400 µl lysis buffer. Deze buffer bestond uit: MagNA Pure LC Lysis Binding Buffer (Roche), water (3:2), dithiothreitol (80 nM) en proteinase K (1 mg/ml). Dit werd vervolgens overnacht geïncubeerd bij 55°C. Aan de 400 µl lysis buffer met materiaal werd 50 µl SBPP toegevoegd. Dit bestaat uit STAR-Buffer, BSA, 1/5000 verdunde Phocine Herpes Virus I (PhHV-1) en 1/1000 verdunde Phocine Disptemper Virus (PDV) (bijlage 4). PhHV en PDV werden toegevoegd als interne controle voor de PCR. PhHV voor PCR's met DNA en PDV voor RNA PCR's

Voor het opwerken van dermatofyten DNA uit direct materiaal werd het Total NA High Sensitive protocol gekozen uit het menu van de MPLC (bijlage 1). Met dit protocol wordt 500 µl monster in de lysis buffer gebruikt en uiteindelijk 100 µl DNA in buffer geëluëerd. Hiervan gaat vervolgens 5 µl mee in de PCR.

De tweede opwerkmethode wordt gebruikt wanneer er DNA van een gekweekte schimmelstam moet worden opgewerkt. Voor deze methode werd de QIA-Amp DNA mini-KIT gebruikt (bijlage 2). Hierbij werd er een deel van de gegroeide schimmelstam gelyseerd en gewassen. De opbrengst is uiteindelijk 100 µl zuiver DNA waar vervolgens 5 µl van wordt genomen voor in de PCR. Als interne controle wordt er wordt er tijdens het proces van opwerken 10 µl IC combi toegevoegd. Dit bevat 1/5000 verdunde PhHV-1 en 1/1000 verdunde PDV (bijlage 4).

3.2 DERMATOFYTEN REAL-TIME PCR

De PCR reactie vond plaats in een eindvolume van 20 µl. Hiervoor wordt 5 µl opgewerkt dermatofyten DNA toegevoegd aan 15 µl PCR mix. Deze PCR mix bevat 4 µl van een 5x geconcentreerde LightCycler 480 Genotyping Master van Roche (eindconcentratie 1x). Hierin bevonden zich de losse nucleotiden (met dUTP i.p.v. dTTP), het enzym Taq DNA Polymerase, reactie buffer en 3 mM MgCl₂ (eindconcentratie). Aan de PCR mix wordt verder toegevoegd: dermatofyten hybridisatie-probes in respectievelijk 250 nM, 375 nM of 500 nM, 300 nM primer DERMF3, 1000 of 1500 nM primer DERM2, 400 nM primer PhHV-R1-610, 150 nM primer PhHV-F1 en 100, 75 of 50 nM probe PhHV-P2-FL. De primers en probes van de dermatofyten en interne controle worden uiteindelijk toegevoegd in één Primer Probe Mix (PPM). Het pipetteerschema hiervoor is te vinden in bijlage 3.

Ter optimalisatie van de PCR reactie wordt er nog 1mM MgCl₂ extra toegevoegd, wat fungeert als cofactor voor het DNA Polymerase, en DMSO (eindconcentratie 2.8 µg/µl), voor betere uitsmelting van G-C regio's, aan te PCR mix toegevoegd. Het volume tot 20 µl wordt opgevuld met H₂O.

Bij elke run worden een positieve en een negatieve controle meegenomen. De positieve PCR controle bevat DNA van PhHV-1(= interne controle) en van vier dermatofyten species, *T.verrucosum*, *T.interdigitale*, *M.canis* en *E.floccosum*, welke met de LC primers en de verschillende LC probes gedetecteerd kunnen worden in de Dermatofyten PCR. De negatieve PCR controle bestaat uit een pool van het geëluëerde DNA van negatieve nagelmonsters.

Het runprotocol dat werd gebruikt voor de LightCycler 480 is als volgt: activatie en denaturatie voor 10 min. bij 95 °C, 40 cycli van 20 sec. bij 95°C, 20 sec. bij 55°C en 20 sec. bij 72 °C. Dit wordt gevolgd door een smeltcurve analyse (1 min. bij 95°C, 1 min. koelen bij 50°C waarna er een temperatuur stijging plaats vindt met 0,1°C/sec naar een eindtemperatuur van 85°C.

3.3 OPTIMALISATIE DERMATOFYTEN PRIMERS EN PROBES

De huidige primers en probes voor de dermatofyten PCR in de LC 480 staan weergegeven in tabel 3.

TABEL 3: PRIMERS EN PROBES DERMATOFYTEN PCR.

Naam	Sequentie 5'-3'	Label
Primers		
DERM F3	GGT TGC CTC GGC GGG CC	-
DERM R2	CGG AAT TCT GCA ATT CAC ATT ACT	-
Probes		
Mcaau 1S	ACG CCT GAG GGG GAC TCT TG	5' LC610
Mcaau 1A	CTG TGC TAC AGC GGC CGT TCG GGG	3'-FL
Truvi Snw2	GCC GGA GGA CAG ACA CCA AGA AAA AAT TCT	5' LC640
Truvi 1A	CCT CGA GCC GGA CCG CGC C	3' -FL
Tveerco1S	GAG GAC AGA CAT CAA AAA ATC TTG AAG A	5' LC640
Tveerco1A	GGG CTT TAG CTG GAT CGC GCC	3' -FL
Tinmeto 3A	CCC GCC GGA GGA CAG ACG C	5' LC670
Tinmeto 1S	TAG TGG CTA AAC GCT GGA CCG	3' -FL
Efl 4S	CTA CGA AAT CTC CAT AGG TGG TTC AGT CT	5' LC670
Efl 1A	GCG CTC GCC GAA GGA GTG ATT CTC AGA AA	3' -FL
Interne Controle		
PhHV F1	GGG CGA ATC ACA GAT TGA ATC	-
PhHV R1-610	CGA GGC GGT TCC AAA CGT TAC	5' LC610
PhHV P2-FL	GTG TCC GCC ACC ATC TGG ATC AAC GT	3' -FL

Voor het optimaliseren van de dermatofyten primers en probes zijn verschillende experimenten gedaan. Bij elk experiment werd de standaard mix gebruikt zoals beschreven in paragraaf 3.1 met variabele primer en probes concentraties. Voor de primer optimalisatie zijn voor de reverse primer de concentraties 1000 nM en 1500 nM met elkaar vergeleken. Hiervoor zijn drie *Trichophyton violaceum* stammen van 1ng/μl gebruikt, omdat *T.violaceum* de laagste amplificatie curve had bij de standaard concentratie van 1000 nM reverse primer. Deze stam zou dan ook als eerst verbetering moeten laten zien. Bij de optimalisatie van de probes zijn de volgende drie concentraties vergeleken: respectievelijk 250, 375 of 500 nM per probe in de reactie. In de eerste test zijn 500 nM en 250 nM met elkaar vergeleken en daarop volgend 500 nM en 375 nM.



Deze test werd gedaan met het DNA van de species *T. rubrum*, *M.canis*, *E. floccosum*, *T. interdigitale* en *T. verrucosum*. Deze species vertegenwoordigen samen de vijf dermatofyten probe sets.

Nadat de optimale probe concentratie was bepaald is de species specifieke probe TruviS is aangepast. Deze probe is specifiek voor *Trichophyton rubrum* en *Trichophyton violaceum*. In tabel 4 is te zien wat de sequentie was van de probe die met de LC 2.0 werd gebruikt en de aanpassingen die gedaan moesten worden om de TruviS probe te kunnen gebruiken voor de LC 480. De Tm's van *T.rubrum* en *T.violaceum* lagen in de LC 480 namelijk te dicht op elkaar waardoor ze niet van elkaar te onderscheiden waren. Dit kwam omdat *T. violaceum* tegenover

T. rubrum slechts één mismatch verschil had met de toen in gebruik zijnde probe. Om een groter verschil in Tm tussen *Trichophyton rubrum* en *Trichophyton violaceum* te realiseren is de probe met de acceptor fluorofoor (TruviS) aan de 3' kant met zes basen verlengd zodat er een extra mismatch ontstond met *T.violaceum* (TruviSnw2). Hierdoor is ook de Tm van beide species verhoogd zodat deze niet te dicht bij de Tm pieken van de species van de Tverco probe kwamen te liggen.

TABEL 4: AANPASSING TRUVIS PROBE.

TruviS	TruviSnw	TruviSnw2
5'- LC640 -GCC GGA GGA CAG ACA CCA AGA AAA-- PH	5- 640 - - GC CGG AGG ACA GAC ACC AAG AAA AAA TTCT -- PH	5'- LC640 -GCC GGA GGA CAG ACA CCA AGA AAA AAT TCT -- PH

3.4 OPTIMALISATIE INTERNE CONTROLE

De interne controle is net als de dermatofyten op primer en probe niveau geoptimaliseerd. Deze optimalisatie moest plaats vinden omdat door het overzetten van de PCR van de LC 2.0 naar de LC 480, de interne controle van kanaal 705 in de LC 2.0, bij de species van de Mcaau probe in kanaal 610 van de LC 480 werd geplaatst. Het 705 kanaal ontbreekt namelijk in de LC 480.

Echter met de probes en primers die in de LC 2.0 werden gebruikt lag de Tm van de interne controle te dicht op de Tm van *Microsporium canis*. Daarom zijn eerst de probe (P1-FL) en de reverse primer (R1-705), welke tegelijkertijd als probe fungeert, van de interne controle verlengd, om de Tm waarde van de interne controle te verhogen. (zie tabel 5)

TABEL 5: AANPASSINGEN PHHV PRIMERS EN PROBES

	Probe	Reverse primer
LC. 2.0	P1: CGC CAC CAT CTG GAT CAA CGT	R1-705: CGA GGC GGT TCC AAA CGX TAC *
LC. 480	P2: GTG TCC GCC ACC ATC TGG ATC AAC GT (+5 t.o.v. P1)	R2-610: CCC GAG GCG GTT CCA AAC GXT AC (+2 basen t.o.v. R1) *
LC. 480	P2: GTG TCC GCC ACC ATC TGG ATC AAC GT	R3-610: CCG AGG CGG TTC CAA ACG XTA C (+1 t.o.v. R1) *
LC.480	P2: GTG TCC GCC ACC ATC TGG ATC AAC GT	R1-610: CGA GGC GGT TCC AAA CGX TAC *

* X = De locatie van het interne label LC-705 of LC-610. Deze zijn altijd gekoppeld aan een T base.

Na het verlengen van de primer en probe naar respectievelijk P2 en R2-610 ontstond er een aspecifiek bijproduct in kanaal 610 bij een temperatuur van 78 °C. Om de oorzaak hiervan te kunnen achterhalen zijn er vier verschillende mixen met elkaar vergeleken (zie tabel 6). Deze mixen zijn getest op het eluaat van een negatieve opwerkcontrole (NOC) uit de routine. Een NOC bevat DNA van negatieve klinische monsters en van het Phocine Herpes Virus (PhHV = Interne Controle).

TABEL 6: VERSCHILLENDE MIXEN VOOR TESTEN ASPECIFIEK PRODUCT PHHV

Mix A	Mix B	Mix C	Mix D
LC 2.0 PPM PhHV	LC 2.0 PPM PhHV + R2-610	LC 2.0 PPM PhHV + P2-FL	LC 480 PPM PhHV (R2-610 + P2-FL

Na deze test is de reverse primer (R2-610) twee keer verkort om het aspecifieke bijproduct te verminderen. In tabel 5 zijn de aanpassingen aan de reverse primer te zien. Deze is twee keer met één base verkort zodat deze uiteindelijk dezelfde sequentie had als de reverse primer die werd gebruikt voor de LC. 2.0. P2 is niet verkort. Het verschil tussen de reverse primer van de LC 2.0 en reverse primer van de LC 480 is alleen het fluorescentie label. (LC 2.0 een 705 label en LC 480 en 610 label)

Na het verlengen van de primer en probe is de concentratie van de probe geoptimaliseerd. Deze moest worden aangepast omdat de T_m piek van *M.canis* overliep in die van de interne controle en daardoor niet gedetecteerd werd. Door de probe concentratie van de interne controle te verlagen werd verwacht dat de T_m piek van de interne controle zou verlagen waardoor de

T_m piek van de *M.canis* beter zichtbaar zou zijn en wel gedetecteerd zou worden. Om de juiste probe concentratie voor de interne controle te bepalen zijn er P2 concentraties van 50, 75 en 100 nM per reactie met elkaar vergeleken.

Nadat de probe concentratie was geoptimaliseerd bleek dat de Cp-waarde van de interne controle te hoog te zijn (>35). Hierdoor werd deze soms niet gedetecteerd. Om dit te verbeteren zijn de concentraties van de PhHV- primers verhoogd en getest. De verschillende concentraties die hiervoor zijn gebruikt staan weergegeven in tabel 7.

TABEL 7: VERSCHILLENDE MIXEN TER VERBETERING CP WAARDE INTERNE CONTROLE

	Mix A	Mix B	Mix C
PhHV-F1	150 nM	150 nM	210 nM
PhHV-R1-610	400 nM	600 nM	600 nM
PhHV-P2-FL	50 nM	50 nM	50 nM

Later is de concentratie van het PhHV in de opwerking verhoogd om een lagere Cp-waarde te realiseren. Hiervoor is de oorspronkelijke 1/20.000 verdunning van de stock getest naast een 1/5.000 verdunning.



3.5 OPTIMALISATIE KANAAL 640/660

3.5.1 Kanaal 640

Om de zwakkere/lage T_m pieken van de species *T. violaceum* en *T. verrucosum* te verbeteren, is het run protocol van de PCR aangepast. Tijdens de amplificatiefase wordt er voor de denaturatie 96°C en voor de smeltfase 99°C aangehouden.

3.5.2 Kanaal 660

In kanaal 660 waren er met het gebruik van de totale PPM pieken te zien van de species uit kanaal 640. De vraag was of de pieken afkomstig waren van aspecifieke binding of van doorstraling vanuit kanaal 640. Om dit de achterhalen is de volgende test gedaan.

Er zijn drie verschillende mixen gemaakt (tabel 8)

TABEL 8: PCR MIXEN OPTIMALISATIE KANAAL 660

Mix A	Mix B	Mix C
PCR mix met PPM (375 nM per probe) zonder Tinmeto probe	PCR mix met PPM (375 nM per probe) en Tinmeto probe (250 nM per probe)	PCR mix met totale PPM inclusief Tinmeto (alle probes 375 nM)

De drie mixen uit tabel 8 zijn op de volgende monsters getest:

- *T. verrucosum* 1/100 verdunning
- *T. violaceum* 1/100 verdunning
- *T. interdigitale* 1/100 verdunning
- *T. erinacei* 1/100 verdunning
- *T. rubrum* 10 pg/ μl
- *E. floccosum* 10 pg/ μl
- *T. tonsurans* 10 pg/ μl

Hieruit bleek dat de extra T_m curven in kanaal 660 afkomstig waren van aspecifieke producten. Er was echter een groot verschil te zien in de hoogten van de T_m pieken, van dezelfde species, in kanaal 640 en kanaal 660. Zo kon er toch onderscheid gemaakt worden tussen specifieke en aspecifieke producten. Alleen het verschil tussen de T_m pieken in kanaal 640 en kanaal 660 van *T. verrucosum* was niet groot (5.9 in kanaal 640 en 4.2 in kanaal 660). Daarom is er getest of door het verhogen van de probeconcentratie van de Tveerco probe, het verschil in hoogte van de T_m pieken groter werd.

Er zijn twee mixen gemaakt:

TABEL 9: MIXEN VOOR VERGELIJKING MET HOGERE CONCENTRATIE TVEERCO

Mix A	Mix B
PPM (375 nM per probe) Alleen Tinmeto 250 nM	PPM (375 nM per probe) Tinmeto (250 nM) Tveerco (500 nM)

3.6 VALIDATIE

3.6.1 Bepaling *T_m*-ranges

Een *T_m* range van een dermatofyt is de temperatuur range waarbinnen de *T_m* waarde van een bepaalde dermatofyt moet vallen om tot dat dermatofyten-species gerekend te mogen worden. Deze range wordt gebruikt om de verschillende *T_m* curves te kunnen koppelen aan de verschillende dermatofyten species.

De *T_m*-range voor deze PCR heeft als ondergrens de laagst geteste waarde en als bovengrens de hoogst geteste waarde. Om een betrouwbare *T_m* range voor een dermatofyt te kunnen bepalen zijn er minstens 15 *T_m* waardes nodig. Om aan deze waardes te komen werden er verschillende concentraties dermatofyten DNA gespiked in negatieve klinische eluaten. De reden voor het gebruik van verschillende negatieve klinische eluaten is om het verschil in klinische monsters na te bootsen om zo een betrouwbaar resultaat te realiseren. Tijdens de afgelopen test periode zijn de monsters al getest in negatieve klinische pool. Daarom konden de *T_m* waardes van die testen ook worden meegenomen voor het bepalen van de *T_m* ranges. De dermatofyten waarvan er nog onvoldoende *T_m* waardes bepaald waren, zijn;

- *M.audouinii*
- *T.erinacei1*
- *T.erinacei2*
- *T.concentricum*
- *T.tonsurans*
- *T.mentagrophytes*

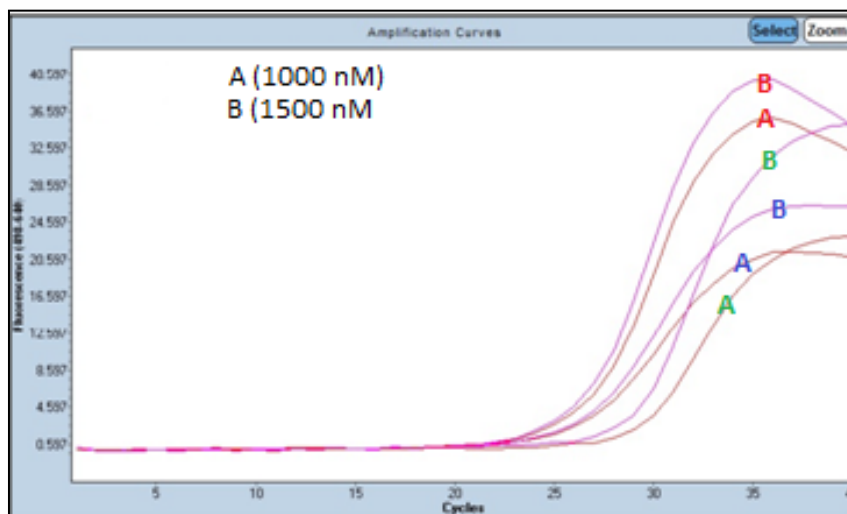
Van deze species werden nog een aantal verdunningen in verschillende klinische materialen getest om 15 *T_m* waardes te bepalen. De verdunningen die zijn getest zijn: 10 pg/μl en 1 pg/μl.



4. RESULTATEN

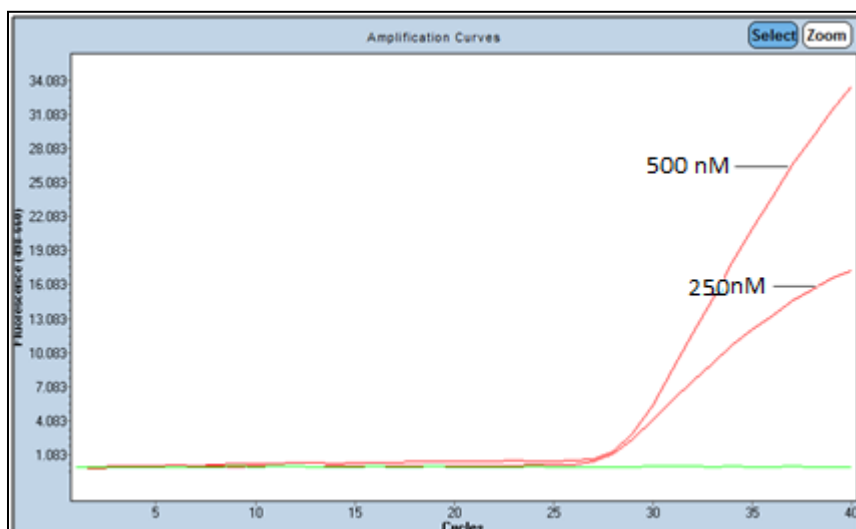
4.1 OPTIMALISATIE DERMATOFYTEN PRIMERS EN PROBES

In afbeelding 7 is het resultaat te zien van de optimalisatie test voor de reverse primer van de dermatofyten (Derm R2). Hieruit blijkt dat mix B met de hogere concentratie voor de reverse primer (1500 nM) een hogere fluorescentie geeft dan mix A met de lagere concentratie reverse primer (1000 nM). Er zijn drie verschillende *T. violaceum* stammen getest met elk een DNA concentratie van 1 ng/ μ l, als probes zijn Truvi 1A en TruviSnw2 gebruikt.

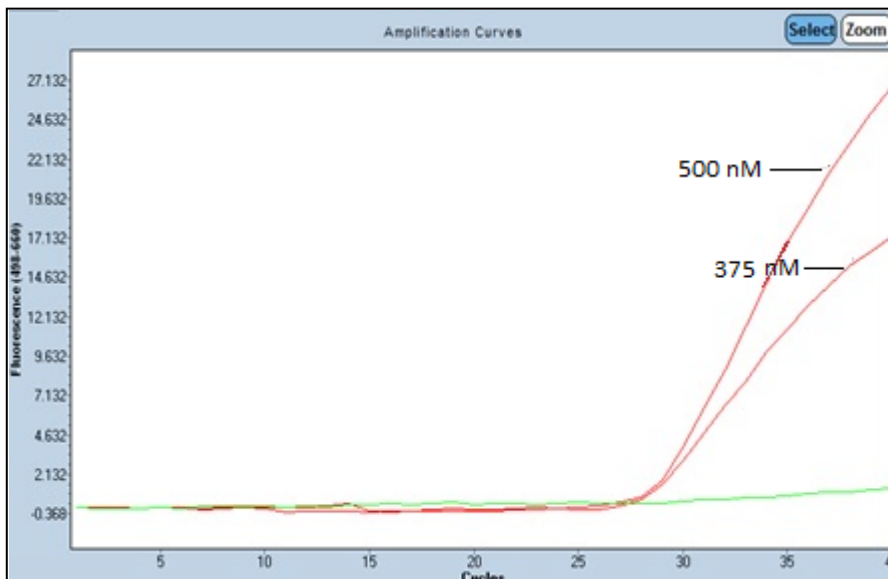


AFBEELDING 7: Vergelijking van twee concentraties dermatofyten reverse primer in kanaal 640. Mix A bevat 1000 nM reverse primer en mix B 1500 nM reverse primer. De verschillende kleuren letters laten zien welke lijnen bij elkaar horen. Op de X-as is het aantal cycli te zien en op de Y-as de fluorescentie.

Het eerste experiment van de probe optimalisatie liet zien dat de hoogste probeconcentratie van 500 nM een duidelijk verhoogde fluorescentie heeft, dan de oorspronkelijke concentratie van 250 nM. Om mogelijk wat kosten te besparen is er ook een tussenconcentratie van 375 nM vergeleken met de 500 nM, hieruit blijkt dat deze ook beduidend hoger ligt dan de 250 nM en genoeg fluorescentie geeft om een duidelijke T_m te kunnen maken (afbeelding 8 en 9).

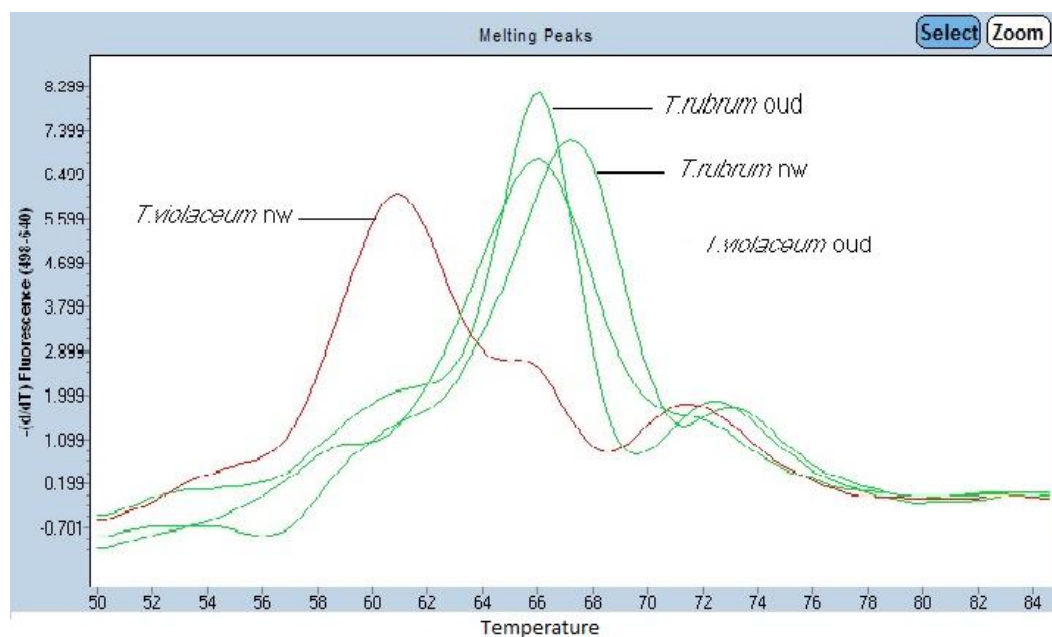


AFBEELDING 8: Amplificatie curve van *T. violaceum* met respectievelijk 250 en 500 nM Truvi probe.



AFBEELDING 9:
Amplificatie curve van
T. violaceum met
respectievelijk 375 en
500 nM Truvi probe.

In afbeelding 10 is het resultaat te zien van de optimalisatie van de Truvi probe. Hieruit is op te maken dat de nieuwe Truvi probe (TruviSnw) een veel betere scheiding geeft van de T_m van *Trichophyton rubrum* en de T_m van *Trichophyton violaceum* dan de oude Truvi probe.

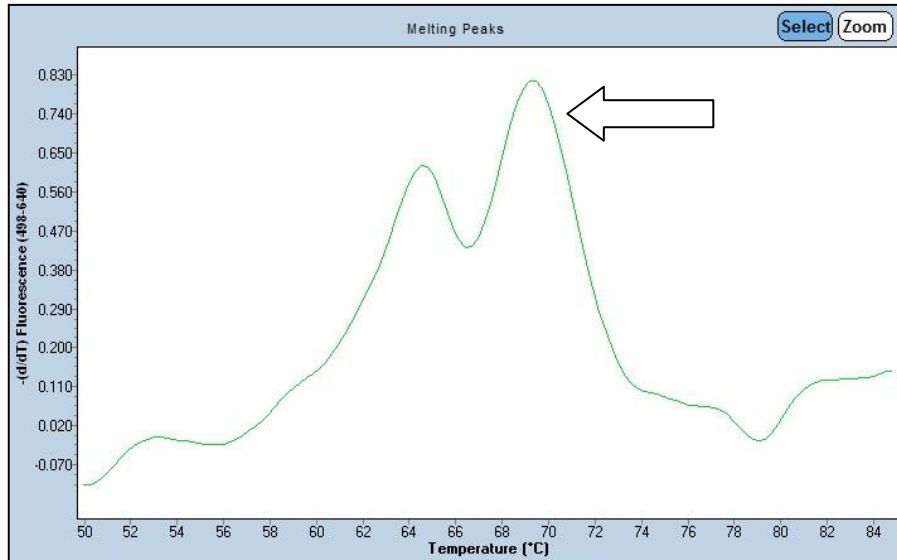


AFBEELDING 10: T_m curven van *T. violaceum* en *T. rubrum* met oude (TruviS) en nieuwe probe (TruviSnw)

De nieuwe probe (TruviSnw) is later nog verlengd met twee basenparen (TruviSnw2) om de T_m pieken van *T. rubrum* en *T. violaceum* een paar graden te laten opschuiven naar rechts, zodat deze niet te dicht bij de pieken van de Tverco probe in de buurt kwamen.

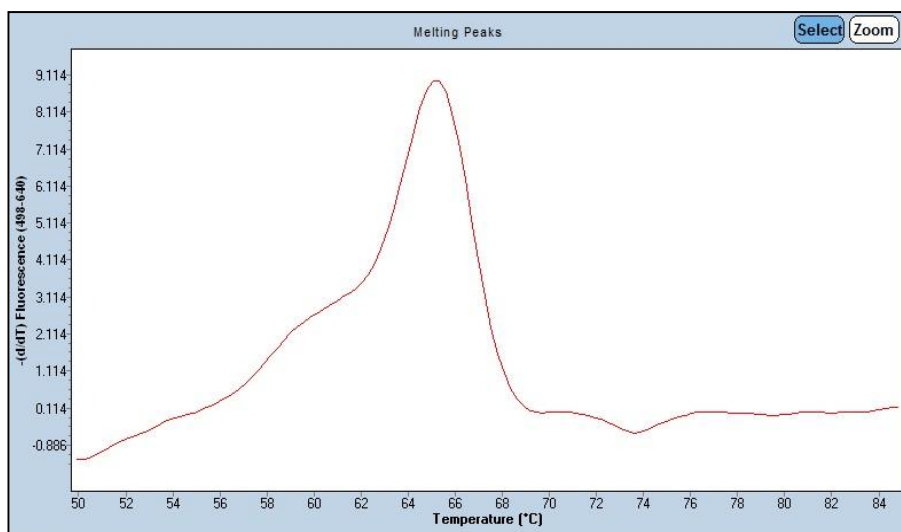


Ook moest de Tveerco probeset geoptimaliseerd worden. Er ontstonden namelijk aspecifieke bijpieken zoals in afbeelding 11A te zien is. Deze piek is waarschijnlijk ontstaan door afbraakproducten van de probes omdat deze al een langere tijd in de koelkast stonden. Er is een nieuwe Tveerco probeset besteld. Het T_m resultaat met de nieuwe Tveerco probe is te zien in afbeelding 11B.



AFBEELDING 11:
(A)

De pijl wijst de aspecifieke T_m piek aan welke is ontstaan door afbraakproducten van de verouderde probes.



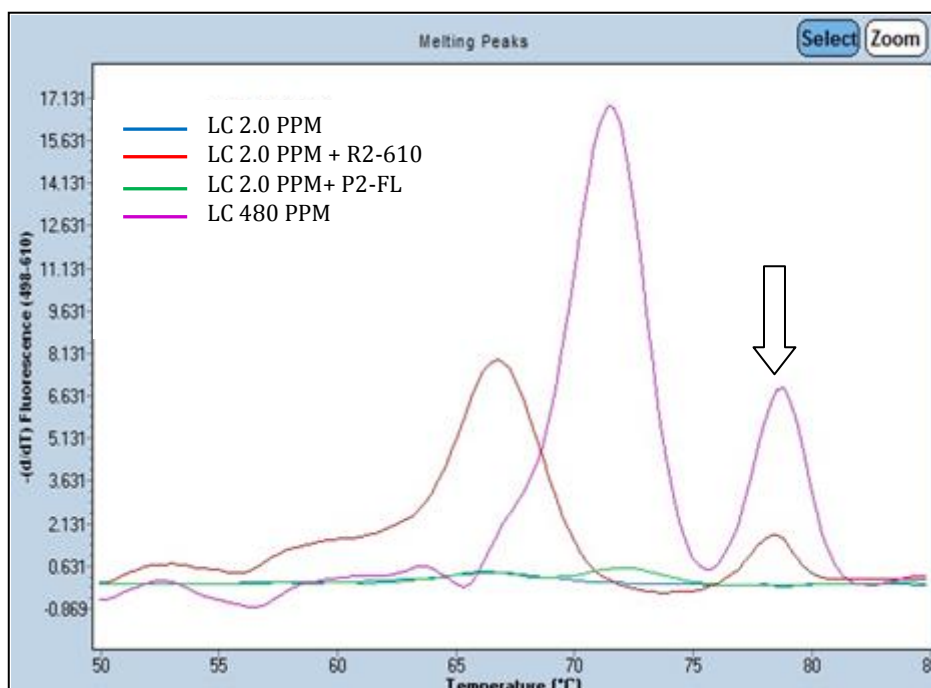
(B)

Dit is het resultaat van de test met de nieuwe probe. Hierbij vervalt de aspecifieke T_m piek en is alleen de voor *Trichophyton verrucosum* typerende T_m piek te zien.

4.2 OPTIMALISATIE INTERNE CONTROLE

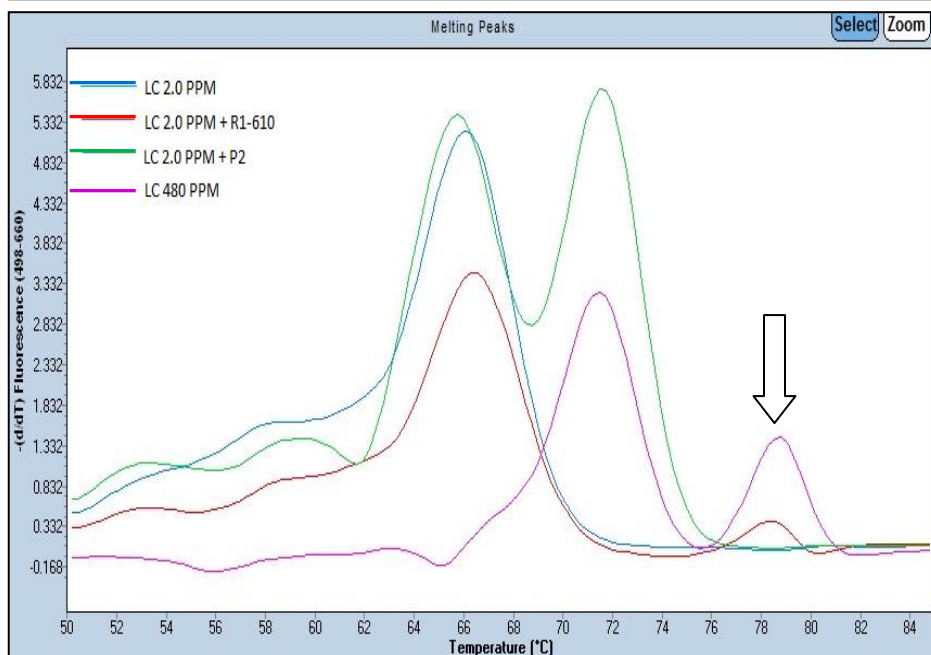
4.2.1 Optimalisatie structuur reverse primer interne controle

Om het aspecifieke product in kanaal 610 na het verlengen van de PhHV (interne controle) probe en reverse primer te kunnen verklaren werden de smeltcurve-resultaten van de vier mixen uit tabel 4 met elkaar vergeleken. Afbeelding 12 A laat het resultaat zien van de vier mixen getest op een negatieve opwerk controle in kanaal 610 (het kanaal van de nieuwe probe) en afbeelding 12 B laat hetzelfde zien in kanaal 660 (het kanaal waar de oude probe van de LC 2.0 wordt gemeten). In beide kanalen is te zien dat er alleen aspecifieke producten worden gebeurd bij de mixen met de R2-610 primer (rode en paarse lijnen). Ook is in afbeelding 12 B te zien wat het effect is van het verlengen van de PhHV probe en reverse primer. De T_m van de interne controle met de LC 2.0 mix ligt bij een temperatuur van 65°C en de T_m van de interne controle met de LC 480 mix ligt bij een temperatuur van 72°C.



AFBEELDING 12:
(A)

Het smeltcurve resultaat van de vier verschillende mixen uit tabel 4 in kanaal 610. (het kanaal van de nieuwe probe). Het aspecifieke product wordt met de pijl aangegeven.

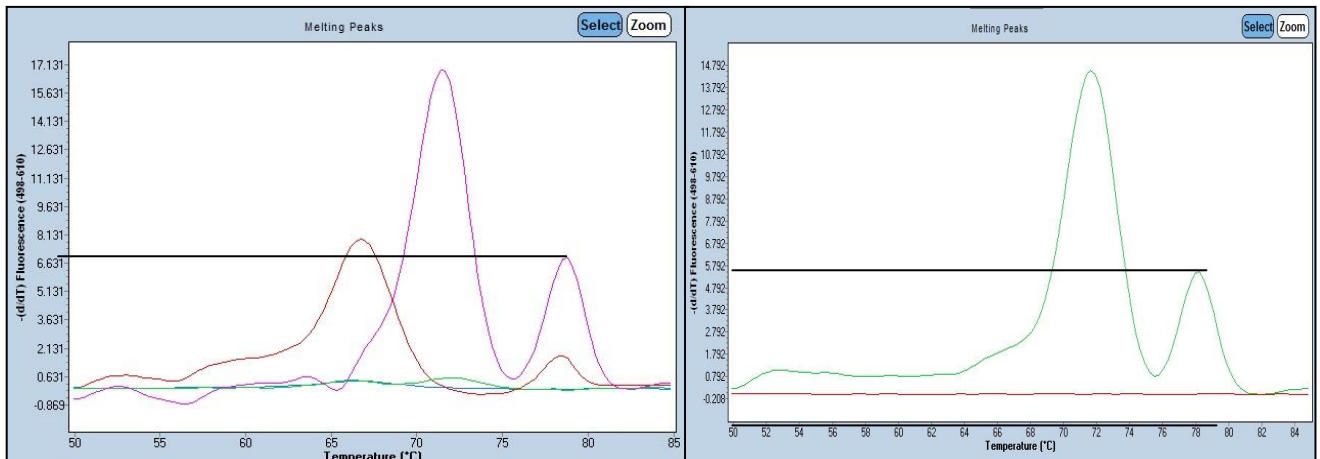


(B)

Het smeltcurve resultaat van de vier mixen uit tabel 4 in kanaal 660. (het kanaal waar de oude probe uit de LC 2.0 wordt gedetecteerd). Het aspecifieke product met de pijl aangegeven.

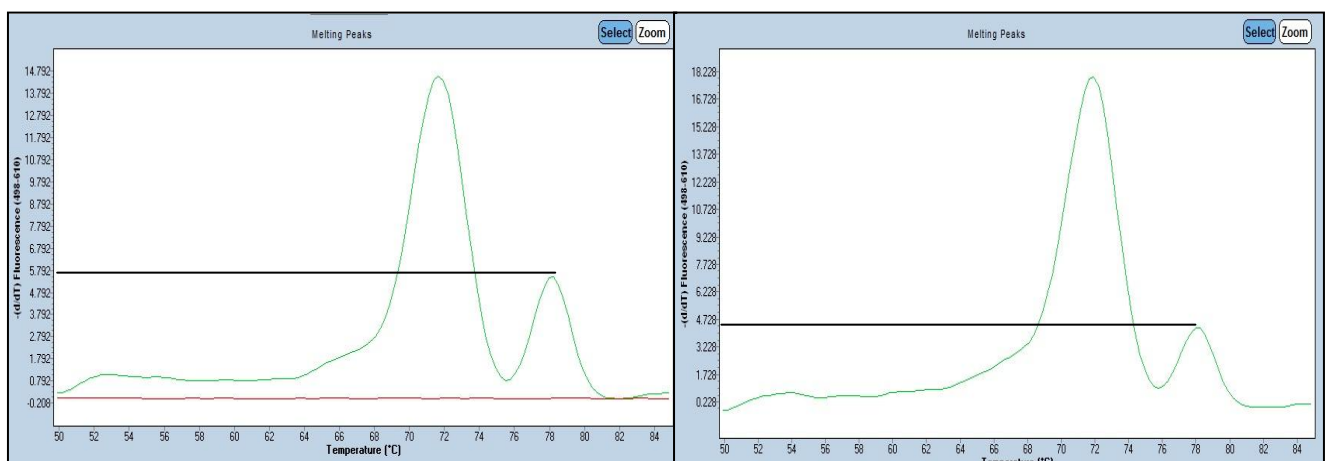


Na dit experiment werd besloten de R2-610 primer in eerste instantie te verkorten met één base (R3-610; zie tabel 5). Afbeelding 13 geeft de vergelijking tussen de lange (R2-610) en de verkorte (R3-610) reverse primer weer. Met deze lange primer R2-610 is de hoogte van de aspecifieke piek 6.7. Met de kortere primer R3-610 de hoogte van de aspecifieke piek is 5.7, dus iets lager dan de piek met de R2-610 primer. Echter is de hoogte van de aspecifieke piek ten opzichte van de hoogte van de specifieke piek gelijk bij de R2-610 ($6,7/17,1 = 0,39$) en R3-610 ($5,7/14,8 = 0,39$)



AFBEELDING 13: Vergelijking van aspecifieke T_m pieken bij gebruik van respectievelijk R2-610 en R3-610 (verkort) primers. Links is het resultaat van de mix met R2-610. Rechts is het resultaat met de verkorte primer (R3-610) te zien.

Daarom is de reverse primer nog een extra base verkort (R1-610; zie tabel 5). Waarna deze dezelfde sequentie als de oorspronkelijke reverse primer uit de LC 2.0 kreeg. De nieuwe, verkorte, reverse primer werd dan ook R1-610 genoemd. Het effect van deze primer is te zien in afbeelding 14. Ook hier is te zien dat bij de verder verkorte reverse primer R1-610 (rechts) de hoogte van de aspecifieke T_m piek bij 78°C lager is vergeleken met hoogte van de aspecifieke T_m piek van de langere R3-610 reverse primer (links). Bij de R3-610 primer was de hoogte van de aspecifieke piek 5.7. Met de nieuwe R1-610 primer is deze hoogte 4.6. De hoogte van de aspecifieke T_m piek ten opzichte van de hoogte van de specifieke T_m piek is bij R1-610 wel duidelijk lager dan bij R2-610 en R3-610, namelijk $4,6/18,2 = 0,25$.

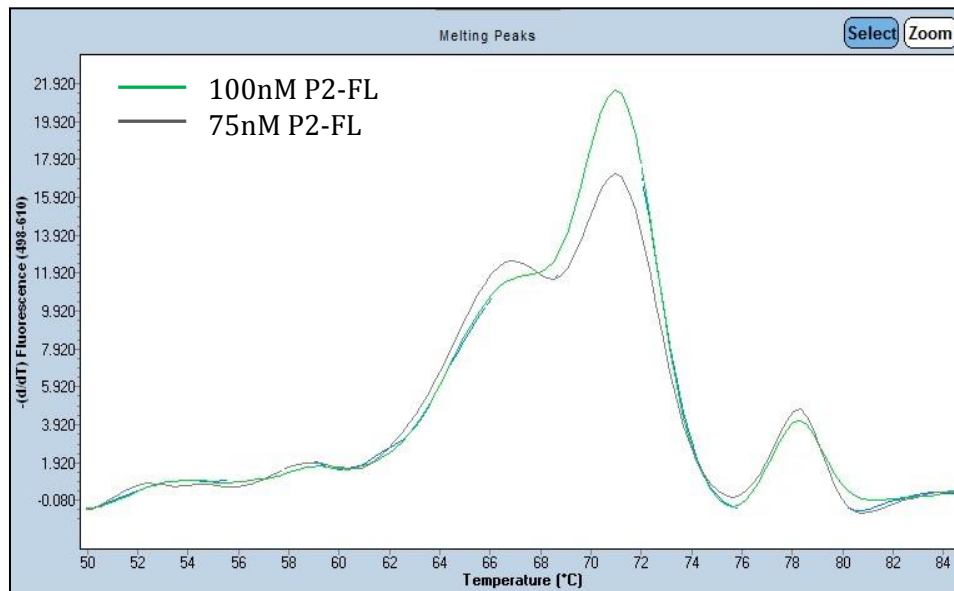


AFBEELDING 14: Vergelijking aspecifieke T_m pieken bij R3-610 primer (links) en nieuwe R1-610 primer

Hoewel de aspecifieke piek niet volledig weg is, is er voor gekozen om bij verdere experimenten de R1-610 reverse primer te gebruiken. Verdere uitleg wordt gegeven in de discussie op pagina 31.

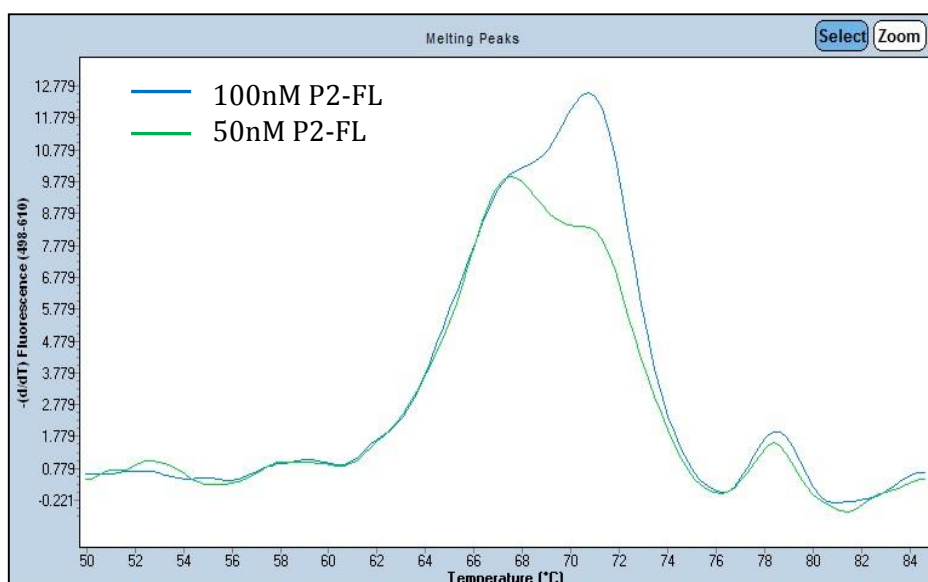
4.2.2 Optimalisatie PhHV probe concentratie

Eerst werden de PhHV probe concentraties van 100 en 75 nM met elkaar vergeleken. Het resultaat hiervan is te zien in afbeelding 15. Beide probe concentraties zijn getest op *M.canis* DNA van 0,5 pg/μl met interne controle. Uit de resultaten is op te maken dat door het verlagen van de PhHV probe concentratie de T_m van *M.canis* (66 °C) iets beter te onderscheiden is van de T_m van de interne controle (71°C).



AFBEELDING 15:
Onderscheid
tussen T_m pieken
van *M.canis* (T_m
66°C) en PhHV
(T_m 71 °C) met
mixturen met 100 of
75 nM PhHV- P2-
FL.

Omdat de T_m piek van *M.canis* nog steeds lager is dan de T_m piek van de interne controle bij een PhHV concentratie van 75 μM is er voor gekozen de PhHV-probe concentratie nog wat te verlagen naar 50 nM. Deze concentratie is vergeleken met de standaard concentratie van 100 nM. In afbeelding 16 is te zien dat bij 50 nM PhHV probe de T_m piek van *M.canis* (66°C) hoger is dan T_m piek van de interne controle (71°C).



AFBEELDING 16:
Onderscheid tussen
T_m pieken van
M.canis (T_m 66°C)
en PhHV (T_m 71 °C)
bij 50 en 100 nM
PhHV probe.



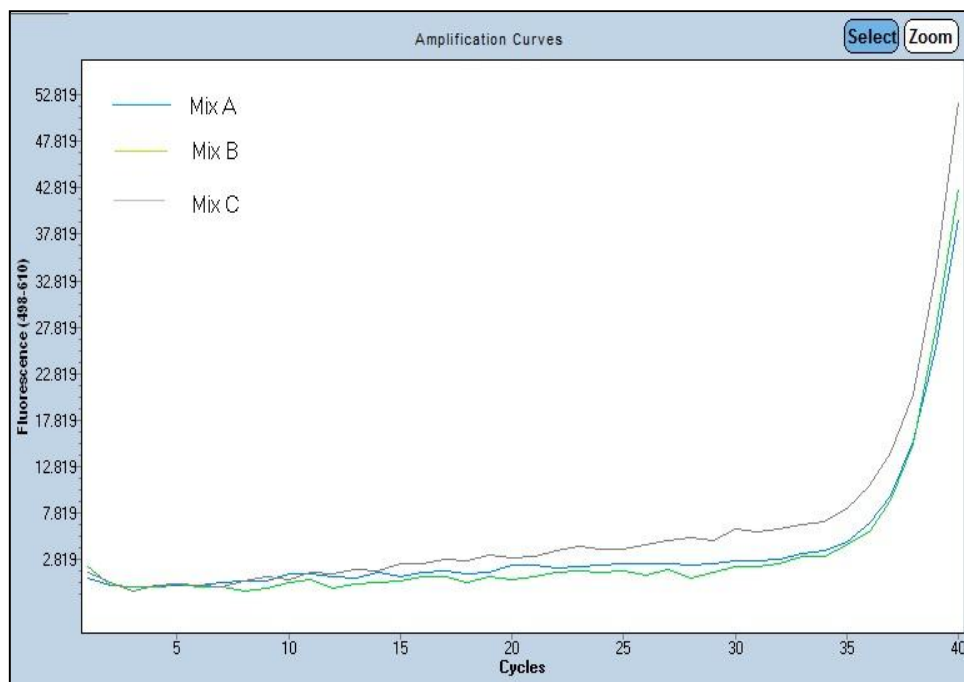
4.2.3 Optimalisatie Cp-waarde interne controle

Om een lagere Cp-waarde voor de interne controle te realiseren zijn de primers voor de interne controle verhoogd (zie tabel 6). Dit had echter geen effect zoals te zien is in afbeelding 17.

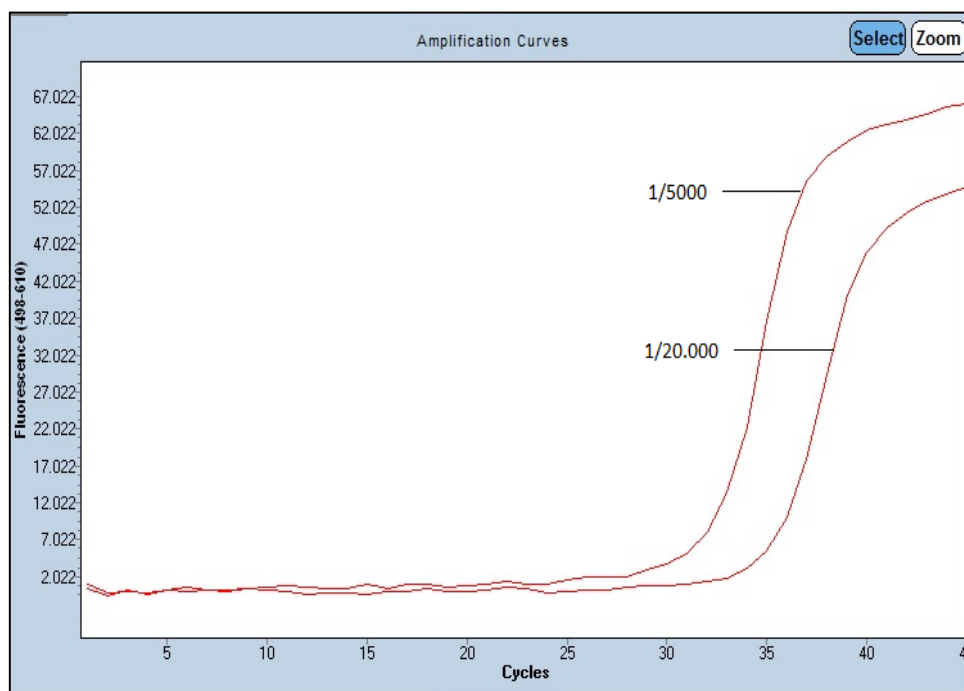
De Cp-waarde van de interne controle blijft bij alle drie de mixen groter dan 35.

Daarom is er voor gekozen de concentratie van de interne controle, dus het PhHV virus, in de MPLC opwerking van klinische materialen te verhogen. De oorspronkelijke verdunning die werd gebruikt was een 1/20.000 verdunning van de stock, deze is getest naast een 1/5.000 verdunning.

Hierdoor werden de Cp-waarden wel lager. Dit is te zien in afbeelding 18.



AFBEELDING 17:
Zie tabel 5 voor de uitleg van de mixen. In deze test zijn de primer concentraties verhoogd om een lagere Cp-waarde te krijgen.

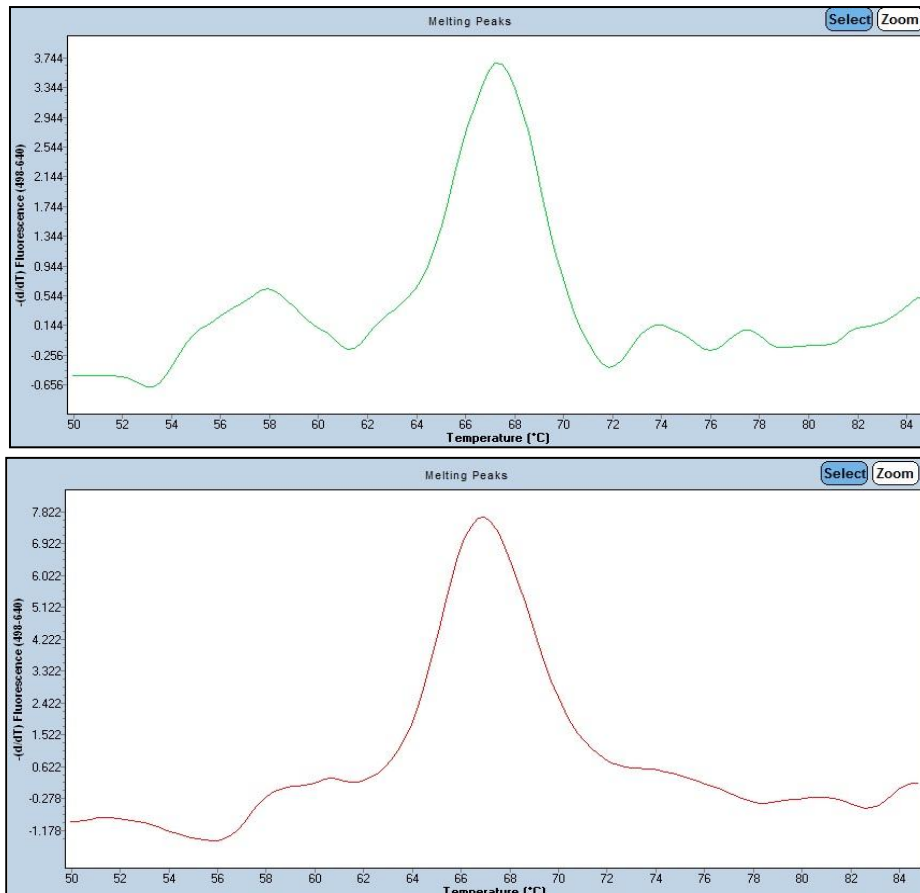


AFBEELDING 18:
Vergelijking van 1/20.000 en 1/5000 verdunning van PhHV (interne controle) stock. Met als doel het verlagen van de Cp-waarde.

4.3 OPTIMALISATIE 640/660 KANAAL

4.3.1 Kanaal 640

Door het verhogen van de denaturatie temperatuur voor de amplificatiefase en de smeltfase is te zien dat met name de T_m curven van *T. violaceum* hoger (van 3.7 naar 7.8) en steiler worden (afbeelding 19). Daarom is er voor gekozen om de temperatuur blijvend te verhogen. Voor de amplificatiefase naar 96°C en voor de smeltfase naar 99°C



AFBEELDING 19
(A): T_m curve
T. violaceum bij
standaard
runprotocol (95°C
voor amplificatie,
95°C voor
smeltcurve)

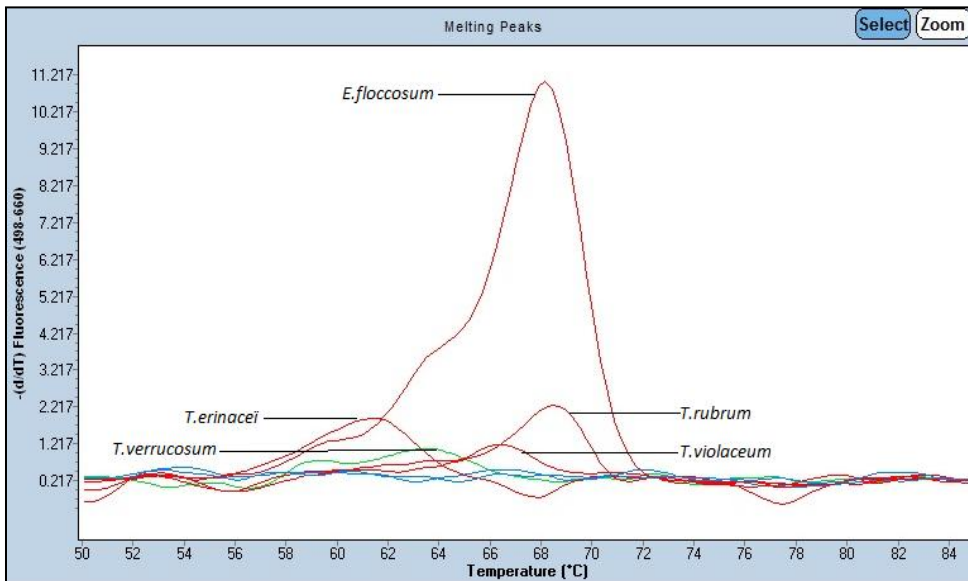
(B): T_m curve
T. violaceum bij
aangepast
runprotocol. (96°C
voor amplificatie,
99°C voor
smeltcurve)

4.3.2 Kanaal 660

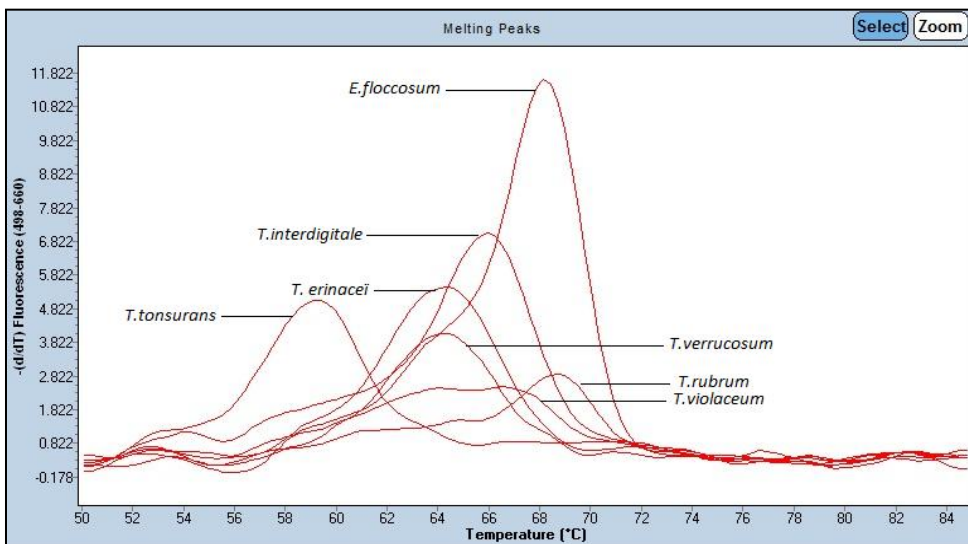
In kanaal 660 waren er extra T_m pieken afkomstig van de species die in kanaal 640 gedetecteerd dienden te worden (afbeelding 21) Om te kunnen achterhalen of de extra pieken in kanaal 660 afkomstig waren van doorstraling uit kanaal 640 of afkomstig van aspecifieke hybridisatie tussen de species de species uit kanaal 640 en de Tinmeto probe, zijn de species uit kanaal 640 en 660 getest met de drie mixen uit tabel 8.

Bij de test met PPM zonder de Tinmeto probe zijn er nauwelijks extra T_m pieken in kanaal 660 te zien, afgezien van een lage T_m piek van *T. rubrum* bij 68.3°C en *T. erinacei* bij 61°C (afbeelding 20). De T_m pieken van *T. interdigitale* en *T. tonsurans* ontbreken ook in deze figuur omdat er in de mix geen Tinmeto probe is meegenomen.

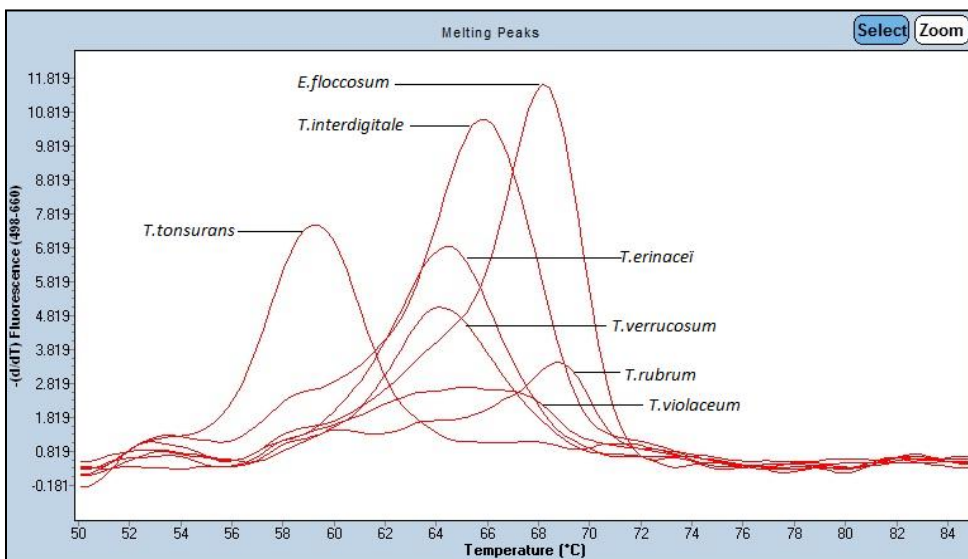
Bij de PPM met een lage concentratie Tinmeto (250 nM) zijn er naast de lage piek van *T. rubrum* wel duidelijk extra T_m pieken te zien van *T. erinacei* en *T. verrucosum*, beide bij een T_m van 64°C (afbeelding 21). Ook is er een lage brede curve te zien van *T. violaceum*. Wanneer de concentratie van de Tinmeto probe verder wordt verhoogd (375 nM), zijn ook de extra T_m curven in kanaal 660 hoger. (afbeelding 22).



AFBEELDING 20:
Kanaal 660 met
PPM zonder
Tinmeto probe



AFBEELDING 21:
Kanaal 660 met
PPM met 250 nM
Tinmeto probe



AFBEELDING 22:
Kanaal 660 met
PPM met 375 nM
Tinmeto probe

Uit deze resultaten blijkt dat de extra pieken in kanaal 660 afkomstig zijn van aspecifieke hybridisatie van *T. verrucosum* en *T. erinacei* PCR product met de Tinmeto probe, omdat er in de test zonder Tinmeto probe nauwelijks Tm curven van deze species te zien zijn, maar wel duidelijk toenemen wanneer er Tinmeto probe aan de PPM wordt toegevoegd. Er is besloten deze extra pieken te accepteren, omdat de Tm pieken in het eigen kanaal 640 duidelijk hoger waren dan in het aspecifieke kanaal 660 (tabel 10). Voor de waardes in tabel 10 werden de resultaten van de test met mix B (tabel 8) genomen. Ook werd de standaard concentratie voor Tinmeto aangepast van 375 nM naar 250 nM omdat de Tm curven van *T. tonsurans* en *T. interdigitale* bij beide concentraties goed zijn af te lezen en omdat bij 250 nM de aspecifieke pieken lager, en dus minder storend zijn.

TABEL 10: HOOGT VERSCHIL CURVEN KANAAL 640 EN 660 BIJ 250 NM TINMETO PROBE

	Tm 640	Hoogte 640	Tm 660	Hoogte 660	Vershil in hoogte
<i>T. verrucosum</i>	64.9	5.9	64.0	4.2*	1.7
<i>T. violaceum</i>	67.0	7.8	65.1	2.5*	5.3
<i>T. erinacei</i>	62.0	11.9	64.1	5.5*	6.4
<i>T. rubrum</i>	69.1	15.6	68.9	2.9*	12.7
<i>T. interdigitale</i>	58.5	3.6*	65.9	7.2	3.6
<i>T. tonsurans</i>	-	-	59.1	5.1	5.1
<i>E. floccosum</i>	-	-	68.3	11.8	11.8

* Aspecifieke Tm curve

Uit tabel 10 blijkt dat alleen bij *T. verrucosum* er maar een klein verschil is tussen de hoogten van de Tm pieken in kanaal 640 en kanaal 660. Om dit verschil groter te maken werd de probeconcentratie van Tveerco verhoogd naar 500 nM (tabel 9). Voor Tinmeto werd standaard 250 nM aangehouden.

De resultaten van deze test zijn in tabel 11 weergegeven. Hier worden weer de hoogtes van de curven in kanaal 640 en kanaal 660, met de verschillende Tveerco probe concentraties, met elkaar vergeleken.

TABEL 11: VERGELIJKING HOOGTE TM CURVEN MET VERSCHILLENDE TVEERCO CONCENTRATIES

	Hoogte 640		Hoogte 660		Vershil	
	375 nM	500 nM	375 nM	500 nM	375 nM	500 nM
<i>T. verrucosum</i> 10 pg/μl	5.8	8.9	3.4	3.4	2.4	5.5
<i>T. verrucosum</i> 1 pg/μl	2.7	4.4	1.5	1.7	1.2	2.7
<i>T. erinacei</i> 10 pg/μl	10.9	15.1	5.7	5.4	5.2	9.7
<i>T. erinacei</i> 1 pg/μl	7.7	11.4	3.5	3.9	3.8	7.5

Hieruit blijkt dat met mix B, waarbij Tveerco een concentratie heeft van 500 nM, het verschil in hoogte van de Tm pieken in kanaal 640 en 660 beduidend groter is bij met name *T. verrucosum*. Daarnaast worden de ongewenste pieken in kanaal 660 niet hoger bij het verhogen van de Tveerco probeconcentratie. Beide resultaten zijn zoals verwacht.



4.4 VALIDATIE

4.4.1 Tm ranges bepaling:

Om de Tm range voor een dermatofyt te kunnen bepalen werden de gemeten Tm waardes onder elkaar gezet. De gemeten Tm waardes van de hele test periode staan weergegeven in tabel 12.

De Tm range per dermatofyt is het gebied tussen de laagst en de hoogst gemeten Tm waarde (tabel 13).

Bijvoorbeeld:

Er wordt gekeken in kanaal 640 en er is een Tm curve te zien bij 66,9°C. Als deze waarde wordt vergeleken met tabel 13, is er te zien dat 66,9°C in kanaal 640 valt binnen de Tm range van *T.violaceum*. De Tm curve in kanaal 640 is dus afkomstig van *T.violaceum*.

TABEL 12: RESULTATEN TM RANGES

Kanaal	610	610	610	640	640	640	640
Naam*	<i>M.can</i>	<i>M.aud</i>	<i>PhHV</i>	<i>T.ver</i>	<i>T.eri1</i>	<i>T.eri2</i>	<i>T.conc</i>
	66,2	61,3	70.9	64,8	62	60,9	60,9
	65,9	61,9	70.9	64,9	62,2	61,4	61,4
	66,8	61,8	71.1	65,2	62,2	61,6	61,6
	67,1	61,3	71.1	64,9	62,4	61,3	61,3
	66,9	61,3	71.1	64,9	62,4	61,3	61,3
	67,2	61,4	70.9	65,1	62	61,5	61,5
	66,7	61,2	70.9	64,7	62,2	61,3	61,3
	66,7	61,4	71.1	64,9	62,1	61,5	61,5
	66	61,2	71.2	64,3	62,3	61,4	61,3
	66,1	61,3	71.1	64,2	62,3	61,2	61,3
	67	61,3	71	64,1	62,4	61,3	61,3
	67,2	61,3	70.9	64,1	62,2	61,3	61,3
	67,2	61,5	70.9	64,8	62,7	61,3	61,3
	67,7	61,1	71	65,3	62,6	61,3	61,3
	66,9	61,2	70.9	64,4	62,4	61,3	61,3
	67,1		70.8	64,9			
	66,9		70.9	64,3			
	66,9		71.1	64,6			
	66,6		71.1	64,4			
	66,9		71	64,8			
			70.9	64,5			
			70.9	65,1			
			70.8	65			
			71	64,7			
			70.7	64,8			
				64,7			
				65,2			
				65,2			
				64,5			
Laagste Tm (°C)	65,9	61,1	71,2	64,1	62	60,9	60,9
Hoogste Tm(°C)	67,7	61,9	70,7	65,3	62,7	61,6	61,6

	640	640	660	660	660	660
	<i>T.rub</i>	<i>T.viol</i>	<i>T.int</i>	<i>T.ment</i>	<i>T.tons</i>	<i>E.floc</i>
	69,3	67,1	65,6	62,1	59,1	68,8
	69,2	66,5	66,1	62,3	59,1	68,8
	69,5	66,6	65,8	62,2	59,2	68,9
	69,1	66,4	65,7	62,1	59,1	68,8
	68,6	66,5	66,2	62,4	59,3	68,8
	68,4	66,6	66,1	62,4	58,9	68,8
	68,8	66,5	66,3	62,4	58,9	68,6
	68,6	66,6	65,9	62,3	59	68,7
	68,8	66,7	65,5		59,1	68,7
	68,9	66,6	65,8		59,2	68,9
	68,9	66,5	66,3		59,2	69,3
	68,8	66,4	66,7		59,1	68,6
	68,9	66,4	66,3		59,1	68,9
	69,2	67,2	66,5			68,7
	68,8	67,4	66,3			69
	69,1	66,3	66,3			68,7
	68,8	66,5	65,9			68,8
	69,7	66,2	66			68,8
	69,8	66,3	66,7			68,9
	69,5	66,2	66,1			68,3
	69,9	66,1	66,2			68,3
	69,5	66,2				
	69,7	66,4				
	69,5	66,2				
	69,6					
	69,7					
	69,2					
	69,3					
	69,6					
	69,6					
Laagste Tm (°C)	68,4	66,1	65,5	62,1	58,9	68,3
Hoogste Tm (°C)	69,9	67,4	66,7	62,4	59,3	69,3

**M.can* = *Microsporum canis*, *M.aud* = *Microsporum audouinii*, PhHV = interne controle, *T.ver* = *Trichophyton verrucosum*, *T.eri1* = *Trichophyton erinacei1*, *T.eri2* = *Trichophyton erinacei2*, *T.conc* = *Trichophyton concentricum*, *T.rub* = *Trichophyton rubrum*, *T.viol* = *Trichophyton violaceum*, *T.int* = *Trichophyton interdigitale*, *T.ment* = *Trichophyton mentagrophytes*, *T.tons* = *Trichophyton tonsurans*, *E.floc* = *Epidermophyton floccosum*



TABEL 13: Tm RANGE PER DERMATOFYTEN SPECIES

Species	Kanaal	Tm range (°C)	Aantal monsters
<i>Microsporum canis</i>	610	65.9 – 67.7	20
<i>Microsporum audouinii</i>	610	61.1 – 61.9	15
<i>Interne controle</i>	610	71.2 – 70.7	25
<i>Trichophyton verrucosum</i>	640	64.1 - 65.3	30
<i>Trichophyton erinacei</i> 1	640	62 – 62.7	15
<i>Trichophyton erinacei</i> 2	640	60.9 – 61.6	15
<i>Trichophyton concentricum</i>	640	60.9 – 61.6	15
<i>Trichophyton rubrum</i>	640	68.4 – 69.9	30
<i>Trichophyton violaceum</i>	640	66.1 – 67.4	24
<i>Trichophyton interdigitale</i>	660	65.5 – 66.7	21
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	660	62.1 – 62.4	8
<i>Trichophyton tonsurans</i>	660	58.9 – 59.3	13
<i>Epidermophyton floccosum</i>	660	68.3 – 69.3	21

Verder liggen de Tm waardes van de aspecifieke pieken in kanaal 660 tussen de 64 en de 65°C.

5. DISCUSSIE/CONCLUSIE

Het doel van dit afstudeeronderzoek was het optimaliseren, valideren en implementeren van de dermatofyten PCR voor de LightCycler 480 binnen de Stichting Medische Microbiologie. De PCR wordt momenteel nog uitgevoerd op de LightCycler 2.0 maar moest om verschillende redenen (capaciteit, kosten etc.) worden overgezet naar de LightCycler 480.

5.1 OPTIMALISATIE

5.1.1 *Dermatofyten primers*

Allereerst werden de dermatofyten primerconcentraties geoptimaliseerd. De verwachting was dat wanneer de concentratie voor de reverse primer werd verhoogd er hogere amplificatie curven zouden ontstaan omdat er dan meer reverse strengen beschikbaar zouden zijn waar de hybridisatie probes op kunnen binden. Er is uiteindelijk gekozen voor een concentratie van 1500 nM voor de Derm R2 primer i.p.v. 1000 nM en is er gebleven bij 300 nM voor de Derm F1 primer. Bij deze twee concentraties was de fluorescentie van de amplificatiecurven namelijk het hoogst.

5.1.2 *Dermatofyten probe concentraties*

Om de amplificatiecurves nog verder te verhogen ten behoeve van een hogere en steilere T_m piek zijn de probeconcentraties geoptimaliseerd. Er werd verwacht dat bij een hogere probeconcentratie de T_m curven hoger/steiler zouden zijn. Als beste concentratie is 375 nM gekozen, omdat bij deze concentratie de fluorescentie van de amplificatiecurve hoog genoeg was om een duidelijke T_m curve te kunnen vormen. Ook zijn voor deze beslissing de kosten van de probes in overweging genomen. De concentraties van 500 nM en 375 nM gaven namelijk vergelijkbare resultaten. Maar vanwege de kosten is er voor de lagere concentratie van 375 nM gekozen.

Later zijn de probeconcentraties voor de Tinmeto en Tveerco probes nog aangepast naar respectievelijk 250 en 500 nM ten behoeve van een betere interpretatie van de T_m curven in de kanalen 640 en 660.

In kanaal 660 waren namelijk T_m curven te zien van aspecifieke producten met de Tinmeto probe. Door de Tinmeto probe concentratie te verlagen werden de aspecifieke T_m curven ook lager en waren deze beter te onderscheiden van de specifieke T_m curven. Met het verhogen van de concentratie van de Tveerco probe werd er een groter hoogteverschil tussen enerzijds de specifieke curven in kanaal 640 en anderzijds de aspecifieke curven in kanaal 660 gerealiseerd, met als gevolg dat ook deze curven beter van elkaar te onderscheiden waren.

Dat de aspecifieke T_m curven niet volledig kunnen verdwijnen is geaccepteerd. Door het beschrijven van de T_m ranges kan er nu ook onderscheid gemaakt worden tussen aspecifiek en specifiek signaal op basis van de T_m waarde. De T_m waardes van de aspecifieke producten liggen in kanaal 660 namelijk tussen de 64 en 65°C. Binnen deze range vallen geen specifieke T_m pieken van Tinmeto.

Om de aspecifieke pieken uit kanaal 660 mogelijk te kunnen verklaren is de ITS1 sequentie van *T. verrucosum* vergeleken met de sequentie van de Tinmeto3A probe. Hieruit bleek dat de Tinmeto3A probe vlak achter de Tveerco1A op het DNA van *T. verrucosum* kan hechten. Hierdoor kan Tveerco 1A worden aangestraald door Tinmeto3A waardoor er dus een aspecifiek signaal kan worden gemeten in kanaal 660 (660 is label van Tinmeto3A).



5.1.3 Truvi probe

Om de Tm curven van *T.rubrum* en *T.violaceum* beter van elkaar te kunnen onderscheiden en om beide curven op te laten schuiven naar een hogere Tm, zodat deze niet te dicht bij de curven van de Tveerco probe kwamen te liggen, is de TruviS probe aan de 3' kant met 6 basen verlengd (TruviSnw2). Door deze verlenging waardoor er één extra mismatch met *T.violaceum* ontstond kwamen de Tm curves van *Trichophyton rubrum* en *Trichophyton violaceum* ongeveer 2°C verder bij elkaar vandaan te liggen. Dit is acceptabel en daarom is er voor gekozen om met de TruviSnw2 probe vervolg experimenten uit te voeren.

5.1.4 Interne controle

Om de aspecifieke extra piek van de interne controle in kanaal 610 te verminderen is de reverse primer van de interne controle (PhHV) twee maal verkort. Er werd voor de kortste reverse primer R1-610 gekozen omdat met deze primer de aspecifieke piek het laagste werd. De aspecifieke piek is echter niet helemaal te verhelpen. Maar omdat deze niet storend is voor de determinatie van de andere dermatofyten species in kanaal 610 is dit geaccepteerd.

Hierna is de probeconcentratie van de interne controle verlaagd naar 50 nM om de Tm curven van de interne controle en *M.canis* meer van elkaar te scheiden, zodat een zwak positief *M.canis* signaal niet gemist wordt. De Tm curve van *M.canis* werd hierdoor hoger dan de Tm curve van de interne controle. Maar omdat de interne controle alleen wordt afgelezen aan de hand van de Cp waarde is het geen probleem dat de Tm curve van de interne controle soms wegvalt ter verbetering van de detectie van *M.canis*.

Als laatste is de PhHV concentratie tijdens de DNA/RNA extractie verhoogd om de Cp waarde te verlagen. Deze was namelijk steeds groter dan 35 waardoor de interne controle als negatief werd afgegeven. Wanneer de interne controle negatief is betekent dit dat er mogelijk remming zit in de PCR of dat er iets is mis gegaan in de opwerking, waardoor het monster herhaald moet worden. Echter kwamen deze verhoogde Cp waarden niet door remming maar omdat de stockoplossing van PhHV was verouderd en daardoor achteruit was gegaan. Om deze reden is een kleinere verdunningsfactor voor de interne controle gebruikt tijdens de DNA/RNA extractie, namelijk 1/5000 in plaats van 1/20.000.

5.1.5 Runprotocol

Ter verbetering van de Tm curves van de wat zwakkere species *T.violaceum* en *T.versicolor* is het runprotocol aangepast. Voor de denaturatietemperatuur tijdens de amplificatie wordt nu 96°C aangehouden en voor de initiële denaturatie tijdens de smeltcurve-analyse 99°C. Hierdoor werden de Tm curves van *T.violaceum* en *T.versicolor* hoger en steiler waardoor ze beter te interpreteren zijn, met name bij zwak positieve monsters.

5.2 VALIDATIE

5.2.1 Bepaling T_m ranges

Uit de resultaten voor het bepalen van de T_m ranges bleek dat de T_m ranges van *T.erinacei*2 en *T. concentricum* exact gelijk waren. Dat deze twee species dezelfde T_m hebben werd verwacht aan de hand van het artikel van Bergmans *et al.*(3). Omdat deze species exact dezelfde sequentie hebben in het probegebied (3) zullen ze verder dan ook onder één noemer geschaard worden; *Trichophyton erinacei*2/*concentricum*. Echter komt *Trichophyton concentricum* alleen voor in zuid-oost Azië en in midden- en zuid Amerika. Daarom mag er worden aangenomen dat men bij een T_m tussen de 60.9 – 61.6°C te maken heeft met een *Trichophyton erinacei*2.

Over de T_m ranges van *T.tonsurans* en *T.mentagrophytes* moet gezegd worden dat deze niet volledig betrouwbaar zijn omdat er minder dan 15 waardes zijn bepaald. Voor meer betrouwbare range moeten er meer monsters met deze twee species worden getest.

De T_m ranges uit tabel 13 zijn bepaald voor klinisch materiaal. Er is echter bekend uit T_m resultaten met de LC 2.0 dat de T_m-ranges verkregen met DNA uit gekweekte dermatofyten-stammen kunnen verschuiven ten opzichte van de T_m-ranges verkregen met DNA uit klinisch materiaal. Daarom is het noodzakelijk om naast de huidige T_m ranges ook T_m ranges te bepalen voor gekweekte schimmelstammen.

5.3 ADVIES VERVOLGONDERZOEK

Voor een betere validatie en later implementatie van de dermatofyten real-time PCR moeten de volgende testen nog worden uitgevoerd;

5.3.1 Bepaling T_m ranges gekweekte schimmelstammen

De real-time dermatofyten PCR wordt niet alleen gebruikt voor detectie en identificatie van dermatofyten in klinische materialen, maar ook voor identificatie van gekweekte dermatofyten stammen. Voor het bepalen van de T_m ranges voor DNA uit gekweekte schimmelstammen moeten er, net als bij de T_m ranges bepaling voor klinische materialen, van alle dermatofyten stammen minstens 15 monsters in meerdere concentraties getest worden. Deze verdunningen dienen echter te worden verdund met TE in plaats van in klinische pool.

5.3.2 Limit of Detection bepaling

Voor de validatie moeten er verschillende (nagebootste) klinische materialen getest worden om de selectiviteit en sensitiviteit van de PCR te kunnen bepalen. De Limit of Detection (LOD) wordt bepaald door 3 concentraties DNA, 10 pg/μl, 0,5 pg/μl en 0,1 pg/μl, van vijf verschillende dermatofyten species te testen; *M.canis*, *T.rubrum*, *T.verrucosum*, *T.interdigitale* en *E.floccosum*. Deze vijf species vertegenwoordigen de vijf dermatofyten probes binnen de PCR. Deze moeten worden getest met de totale PPM.

De concentraties die worden gebruikt komen overeen met respectievelijk 1000, 50 en 10 genoomkopieën per reactie. Deze waarden zijn afgeleid uit het artikel van Bergmans *et al.*(3) In dit artikel is namelijk ook een LOD bepaling gedaan voor de LightCycler 2.0



5.3.3 *Schaduwdraaien*

Om er zeker van te zijn dat de PCR op de LightCycler 480 net zo goed functioneert als de PCR op de LightCycler 2.0, zullen er een aantal monsters dubbel gedraaid worden. Namelijk op de LightCycler 2.0 en op de LightCycler 480. Het zal gaan om ca. 10 met de LightCycler 2.0 negatief gemeten monsters en alle positief gemeten monsters uit 5 verschillende runs. Er mogen niet veel discrepanties tussen de verschillende PCR's zitten.

Wanneer dit wel het geval is, moet er worden onderzocht wat deze discrepanties veroorzaakt zodat dit verholpen kan worden.

Wanneer alles voldoende overeen komt mag er worden overgegaan naar de implementatie van de dermatofyten PCR binnen de routine van de PCR afdeling van de Stichting Medische Microbiologie Roosendaal-Bergen op Zoom.

De selectiviteit/specificiteit van de primers en probes is al bepaald in het artikel van Bergmans et. al. (3) en hoeft dan ook niet opnieuw bepaald te worden

5.3.4 *Implementatie*

Voordat de dermatofyten PCR geïmplementeerd kan worden moet er eerst een validatierapport worden geschreven. Dit rapport bevat het aantal geteste monsters, de uitvoering van de validatie, het aantal monsters dat positief/negatief was, wat de verwachting was, de toegestane discrepantie tussen het verwachte resultaat en het daadwerkelijke resultaat en de conclusie en discussie van de validatie.

Nadat het validatierapport is geschreven, moet het voorschrift voor de analisten geschreven worden.



LITERATUURLIJST

1. **Peres NTDA et al.** (2010) *Dermatophytes: host-pathogen interaction and antifungal resistance*. Anais brasileiros de dermatologia; 85(5):657–67.
2. **De Hoog GS.** Atlas of clinical fungi. 2nd ed. Microbiologie AS for, editor. 200AD. p. 22–30.
3. **Bergmans AMC et al.** (2010) *Evaluation of a single-tube real-time PCR for detection and identification of 11 dermatophyte species in clinical material*. Clinical microbiology and infection. Jun;16(6):704–10.
4. **Zorginstituut Nederland;** (2014) Farmaceutisch compas ; *Itraconazol* ; [geraadpleegd 6 mei 2014]
<http://www.farmacotherapeutischkompas.nl/preparaatteksten/i/itraconazol.asp>
5. **Zorginstituut Nederland;** (2014) Farmaceutisch compas [Internet]; *Terbinafine*; [geraadpleegd 6 mei 2014].
[http://www.farmacotherapeutischkompas.nl/preparaatteksten/t/terbinafine \(systemisch\).asp](http://www.farmacotherapeutischkompas.nl/preparaatteksten/t/terbinafine(systemisch).asp)
6. **Banks Mullis K.** (2009) *Polymerase Chain Reaction*. [geraadpleegd 2 januari 2014].
<http://www.karymullis.com/pcr.shtml>
7. **Joshi M et al.** (2010) *Polymerase Chain Reaction: Methods, Principles and Application*; International Journal of Biomedical Research.;pg 81–97.
8. **BielecB.** (2014) *PCR* [geraadpleegd 28 januari 2014].
http://www.btc.org/k12/bft/PCR/pcr_geneticscreening.html
9. **Landt O, Nitsche A;** (2011) *Hybridization Probe Sequences for Use with the LightCycler* ; Molbiol TIB. Roche Molecular Biochemicals Selection. (Lc).
10. **Sigma;** (2014) *Hybridization probes/LightCycler probes*; [geraadpleegd 25 maart 2014].
<http://www.sigmaaldrich.com/life-science/custom-oligos/dna-probes/product-lines/fluorescent-probes/lightcycler-probes.html>
11. **Roche;** (2014) *MagNA Pure LC 2.0*; [geraadpleegd 4 april 2014].
<http://lifescience.roche.com/shop/products/magna-pure-lc-20-instrument#tab-3>
12. **Nfstc science serving justice;** (2005) *Qia-Amp DNA Micro Kit*; DNA analyst training. [geraadpleegd 20 maart 2014].
http://www.nfstc.org/pdi/Subject03/pdi_s03_m04_02_a.htm
13. **Etcheverría AI, Padola NL, Stec K;** (2013) *Factors involved in virulence and cattle colonization Shiga toxin-producing Escherichia coli.*; Virulence; 4(5):366–72.

14. **Preußel K, Höhle M, Stark K, Werber D.**; (2013) *Shiga toxin-producing Escherichia coli O157 is more likely to lead to hospitalization and death than non-O157 serogroups--except O104*. PloS one; 8(11):e78180.
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3828326&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
15. **Manual M.**(2010)*Hemorragische colitis*. Merck sharp & Dohme corp. [geraadpleegd 22 maart 2014]. <http://www.merckmanual.nl/mmhenl/sec09/ch122/ch122b.html>
16. **Paton JC, Paton a W.** (1998) *Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing Escherichia coli infections*. Clinical microbiology reviews ; Jul;11(3):450–79.
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=88891&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
17. **March SB, Ratnam S.** (1986) *Sorbitol-MacConkey Medium for Detection of Escherichia coli O157 : H7 Associated with Hemorrhagic Colitis*. Journal of clinical Microbiology;23(5): 869–72.
18. **Rosner BM, Werber D, Höhle M, Stark K.** (2013) *Clinical aspects and self-reported symptoms of sequelae of Yersinia enterocolitica infections in a population-based study, Germany 2009-2010*. BMC infectious diseases ;13:236.
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3669037&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
19. **Sabina Y, Rahman A, Ray RC, Montet D.** (2011)*Yersinia enterocolitica: Mode of Transmission, Molecular Insights of Virulence, and Pathogenesis of Infection.*; Journal of pathogens. 2011:429069.
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3335483&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
20. **Hardy D.** (2014) *CIN agar* ; Hardy diagnostics. [geraadpleegd 10 maart 2014];
https://catalog.hardydiagnostics.com/cp_prod/Content/hugo/CINAgar.htm
21. **Schuurman T. et al.**(2013) *Emergence of Escherichia coli encoding Shiga toxin 2f in human Shiga toxin-producing E. coli (STEC) infections in the Netherlands, January 2008 to December 2011*; Euroserveillance; 2013-03-08; 26-32
22. **Schuurman T. et al.**(2007) *Evaluation of 5'-nuclease and hybridization probe assays for the detection of shiga toxin-producing Escherichia coli in human stools*; Journal of Microbiological Methods; 70 (3), 406–415
23. **Wannet W. et al.**(2007) *Detection of Pathogenic Yersinia enterocolitica by a Rapid and Sensitive Duplex PCR assay*; Journal for Clinical Microbiology; p.4483-4486
24. **Scholts R.**(2008) Validatierapport *Detectie van Yersinia enterocolitica in feces m.b.v. real-time PCR*. Laboratorium voor Infectieziekten.
25. **Scholts M.C. et al.**(2008) *Development and Validation of a Real-Time PCR assay for Detection of Yersinia enterocolitica as Part of a Dutch study on the Epidemiology of Gastro-Enteritis*. NVMM voorjaarsvergadering; Poster 22.



BIJLAGEN

Bijlage 1 Voorschrift MPLC

Bijlage 2 Voorschrift DNA-isolatie van gekweekte schimmelstammen

Bijlage 3 Pipetteerschema dermatofyten PPM

Bijlage 4 IC-Combi en SBPP

Bijlage 5 STEC PCR

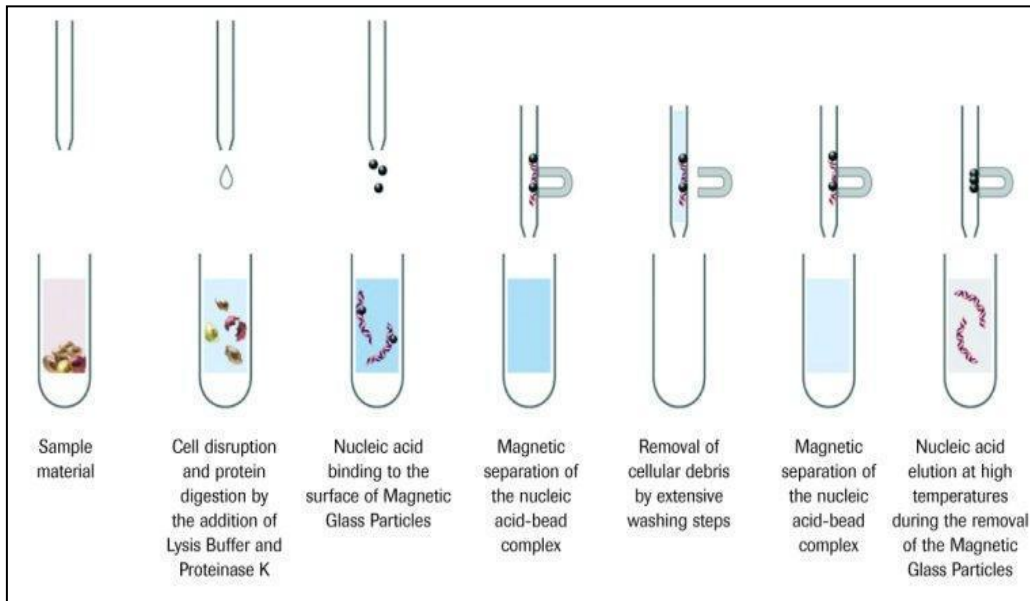
Bijlage 6 *Yersinia enterocolitica* PCR

Bijlage 7 Feces opwerking m.b.v. MPLC

BIJLAGE 1 VOORSCHRIFT MPLC

1.1 PRINCIPE

De monsters worden opgelost en tegelijkertijd gestabiliseerd d.m.v. incubatie met een geoptimaliseerde buffer, welke denaturerende stoffen en proteïnase K bevat. Na toevoeging van Magnetic Glass Particles (MGPs) hechten de vrijgekomen totale nucleïnezuren aan het oppervlak van de MGPs. Niet-gebonden substanties worden verwijderd d.m.v. enkele wasstappen. Uiteindelijk worden de gezuiverde nucleïnezuren geëluëerd met een laag-zout buffer.



Afbeelding 23:
Principe van
DNA opwerking
met de Magna
Pure LC. (11)

1.2 UITVOERING: DNA EXTRACTIE DERMATOFYTEN UITVOERING DEEL 1

1. Voeg 20 µl proteïnase K toe aan alle monsters (behalve NOC)
2. Voeg 32 µl DTT toe aan alle monsters (behalve NOC)
3. Vortex elk monster 10 seconden
4. Incubeer alle monsters overnacht bij 55°C in het hitteblok

1.3 UITVOERING DEEL 2

1. Centrifugeer de monsters 10 sec. (short)
2. Pipetteer 50 µl SBPP-mix in Sample cartridge
3. Pipetteer de O/N gelyseerde monsters (= +/- 400 µl) over in Sample cartridge
4. Monsters zijn nu klaar voor de MPLC opwerking
5. Volg het bedieningsvoorschrift MagNA Pure LC
6. Druk bij Protocol op “.”, selecteer “” en druk op “OK” Total NA HP en protocol: Total NA HS 500 BLK
7. Druk bij Sample Volume veld op “▼” selecteer “500 µl” en druk op “OK”
8. Druk bij Elution Volume veld op “▼” selecteer “50 µl” en druk op “OK”
9. Monsters zijn nu klaar voor opwerking in MagNA Pure LC
10. Wanneer de run klaar is verschijnt een scherm: **result screen**

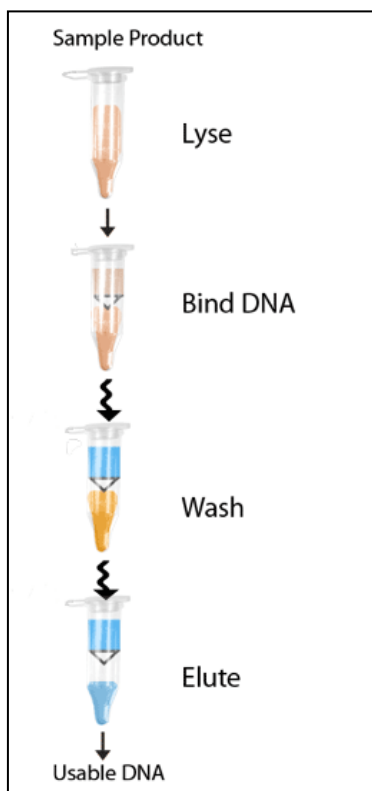


BIJLAGE 2 VOORSCHRIFT DNA-ISOLATIE VAN GEKWEekte SCHIMMELSTAMMEN

Voor deze manier van opwerken wordt de QIA-Amp DNA mini-KIT van QIAGEN gebruikt.

2.1 PRINCIPE

Hierbij wordt een stukje de gekweekte schimmelstammen gelyseerd in eerste instantie alleen m.b.v. Prot K een tweede optie, voor bijvoorbeeld grote stukken of voor wanneer alleen Prot K niets oplevert, is lysatie met prot K, silica en micropestles. Hierdoor komt het DNA vrij. Vervolgens worden de stammen op een QiaAmp-kolommetje gepipetteerd waaraan het DNA bindt. M.b.v. verschillende wasbuffers kan het DNA gezuiverd worden. Vervolgens wordt het gezuiverde DNA van de kolom geëluëerd



Afbeelding 24:

Principe van de opwerkmethode met de QiaAmp DNA mini kit.

De wasstap gebeurt twee keer. Één keer met AW1 buffer en één keer met AW2 buffer(12).

2.2 UITVOERING

1. Zet het hitteblok op 55 °C
2. Pipetteer 270 µl ATL-buffer in een flatcap-epje
3. Neem het epje mee naar de flowkast van de schimmelafdeling. Trek de laboratoriumjas van de schimmelafdeling aan en snij met een wegwerp-ôse/wegwerpscalpel ca. 0,25-0,5 cm² schimmel kapot (Geen agar meesnijden)
4. Doe de schimmel in het epje
5. Trek de laboratoriumjas uit ga terug naar **ruimte III**
6. Druk zoveel mogelijk de grote stukken schimmel kapot met een pipetpunt
7. Voeg 30 µl proteinase K toe
8. Vortex 15 seconden
9. Incubeer 10 minuten bij 55 °C (tussen door 2 x vortexen)
10. Stel hitteblok in op 70°C

11. Centrifugeer kort (10 sec)
12. Voeg aan alle monsters 300 µl AL-buffer toe
13. Vortex 15 seconden
14. Incubeer 10-30 minuten bij 70°C
15. Centrifugeer kort (10 sec)
16. Voeg 10 µl IC-combi toe
17. Voeg aan elk monster 300 µl ethanol absoluut toe
18. Vortex 15 seconden
19. Centrifugeer kort (10 sec) om celdebris neer te slaan
20. Zet een QiaAmp kolom met collection tube klaar en breng 500µl van het lysaat (zonder celdebris) op de kolom. Zorg ervoor dat de rand van de kolom niet nat wordt
21. Centrifugeer 1 min bij 13.000 rpm
22. Breng het resterende lysaat op de kolom en centrifugeer 1 minuut bij 13.000 rpm
23. Plaats de kolom op een nieuwe collectiontube en check of er geen buffer aan de kolom hangt
24. Gooi oude collectiontube met filtraat weg
25. Pipetteer 500 µl AW1 buffer op de kolom
26. Centrifugeer 1 min bij 13.000 rpm
27. Plaats de kolom in een nieuwe collectiontube en gooi oude met filtraat weg
28. Pipetteer 500 µl AW2 buffer op de kolom
29. Centrifugeer 2 minuten bij 13.000 rpm
30. Check of er geen buffer aan de kolom hangt; anders even afnemen met een tissue
31. Plaats de kolom op een DNase vrij collectiontube
32. Pipetteer 100 µl AE buffer op de kolom en laat 5 minuten bij kamertemperatuur staan
33. Centrifugeer 1 minuut bij 13.000 rpm
34. Pipetteer het eluaat over in een DNase-vrij schroefdopepje.
35. Plak de sticker met monstergegevens op het epje
36. Zet van het DNA een dermatofyten PCR in



BIJLAGE 3 DEFINITIEF PIPETTEERSHEMA DERMATOFYTEN PPM

TABEL 14: PIPETTEERSHEMA PPM DERMATOFYTEN EN INTERNE CONTROLE

LC primer probe PCR mix (1x)	Merk	Bewaar-temperatuur (°C)	Per monster (µl)	Per 600 monsters (µl)	Eindconcentratie
Water	Roche	k.t.	0.04	192	
DERMF3 (50µM)	Isogen	-20	0.12	72	300 nM
DERMR2 (50µM)	Isogen	-20	0.6	240	1500 nM
Probe TruviSnw2 (50 µM)	TIB-MOLBIOL	-20	0.15	90	375 nM
Probe Truvi1A (50 µM)	TIB-MOLBIOL	-20	0.15	90	375 nM
Probe Tinmeto1S (50 µM)	TIB-MOLBIOL	-20	0.1	90	250 nM
Probe Tinmet3A (50 µM)	TIB-MOLBIOL	-20	0.1	90	250 nM
Probe Tveerco1S (50µM)	TIB-MOLBIOL	-20	0.20	90	500 nM
Probe Tveerco1A (50µM)	TIB-MOLBIOL	-20	0.20	90	500 nM
Probe Mcaau1S (50 µM)	TIB-MOLBIOL	-20	0.15	90	375 nM
Probe Mcaau1A (50 µM)	TIB-MOLBIOL	-20	0.15	90	375 nM
Probe Efl4S (50µM)	TIB-MOLBIOL	-20	0.15	90	375 nM
Probe Efl1A (50µM)	TIB-MOLBIOL	-20	0.15	90	375 nM
PhHVF1 (50µM)	TIB-MOLBIOL	-20	0.06	36	150 nM
PhHVR1-610 (50 µM)	TIB-MOLBIOL	2-8	0.16	96	400 nM
PhHVP2-FL (50µM)	TIB-MOLBIOL	2-8	0.02	12	50 nM
Totaal mix			2.5	1500	

BIJLAGE 4 IC-COMBI EN SBPP

Ruimte II A

Bereiden van **PhHV 1/50** en **PDV 1/10**:

Actie	Product	Merk	Hoeveelheid(μl)
Maak eerst PhHV 1/50 verdunning: pipetteer in DNA-se vrij epje	1 x TE		198
Voeg toe	PhHV-1 stockoplossing		2
Vortex goed			
Maak als tweede PDV 1/10 verdunning: pipetteer in DNA-se vrij epje	1 x AE pH 8		180
Pipetteer in DNase vrije buis	PDV stockoplossing		20

Maak in ruimte II A de IC –combi mix:

Actie	Product	Merk	Hoeveelheid (μl)
Voeg samen in semen potje	PhHV 1/50		100
	PDV 1/10		200
	TE buffer		19700
Vortex goed			
Test nieuwe IC-combi met 3 NOC's in para en noro PCR alvorens deze wordt uitgevuld.			
Plak op de epjes de bijbehorende sticker IC – Combi en noteer paraaf + houdbaarheidsdatum	Bewaar de epjes bij -80 °C(diepvries ruimte) en pak elke dag een nieuw epje Noteer op lotnummerregistratie formulier dat nieuwe IC-combi goedgekeurd is met aanmaakdatum+houdbaarheidsdatum.		

Maak In ruimte II SBPP mix voor 1000 monsters:

Actie	Product	Merk	Hoeveelheid (μl)
Voeg samen in BD Falcon buis 15 ml (blauwe dop)	S.T.A.R. buffer	Roche	16250
	BSA	NEW ENGLAND BioLabs	3750
	IC- combi	(PhHV 1/5000 en PDV 1/1000)	5000
Test SBPP-mix met 3 NOC's in derm PCR alvorens deze wordt uitgevuld.			
Plak op de epjes de bijbehorende sticker SBPP en noteer paraaf + houdbaarheidsdatum	Bewaar de epjes bij -80 °C(diepvriesruimte) en pak elke dag een nieuw epje. Noteer op lotnummerregistratie formulier dat nieuwe SBPP-mix goedgekeurd is met aanmaakdatum+houdbaarheidsdatum.		



BIJLAGE 5 STEC PCR

Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) is een zeer diverse groep micro- organismen uit de *Enterobacteriaceae* die verschillende vormen van gastro-intestinale infecties kan veroorzaken. De naam STEC verwijst naar *E.coli*'s die Shiga-toxinen type 1 (stx1), type 2 (stx2) of beide kunnen produceren(13).

De ziektebeelden van STEC lopen erg uiteen(14). Ze kunnen variëren van onschuldige diarree tot hemorragische colitis en het hemorragisch uremisch syndroom(HUS). Bij hemorragische colitis wordt de dikke darm aangetast door toxinen die afkomstig zijn van de bacterie waardoor er bloederige diaree en soms andere ernstige complicaties kunnen ontstaan zoals HUS (15).

Dit wordt ook door de Shiga-toxinen veroorzaakt. Ze tasten in dit geval de wand van de bloedvaten aan. Bij HUS treedt er ernstig nierfalen op door intravasale stollingen in en rond de nieren. Daarnaast komen massale hemolyse en trombocytopenie vaak voor. De meeste patiënten met HUS (meestal jonge kinderen, ouderen of immuungecompromitteerde patiënten) zijn genoodzaakt een nierdialyse te ondergaan. HUS kan genezen maar er is kans op blijvende schade aan de nieren.

Uitbraken

Niet alleen om het ziektebeeld is STEC een gevreesde bacteriegroep. Er zijn namelijk grote STEC uitbraken bekend. Een voorbeeld van een grote uitbraak met STEC was de uitbraak in Duitsland in mei 2011. Hierbij werden tientallen mensen ziek door het eten van slecht gewassen groenten. Enkele patiënten ontwikkelden zelfs HUS.

Uitbraken worden vaak in verband gebracht met het consumeren van gecontamineerde melk, vlees en zuivelproducten specifiek, van rundvlees. Echter zijn er ook uitbraken bekend die veroorzaakt zijn door het drinken van gecontamineerd water of ongepasteuriseerd appelsap, het eten van ongewassen groenten die met runderfeces zijn bemest of direct contact met de dieren of de feces(16). Het vlees wordt vaak tijdens de slacht van het vee besmet met STEC. Wanneer de consument het vlees daarna niet goed bereidt, kan deze een STEC infectie oplopen. Een belangrijk kenmerk van STEC is echter dat deze niet erg gevoelig is voor hitte. Het is dus van belang dat het gecontamineerde voedsel echt goed wordt verhit om een infectie te voorkomen.

Virulentiefactoren

De hoofdzakelijke virulentiefactor van STEC is het produceren van Shiga-toxinen welke gecodeerd zijn op de stx1 en stx2 genen. Shiga-toxinen vallen onder de AB5 eiwit toxinen welke een enzymatische A subunit en een 5B subunit bevatten. De 5B subunit van het toxine zorgt voor de binding aan bepaalde cellulaire receptoren (Gb3 receptoren) welke aanwezig zijn in organen als nieren, hersenen en pancreas. Wanneer het toxine bindt aan zijn receptor wordt er een cascade op gang gebracht waardoor uiteindelijk de eiwit synthese in het cytosol van de cel wordt geremd.

Beide Shiga-toxinen hebben verschillende varianten maar stx2 heeft er de meeste. Stx1 heeft de varianten 1C en 1D en stx2 heeft de varianten 2C, 2D, 2E, 2F en 2G(16).

Diagnostiek

De diagnostiek van STEC geeft op verschillende vlakken moeilijkheden. Aan het begin van de infectie zijn er over het algemeen erg veel STEC aanwezig in de feces van de patiënt. In veel gevallen bestaat de aerobe fecale flora op dat moment voor 90% uit STEC. Maar naarmate de ziekte vordert loopt dit aantal snel terug.

Bij patiënten die HUS ontwikkelen verschijnen de klinische symptomen gemiddeld een week na de start van de infectie. Rond deze tijd is het aantal bacteriën in de darmen van de patiënt sterk gedaald of helemaal verdwenen door de langdurige diaree. In sommige gevallen heeft de patiënt bij het intreden van HUS geen diaree meer(14).

Mede hierdoor wordt er niet altijd gelijk aan STEC gedacht. Daarnaast worden de ziektebeelden van STEC vaak verward met ziektebeelden als blindedarmonsteking, inflammatoire darmziekten of een *Clostridium difficile* infectie.

Snelle diagnose van STEC is daarom erg belangrijk om zo zware en dure chirurgische ingrepen en onnodig onderzoek te voorkomen en om gelijk de juiste behandeling te kunnen geven(16).

De diagnostiek van STEC infecties gebeurde bij de Stichting Medische Microbiologie aan de hand van een selectiemedium, de zogenoemde SMAC (SorbitolMcConkey) agar. Deze McConkey agar bevat sorbitol in plaats van lactose. STEC kan in tegenstelling tot andere *E.coli*'s sorbitol fermenteren(17). Zo werd er door middel van de SMAC agar onderscheid gemaakt tussen STEC typen en andere *E.coli* subspecies. Het nadeel van deze methode is dat het veel tijd en arbeid vergt en dat de agar specifiek is voor maar één subtype, namelijk STEC-O:157. STEC-non-O:157 wordt hiermee dus niet gevonden.

Om deze redenen is er een multiplex real-time PCR ontwikkeld voor de stx-genen die typerend zijn voor een STEC, namelijk: vero(cyto)toxine-1 (stx1), varianten van stx1 (stx1c, stx1d), vero(cyto)toxine-2 (stx2) en varianten van vero(cyto)toxine-2 (stx2c, stx2d, stx2e en stx2f)(21,22). Door deze PCR is de diagnostiek van STEC sterk verbeterd. De PCR is namelijk gevoeliger dan de kweek en ook de uitslag is eerder bekend.

5.1 DOEL

Het doel van dit onderzoek is een beperkte validatie en implementatie van de STEC PCR binnen de Stichting Medische Microbiologie. De PCR is namelijk al uitgebreid gevalideerd door "Schuurman et al."(LvI)(21,22) Door het toevoegen van de STEC PCR in de routine zal de detectie en determinatie van de STEC veel sneller en gevoeliger zijn dan de tot nu toe gebruikte kweek.



5.2 MATERIAAL EN METHODE

Om het doel te kunnen behalen werden er verschillende experimenten uitgevoerd. De eerste experimenten zullen uitgebreid beschreven worden om de methode duidelijk te maken. De verdere testen zullen daarna minder gedetailleerd behandeld worden.

Allereerst werd er DNA geïsoleerd van verschillende ingevroren STEC stammen. Deze stammen waren eerder uit Breda verkregen. Na de DNA isolatie werden er verschillende testen met de STEC stammen uitgevoerd. Er werd onder andere de onderste detectiegrens van de PCR mee bepaald. Daarna werd de PCR verder gevalideerd met verschillende klinische en gespikete monsters om uiteindelijk de selectiviteit en sensitiviteit van de STEC PCR te kunnen bepalen.

De STEC PCR werd al routinematig uitgevoerd in het Amphia ziekenhuis Breda. Omdat de afdeling Medische Microbiologie van het Amphia samenwerkt met de Stichting Medische Microbiologie zijn er verschillende materialen en protocollen van hen overgenomen.

DNA isolatie STEC stammen

Voor het opwerken van STEC DNA werd de QIA-Amp DNA mini-KIT gebruikt. Als ingangsmateriaal werden er vijf kolonies van de betreffende stam gelyseerd in proteinase K. De stammen die gebruikt werden voor het valideren van de STEC PCR zijn:

1. O:104 (Stam S)
2. *E.coli* O:104 (Stam E)
3. 11M049861¹ (Stam 61¹)
4. 11M049861² (Stam 61²)
5. 11M047697 (Stam 97)
6. Stx 1C
7. Stx 1D
8. Stx 2C
9. Stx 2D
10. Stx 2E
11. Stx 2F

De STEC stammen 1 t/m 5 zijn klinische isolaten, waarbij van het nummer 11M049861 twee verschillende stammen zijn geïsoleerd en de nummers 6 t/m 11 staan voor referentie STEC stammen.

De PCR

De basismix voor één monster van de STEC PCR had een eindvolume van 20µl. Deze bestond uit 12.5 µl Taqman fast Universal PCR Master Mix (2x) (deze mix bevatte een buffer, nucleotiden en het enzym Taq polymerase), 1µl BSA en 1 µl PPM (Voor het pipetteerschema voor de PPM zie tabel 16). De rest van het volume werd aangevuld met water. Aan deze 20µl mix werd 5 µl DNA uit een stam of feces toegevoegd.

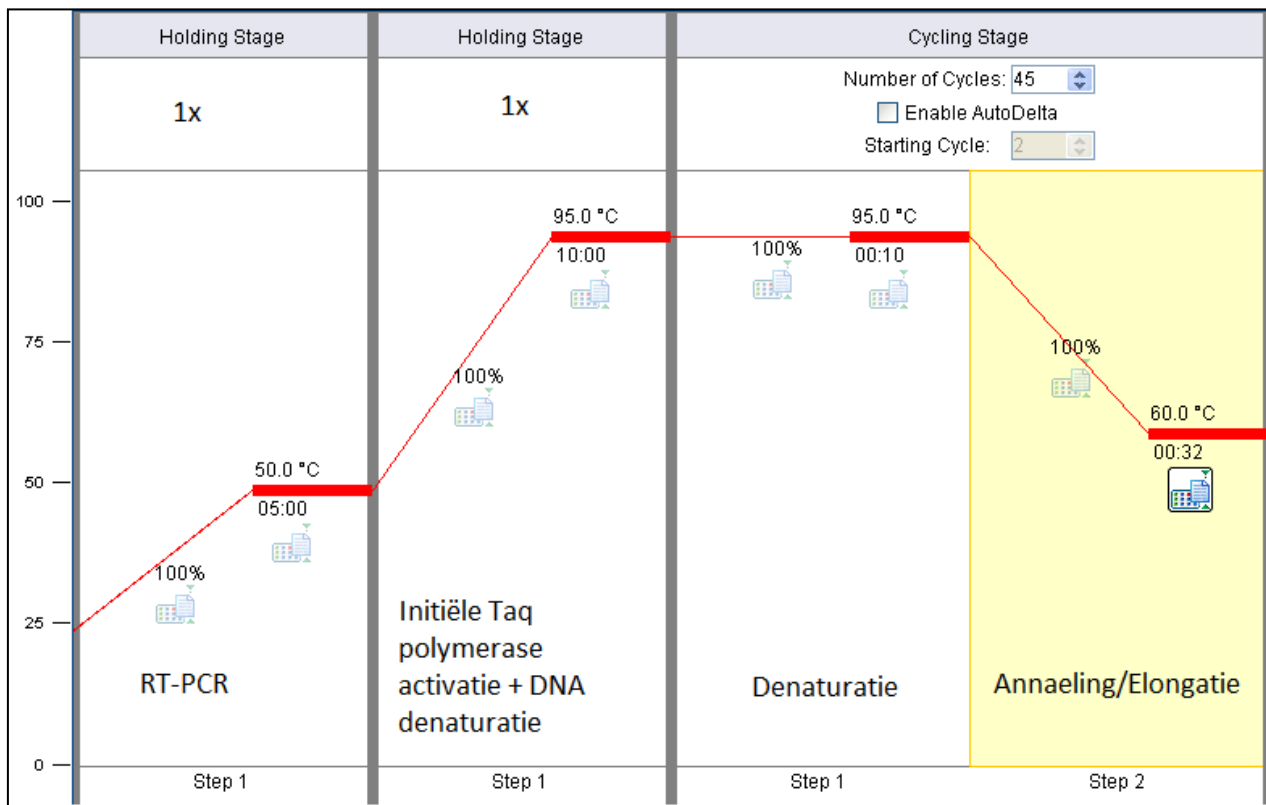
Ook bij deze PCR werd er elke keer een PPC (Positieve PCR Controle) en een NOC (Negatieve Opwerk Controle) meegenomen. De PPC werd gemaakt door DNA van een STEC stam te verdunnen naar 6.25pg/5µl. Dit is als volgt gedaan:

Stockoplossing 1ng/µl	= 5000 pg / 5 µl
Pipetteer 2 µl DNA (5000 pg/5 µl) bij 18 µl TE	= 500 pg / 5 µl
Pipetteer 20 µl DNA (500 pg/5 µl) bij 180 µl TE	= 50 pg / 5 µl
Pipetteer 200 µl DNA (50 pg/5 µl) bij 1400 µl TE	= 6.25 pg / 5 µl

De PPC werd vervolgens getest om te controleren of de Ct-waarde ervan rond de 32 is. Wanneer dit het geval was werd de PPC goedgekeurd.

Het runprotocol dat werd gebruikt voor de STEC PCR staat weergegeven in afbeelding 25. Deze afbeelding laat één cyclus zien van de Real-Time PCR. Allereerst de reverse transcriptase (RT) stap bij 55°C. Deze is nodig voor de RT-PCR voor alle RNA targets die in de zelfde PCR plaat als STEC wordt uitgevoerd (zoals Norovirus, Humaan Parecho virus etc.). Tijdens deze stap wordt namelijk al het RNA door het enzym reverse transcriptase omgezet in DNA. Een RT-PCR heeft op DNA targets geen invloed. De RT-PCR wordt gevolgd door de initiële activatie van het enzym Taq polymerase en denaturatie van het DNA bij 95°C en daarna 45 cycli van; 10 sec. denaturatie (95°C) en 32 sec annealing/elongatie (60°C). Een complete run duurt ongeveer 78 minuten.

De STEC PCR werkt met Taqman probes. Het principe hiervan staat beschreven op pagina 5 van dit verslag. Het Real-Time PCR apparaat dat wordt gebruikt is de Applied Biosystems 7500 (geen Fast systeem).



Afbeelding 25: Fast runprotocol feces PCR. Deze afbeelding laat één van de veertig cycli zien voor de STEC PCR. De eerste stap is de RT-PCR stap bij 50°C. Deze stap wordt maar één keer gedaan. Hierna volgt de initiële activatie van het enzym Taq polymerase en denaturatie van het DNA (eenmalig). De laatste fase bestaat uit 45 cycli van eerst 10 sec. denaturatie gevolgd door 32 sec. annealing/elongatie.

De primers en probes die worden gebruikt voor de STEC PCR staan weergegeven in tabel 15. Daaronder in tabel 16 staat het pipetteerschema voor de PPM van STEC PCR weergegeven.



TABEL 15: PRIMERS EN PROBES STEC PCR

stx1F934-mod	TGG CAT TAA TAC TGA ATT GTC ATC ATC
stx1F934F-mod1d	TGG CAT TAA TAT TAA ATT GCC ATC AT
stx1R1042-G	GCG TAA TCC CAC GGA CTC TTC
stx1R1042-modC	GCG TAA TCC CAC GCA CTC TT
stx1R1042-mod1d	GAG TAA TCC CAC GCC CAC TTC
stx2F	CCG GAA TGC AAA TCA GTC GT
stx2F-mod2f	GGA ACG TAC AGG GAT GCA GAT T
stx2R-G	ACC ACT GAA CTC CAT TAA CGC C
stx2R-A	TAC CAC TAA ACT CCA TTA ACG CCA
stx2R-mod2f	CGT CCT CTG AAC TCC ATT AAA TCC
stx1P990-mod-FAM	FAM-TTC CTT CTA TGT GTC CGG CAG-NFQMGB
stx1P990-mod1c-FAM	FAM-CCT TCT ATG TGC CCG GTA G-NFQMGB
stx1P990-mod1d-FAM	FAM-TCC TTC TAT GTG CCC GAC AG-NFQMGB
stx2P-FAM	FAM-ACT CAC TGG TTT CAT CAT A-NFQMGB
stx2P-mod2f-FAM	FAM-ATG AAC CAA CCA GTG AAT-NFQMGB

TABEL 16: PIPETTEERSHEMA STEC PPM

Primer/probe	Stockconc.	Hoeveelheid (µl)	Conc. in PPM (pmol/ul)
stx1F934-mod	1 nmol/µl	7,5	7,5
stx1F934F-mod1d	1 nmol/µl	7,5	7,5
stx1R1042-G	1 nmol/µl	3,75	3,75
stx1R1042-modC	1 nmol/µl	3,75	3,75
stx1R1042-mod1d	1 nmol/µl	7,5	7,5
stx1P990mo-FAM (MGB)	100 pmol/µl	25	2,5
stx1P990mo1c-FAM (MGB)	100 pmol/µl	25	2,5
stx1P990mo1d-FAM (MGB)	100 pmol/µl	25	2,5
stx2F	1 nmol/µl	7,5	7,5
stx2F-mod2f	1 nmol/µl	7,5	7,5
stx2R-G	1 nmol/µl	3,75	3,75
stx2R-A	1 nmol/µl	3,75	3,75
stx2R-mod2f	1 nmol/µl	7,5	7,5
stx2P-FAM (MGB)	100 pmol/µl	25	2,5
stx2Pmo2f-FAM (MGB)	100 pmol/µl	25	2,5
PhHV-267s	1 nmol/µl	7,5	7,5
PhHV-337as	1 nmol/µl	7,5	7,5
PhHV1-MGB-NED	100 pmol/µl	25	2,5
TE		775	
Totaal		1000	

In de eerste PCR zijn van de twee opgewerkte stammen, stam 1C en 2C, verdunningsreeksen getest om de optimale testconcentratie te bepalen. De verdunningen die hiervoor gebruikt werden zijn 1 ng/µl, 10 pg/µl, 100 fg/µl en 1 fg/µl.

Na deze PCR werden alle monsters getest met nieuwe PPM gemaakt volgens tabel 16. Als monster werden er twee verdunningen van stam 2C gebruikt. De verdunningen waren als volgt:

Stam 2C 10 pg/ μ l wordt $\frac{1}{4}$ verdund:

- 178 μ l (10 pg/ μ l) + 534 μ l (TE) = verdunning 1

Verdunning 1 wordt nog een keer $\frac{1}{2}$ doorverdund.

- 15 μ l (verdunning 1) + 15 μ l (TE) = verdunning 2

Deze twee verdunningen werden getest met de PPM uit het Amphia ziekenhuis en de nieuwe PPM die door de Stichting Medische Microbiologie (MMB) is gemaakt.

De validatie

Ter validatie van de STEC PCR werden er verschillende testen uitgevoerd. Allereerst werd er een verdunningsreeks gemaakt van bekende STEC stammen om de onderste detectiegrens ofwel de Limit of Detection (LOD) van de PCR te bepalen. Daarna zijn er negatieve fecesmonsters gespiked met verschillende concentraties DNA van de bekende STEC stammen om te bepalen of de componenten uit de feces invloed hebben op de PCR. Verder zijn er nog STEC-positieve klinische monsters getest. En als laatste een aantal kwaliteits-rondzendings (QCMD) monsters.

1. Verdunningsreeksen

Van de stammen STEC O:104, 1D, 2D, 2E en 2F werd vanuit 10 pg/ μ l een verdunningsreeks gemaakt van 1000, 100, 10 fg/ μ l en 1 fg/ μ l in TE.

Één bacteriegenoom (het DNA van één bacteriecel) weegt 5 fg ($5 \cdot 10^{-15}$ gram). Er gaat 5 μ l van de verdunning in een PCR reactie wat betekent dat:

1000 fg/ μ l komt overeen met 1000 bacteriecellen/reactie

100 fg/ μ l komt overeen met 100 bacteriecellen/reactie

10 fg/ μ l komt overeen met 10 bacteriecellen/reactie

1 fg/ μ l komt overeen met 1 bacteriecel/reactie

2. Feces spiken

In deze test werden er verschillende negatieve fecessupernatanten (zie bijlage 7, stap 4) uit de routine gespiked met bacteriesuspensies van de bekende STEC stammen uit Breda. De gekweekte stammen worden opgelost in Fysiologisch zout (FZ) tot een McFarland van 0,5. Een dichtheid van 0,5 McFarland (McF) komt overeen met ca. $1 \cdot 10^8$ CFU/mL. Vanuit die suspensie worden de monsters doorverdund naar de gewenste concentratie voor in de PCR.

Voor stam STEC O:104, 1D en 2C geldt:

Spike 1: 1/12.5 van 0,5 McF = $8 \cdot 10^3$ CFU/ μ l

Hiervan gaat 10 μ l bij 200 μ l feces supernatant (zie bijlage 7.7 Voorschrift opwerken Feces mb.v. MPLC) als input van de extractie, dus 80.000 CFU in de extractie. Er bevindt zich dus ook 80.000 CFU in het eluaat (100 μ l). Van het eluaat gaat 5 μ l in de PCR, dit is 5/100 van 80.000 CFU's en geeft dus 4000 CFU's/PCR reactie.

Spike 2: Wordt verder doorverdund vanuit spike 1 naar 1000 CFU/reactie.

De spikes voor stam 2D, 2E en 2F worden op dezelfde manier gemaakt als spike 1 en 2, alleen worden deze wat verder doorverdund. Naar eindconcentraties van 1000 CFU/reactie en 250 CFU/reactie.



Er moest 500 µl gespiked supernatant gemaakt worden (waarvan een deel in MMB in een deel in Amphia werd opgewerkt):

$10 \mu\text{l spike} / 200 \mu\text{l sup.} = 25 \mu\text{l spike} / 500 \mu\text{l sup.}$

Elk supernatant van 500 µl werd gespiked met 25 µl spike.

Van het 500 µl gespikete supernatant wordt 150 µl opgestuurd naar Breda. Daar worden deze monster ook getest om later Ct-waarden te kunnen vergelijken.

3. *STEC positieve klinische monsters*

Er werden meerdere klinische fecesmonsters getest uit verschillende laboratoria (tabel 22). En uit het Amphia ziekenhuis in Breda een aantal positieve supernatanten. Uit het Laboratorium voor Infectieziekten (LVI) in Groningen zijn positieve fecesmonsters en/of DNA monsters gekomen. De fecesmonsters waren in Groningen overnacht verrijkt in seleniet medium en waren gesuspendeerd in L6 buffer. Deze monsters werden in MMB $\frac{1}{4}$ verdund in STAR buffer omdat STAR de buffer is waarmee de feces-opwerking in MMB is gevalideerd. Er is niet bekend wat voor invloed L6 buffer heeft op de opwerking.

4. *QCMD monsters*

QCMD staat voor Quality Control for Molecular Diagnostics. Deze organisatie controleert de kwaliteit van de moleculaire diagnostiek van wel 2000 instellingen in 100 verschillende landen. De kwaliteit van een moleculair lab wordt gecontroleerd door verschillende monsters die door de QCMD worden rondgestuurd. Dit zijn nagebootste klinische monsters en bevatten bepaalde hoeveelheden van een micro-organisme of zijn negatief. Alle deelnemende laboratoria testen de monsters zoals ze elk routinemonster zouden testen en sturen de uitslagen terug. De QCMD stuurt vervolgens een rapport met de scores van het betreffende laboratorium, ook ten opzichte van de andere deelnemende laboratoria.

De QCMD monsters die voor de STEC PCR werden getest waren allemaal negatief voor STEC maar positief voor andere bacteriële en parasitaire darmpathogenen (tabel 23). Deze monster werden getest om de specificiteit van de STEC PCR te testen. Er mag namelijk geen interactie zijn van de primers en probes voor STEC met andere darmpathogenen. Dit kan fout positieve resultaten opleveren.

5.3 RESULTATEN

DNA isolatie

Na de DNA isolatie werden de monsters doorgemeten met de GeneQuant om de concentratie van het DNA te bepalen. Het resultaat hiervan is te zien in tabel 17.

TABEL 17: RESULTATEN DNA METING

STEC stam	DNA concentratie (ng/μl)
O:104	105
<i>E.coli</i> O:104	7.5
11M049861 ¹	47
11M049861 ²	80
11M047697	24
Stx 1C	48
Stx 1D	37
Stx 2C	74
Stx 2D	91
Stx 2E	59
Stx 2F	48

De PCR

De verdunningsreeksen van stam 1C en 2C die gemaakt zijn aan de hand van de meet-resultaten uit tabel 17 zijn getest in de eerste PCR. Tabel 18 geeft hiervan het resultaat weer.

TABEL 18: RESULTATEN STEC PCR VERDUNNINGSREEKS STAM 1C EN 2C, MET PPM UIT AMPHIA

Monster	Ct waarde STEC PCR
1C 1 ng/μl	-
1C 10 pg/μl	-
1C 100 fg/μl	-
2C 1 ng/μl	21.7
2C 10 pg/μl	27.4
2C 100 fg/μl	34.8
NPC	-
NOC	-

Om de STEC PPC van MMB te testen ten opzichte van Amphia, werden DNA verdunningen van 10 pg/μl uit stam 2C. De monsters zullen getest worden bij een nieuwe PPM. De eerste test is namelijk uitgevoerd met kant en klare PPM uit het Amphia Ziekenhuis Breda (tabel 19).

TABEL 19: RESULTATEN VERGELIJKING EIGEN PPM EN PPM UIT AMPHIA

Monster	Ct-waarde
2.5 pg/μl 2C + mix Roosendaal	30.5
" " + mix Breda	30.4
1.25 pg/μl 2C + mix Roosendaal	31.2
" " + mix Breda	31.2
NOC	-
NPC	-

Uit tabel 19 blijkt dat de nieuwe PPM van MMB gelijk presteert als de PPM uit het Amphia ziekenhuis. Verdere testen werden uitgevoerd met de nieuwe PPM van MMB.



Validatie

De resultaten van de verdunningsreeks van de stammen STEC O:104, 1D, 2D, 2E en 2F voor de limit of detection bepaling zijn weergegeven in tabel 20. Alle concentraties van alle STEC-typen werden door de PCR gedetecteerd, behalve 1 fg/μl van de stammen S, 1D en 2E. 1 fg/μl komt overeen met één bacterie genoom/PCR.

TABEL 20: RESULTATEN LIMIT OF DETECTION BEPALING STEC PCR

Monster	C _T STEC	C _T PhHV
S 1000 fg/μl	30,9	36,9
S 100 fg/μl	34,9	35,1
S 10 fg/μl	38,9	35,8
S 1 fg/μl	Undetermined	35,7
1D 1000 fg/μl	31,1	36,6
1D 100 fg/μl	35,7	36,8
1D 10 fg/μl	43,0	Undetermined
1D 1 fg/μl	Undetermined	34,9
2D 1000 fg/μl	30,3	36,9
2D 100 fg/μl	35,1	34,8
2D 10 fg/μl	38,8	36,6
2D 1 fg/μl	36,9	35,8
2E 1000 fg/μl	30,6	Undetermined
2E 100 fg/μl	33,5	34,1
2E 10 fg/μl	37,9	34,9
2E 1 fg/μl	Undetermined	34,8
2F 1000 fg/μl	29,3	Undetermined
2F 100 fg/μl	32,4	35,1
2F 10 fg/μl	35,8	35,9
2F 1 fg/μl	39,4	35,8
NOC	Undetermined	30,7
NPC	Undetermined	Undetermined
PPC	31,1	Undetermined

Feces spiken

In tabel 21 staan de resultaten van de gespikete feces monsters. Deze monsters werden ook in het Amphia ziekenhuis getest om de Ct-waarden van beide PCR's te kunnen vergelijken. De resultaten van het Amphia ziekenhuis staan ook weergegeven in tabel 21. Dit worden de referentie Ct-waarden genoemd. De Δ Ct geeft het verschil in de Ct-waarde van de referentie Ct en Ct die we zelf gevonden hebben.

TABEL 21: RESULTATEN GESPIKETE NEGATIEVE FECES MONSTERS IN STEC PCR, MMB VS. AMPHIA

	Neg. Validatie monsters STEC	Samenstelling	STEC	Ref. Ct STEC	STEC Ct – waarde MMB	Δ Ct	Ct-PhHV
1.	13Z019547	Sup+Spike stam S (4000) ¹	+	28	27,9	-0,1	29,5
2.	13F030473	Sup+Spike stam S (1000)	+	30,3	29,2	-1,1	30,4
3.	13F030451	Sup+Spike stam 1D (4000)	+	25,9	28,3	2,4	30,6
4.	13F030225	Sup+Spike stam 1D (1000)	+	28,9	29,5	0,6	30,6
5.	13Z019342	Sup+Spike stam 2C (4000)	+	26,9	26,5	-0,4	30,2
6.	13F030661	Sup+Spike stam 2C (1000)	+	28,6	29,4	0,8	30,2
7.	13Z019309	Sup+Spike stam 2D (1000)	+	29	30	1	29,9
8.	13Z019537	Sup+Spike stam 2D (250)	+	32,6	33	0,4	31
9.	13Z019548	Sup+Spike stam 2E (1000)	+	29,9	34,7 ² /28,7	-1,2	31,9
10.	13Z019567	Sup+Spike stam 2E (250)	+	31,1	32,4	1,3	30,2
11.	13F030610	Sup+Spike stam 2F (1000)	+	27,5	28,5	1	30,1
12.	13Z019070	Sup+Spike stam 2F (250)	+	30,3	30,9	0,6	30,6

Klinische materialen

In tabel 22 worden de waarden van het referentie lab vergeleken met de Ct-waarden die in Roosendaal zijn gemeten.

TABEL 22: RESULTATEN KLINISCHE MONSTERS IN STEC PCR VERGELEKEN MET AMPHIA EN LVI

	Monster	Samenstelling	STEC	Ref. Ct	STEC Ct – waarde		Δ Ct	Ct PhHV
1.	12M042090 (Amphia)	Sup	+	30	32,7		2,7	30,3
2.	13M074934 (Amphia)	Sup	+	35,9	38,6		2,7	30
3.	13M072967 (Amphia)	Sup	+	20,6	20,9		0,3	30,9
4.	12M500691 (Amphia)	Sup	+	30,4	34,5		4,1	30
5.					Feces	DNA		
6.	13461074 (Lvl)	Verrijkte feces 1/4 verdund/DNA ¹	+	24 ²	20,4		-3,6	29,7
7.	13471305 (Lvl)	Verrijkte feces 1/4 verdund/DNA	+	37	39,8		2,8	39,1
8.	13471722 (Lvl)	Verrijkte feces 1/4 verdund/DNA	+	25	26,4		1,4	30,8
9.	13471727 (Lvl)	Verrijkte feces 1/4 verdund/DNA	+	37		38,9	1,9	30,4
10.	13472189 (Lvl)	Verrijkte feces 1/4 verdund/DNA	+	20/21	19,6		-0,9	31,6

¹ Gespikete feces monsters: 500ul sup + 25ul stam ... (4000/1000/250 CFU/PCR).

² 1e run heel hoog. Na herhaling Ct= 28,7.



	Monsters	Samenstelling	STEC	Ref. Ct	Ct-MMB feces	Ct-MMB DNA	ΔCt	Ct PhHV
11.	13473027 (LvI)	Verrijkte feces 1/4 verdund/DNA	+	23		21,4	-1,6	32,8
12.	13473601 (LvI)	Verrijkte feces 1/4 verdund/DNA	+	37/38		37,3	-0,2	30,9
13.	13474895 (LvI)	Verrijkte feces 1/4 verdund/DNA	+	28	28		0	30,9
14.	13490689 (LvI)	Verrijkte feces 1/4 verdund/DNA	+	34	33,5		-0,5	33,6
15.	13492504 (LvI)	Verrijkte feces 1/4 verdund/DNA	+	32	30,7		-1,3	33,4
16.	13492890 (LvI)	Verrijkte feces 1/4 verdund/DNA	-	40		REM/neg		30,2
17.	13495196 (LvI)	Verrijkte feces 1/4 verdund/DNA	+	24	30,9	21	-3	30,9
18.	13502935 (LvI)	Verrijkte feces 1/4 verdund/DNA	+	26	29,3		3,3	30,6
19.	13503665 (LvI)	Verrijkte feces 1/4 verdund/DNA	+	29		27,7	-1,3	30,6
20.	13504191 (LvI)	Verrijkte feces 1/4 verdund/DNA	+	36	41	REM/neg	5	31

QCMD monsters

De verwachting was dat alle monsters van de QCMD negatief zouden zijn omdat deze geen STEC DNA bevatten. De resultaten van de QCMD monsters staan weergegeven in tabel 23

Monsters	Samenstelling	STEC	Resultaat	Ct PhHV
SSC 1 (QCMD)	Feces Matrix <i>Salmonella</i> (Ct 26,4)	-	neg	32,3
SSC 4 (QCMD)	Feces Matrix <i>Campylobacter</i> (Ct 23,3)	-	neg	31,9
SSC 8 (QCMD)	Feces Matrix <i>Shigella</i> (Ct 20,9)	-	neg	31,7
SSC 10 (QCMD)	Feces Matrix negatief	-		32,1
PARA 1 (QCMD)	Feces Matrix <i>Entamoeba histolytica</i> (Ct 26,3)	-	neg	31,5
PARA 2 (QCMD)	Feces Matrix negatief	-		30,9
PARA 3 (QCMD)	Feces Matrix <i>Cryptosporidium</i> (Ct 28,4)	-	neg	31,1
PARA 8 (QCMD)	Feces Matrix <i>Giardia Lamblia</i> (Ct 24,3)	-	neg	30,6

TABEL 23: RESULTATEN STEC PCR OP QCMD MONSTERS

5.4 CONCLUSIE/DISCUSSIE

Het doel van deze opdracht was het verbeteren en versnellen van de detectie van STEC door middel van het invoeren van de STEC PCR in de routinediagnostiek van de Stichting Medische Microbiologie.

DNA isolatie

De DNA isolatie van de geweepte bacteriestammen is geslaagd. Voor elke stam is er genoeg DNA opbrengt om te kunnen testen.

De PCR

STEC stam 1C bleek negatief in de STEC PCR. De vraag die gesteld kan worden is: "Is deze stam werkelijk een STEC stam?/Heeft deze stam stx genen?" Bij navraag uit Breda blijkt dit een gespikete stam te zijn. In Breda is er een "niet STEC " stam gespiked met stx genen. Op grond daarvan zou dit monster het moeten doen in de PCR. Wat niet het geval is. Ook in Breda werd deze stam niet door de PCR gedetecteerd. Er zal verder uitgezocht moeten worden wat stam 1C voor type is (en of het inderdaad stx 1C genen bevat).

STEC stam 2C wordt wel gedetecteerd. De Ct-waarden laten duidelijk de verdunningsreeks zien. Bij elke 100x verdunning schuift de Ct- waarde 6/7 cycli op zoals verwacht wordt bij een efficiënt lopende PCR

De Ct-waarden van de PCR mix met de PPM van MMB en de PCR mix met de PPM uit Breda bleken nagenoeg gelijk. De PPM van MMB kon gebruikt worden bij de vervolg testen.

De validatie

Detectiegrens

Alle geteste STEC varianten (behalve 1C) werden in de STEC PCR gedetecteerd tot een concentratie van 5-50 fg/PCR. Dat betekent dat wanneer een monster slechts 1 bacteriegenoom per reactie bevat nog positief wordt bevonden. De detectie grens van de STEC PCR ligt dus rond 1-10 fg/ μ l, wat overeenkomt met 1-10 bacteriegenomen per PCR. Ook de interne controle (PhHV) presteerde goed in de PCR en de NOC en de PPC gaven het verwachte PCR resultaat.

Feces spiken

De resultaten in vergelijking met die van Breda (Referentie Ct) nagenoeg gelijk. De gemiddelde Δ Ct is 0,6. Dat betekent dat de Ct's van MMB gemiddeld 0.6 cycli hoger lagen dan die van Amphia met een enkele uitschieter naar boven en naar beneden. Het verschil in Ct-waarde van dezelfde concentratie is te wijten aan het feit dat er niet altijd exact 0,5 McFarland is gebruikt. De waarden liepen uiteen van 0.49 tot 0.53 McFarland. Daarnaast kan het ook komen omdat fecesmonsters in Breda met een andere robot wordt opgewerkt.

Klinische monsters

Uit de resultaten is op te maken dat de Ct-waarden die in MMB zijn verkregen nagenoeg overeen komen met de referentie Ct-waarden. De uitschieters zijn mogelijk te verklaren door de kwaliteit van de monsters. Sommige monsters zijn al wat ouder en zijn meerdere keren ingevroren en ontdooid. Hierdoor kan het DNA kapot gaan. Bij andere monsters ligt de Ct in MMB lager. Dat wil zeggen dat de PCR op die punten gevoeliger is dan de PCR in het referentielab.

QCMD monsters

Alle QCMD monsters waren negatief voor STEC zoals werd verwacht. Dit betekent dat de primers en probes voor de stx genen van STEC geen interactie hebben met de meest voorkomende andere pathogene darmbacteriën of parasieten.



Sensitiviteit en Specificiteit

Ter validatie zijn er verschillende testen uitgevoerd om zo de sensitiviteit en de selectiviteit van de PCR te verifiëren.

De sensitiviteit zegt iets over het percentage vals negatieve resultaten en de selectiviteit zegt iets over het percentage vals positieve resultaten. De percentages zijn te berekenen aan de hand van de volgende formules.

$$\text{Sensitiviteit: } \frac{\text{aantal positief geteste monsters}}{\text{aantal werkelijk positieve monsters}} \times 100\%$$

$$\text{Selectiviteit: } \frac{\text{aantal negatief geteste monsters}}{\text{aantal werkelijk negatieve monsters}} \times 100\%$$

Beide waarden moeten zo dicht mogelijk bij de 100% liggen om de test betrouwbaar te mogen noemen. De waarden van de STEC PCR zijn als volgt.

Aantal positieve monsters STEC: 31 (12 gespikeerde supernatanten + 19 klinische monsters)

Aantal positief geteste monsters: 30

Sensitiviteit STEC: $(30/31) \times 100\% = 96,8\%$

Aantal negatieve monsters: 8

Aantal negatief geteste monsters: 8

Selectiviteit STEC: $(8/8) \times 100\% = 100\%$

De aantallen geteste monsters (vooral de negatieve) zijn de laag om nauwkeurig de sensitiviteit en selectiviteit te bepalen. Echter, het gaat hier om een zeer beperkte validatie (verificatie) van een test die eerder uitgebreid is gevalideerd door "Schuurman et al." (21,22)

Het gemiste positieve monster is te verklaren doordat het monster in het referentielab al een Ct-waarde van 40 had. Deze waarde betekent dat het monster al zwak positief was voordat het werd ontdooid en opnieuw moest worden ingevroren. Door ontdooien en invriezen kan er DNA verloren gaan waardoor de Ct-waarde nog hoger zal worden. Bij een Ct waarde groter dan 40 zonder zichtbare amplificatiecurve wordt het monster als negatief beschouwd. Wanneer er echter wel een amplificatiecurve zichtbaar is mag het monster als zwak positief worden gezien mits de interne controle een Ct-waarde onder de 40 heeft.

De toegestane discrepantie is 5%. Dat betekent dat met deze waarden voor de sensitiviteit en selectiviteit de validatie is goedgekeurd.

Na de validatie werd er een validatierapport geschreven en werden de voorschriften aangepast en aangevuld. Zodra dit was gebeurd kon de PCR daadwerkelijk worden toegevoegd aan de routinediagnostiek van de PCR afdeling van de Stichting Medische Microbiologie.

Op 8 januari 2014 is de STEC PCR in gebruik genomen. Monsters met een bloederige macroscopie zullen op STEC worden getest.

BIJLAGE 6 YERSINIA ENTEROCOLITICA PCR

Yersinia enterocolitica is een bacterie uit de groep *Enterobacteriaceae*. Het is een voedselgerelateerde darmpathogeen welke voornamelijk wordt gevonden in zoogdieren maar incidenteel ook de mens gebruikt als gastheer. *Yersinia enterocolitica* wordt geassocieerd met een breed spectrum aan klinische en immunologische verschijnselen. Een aantal voorbeelden hiervan zijn; enterocolitis, dunne darmontsteking, reumatische artritis, exantheem, ontstekingen aan de lymfeknopen, urine- en luchtweg infecties en endocarditis. Infecties worden vooral veroorzaakt het eten van gecontamineerd of ongaar (varkens)vlees of door het drinken van met dierlijke feces gecontamineerd water(18). Na het innemen van gecontamineerd water of voedsel koloniseert de bacterie de darmwand, met als gevolg diarree, koorts en braken(19).

Yersinia kan echter ook systemische infecties, zoals een sepsis, veroorzaken na het doordringen van de darmwand. Dit komt alleen voor bij de invasieve variant van variant van *Yersinia enterocolitica*.

Virulentie

De virulentie factoren van *Yersinia* liggen voornamelijk op het plasmide pYV. Naast de plasmidale virulentie genen zijn er ook chromosomale genen om volledige virulentie uit te kunnen dragen. Sommige van deze genen zijn beperkt tot pYV-dragende *Yersiniae* terwijl andere juist meer verspreid voorkomen. De *Yersinia* PCR richt zich alleen op de plasmidale genen, daarom zullen alleen deze nog verder worden behandeld.

De genen die zich alleen op het plasmid bevinden zijn(19);

- *inv* gen, welke codeert voor invasine. Dit is een membraan eiwit van het buitenste membraan wat ervoor zorgt dat de bacterie gemakkelijker het darmepitheel kan passeren.
- *ail*. Dit gen codeert voor een ander eiwit in het buitenmembraan dat helpt bij de hechting en invasie van het darmepitheel. Ook zorgt dit eiwit ervoor dat de bacterie resistent wordt voor door complementgereguleerde lysis.
- *ystb*. Het *yst*-gen codeert voor een hitte stabiel enterotoxine. Het uitdragen van dit toxine leidt tot diarree. Ook wordt het toxine in verband gebracht met het veroorzaken van acute yersiniose.
- Als laatste het *myf* gen. Dit gen codeert voor een antigeen op de fimbriae waarvan men denkt dat het betrokken is bij de adhesie.

Diagnostiek

Tot voor kort werd *Y. enterocolitica* gedetecteerd door een selectieve kweek. De agar die hiervoor gebruikt werd is de CIN (Cefsulodin, Irgasan, Novobiocin) agar. Deze agar is specifiek voor *Yersinia* en *Aeromonas* species. Antibiotica in deze agar zorgen ervoor dat bacteriën als *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* en *Klebsiella pneumoniae* niet kunnen groeien. *Yersinia enterocolitica* groeit op de CIN agar als een bleke kolonie met een rood centrum (dit wordt een bullseye genoemd) het rode centrum komt doordat de bacterie het manitol uit de agar kan omzetten. Hierdoor komt er een zuur vrij wat zorgt voor de verkleuring(20).

Naast de kweek worden er ook een aantal biochemische testen uitgevoerd. Er wordt een korte bonte rij ingezet met een ureumbuis, glucosebuis, TSI buis en twee bewegelijkheidbuizen.



Één bij 25°C en één bij 37°C. Een korte bonte rij verdacht voor *Yersinia* zal er als volgt uit moeten zien:

TSI:	Onder geel boven geel
Ureum:	Zwak positief
Glucose:	Positief/geen gas
Beweeglijkheid 25°C:	Beweeglijk
Beweeglijkheid 37°C:	Onbeweeglijk

Wanneer de bacterie op basis hiervan, nog steeds verdacht is moet er een agglutinatietest worden uitgevoerd om het juiste serotype te kunnen bepalen.

Al met al is het detecteren en determineren van *Yersinia enterocolitica* een arbeidsintensieve, tijdrovende en weinig gevoelige methode. Daarom wordt tegenwoordig steeds meer met (real time) PCR gewerkt. Deze methode is sneller en gevoeliger dan de kweek.

De *Yersinia enterocolitica* PCR richt zich op de volgende genen; het *YstB* (*Yersinia* stable toxin B) gen en het *ail* (attachment invasion locus) gen van *Y. enterocolitica*.⁽²³⁾ *Yersinia* stammen met het *ail* gen staan bekend om de mogelijkheid door de darmwand te kunnen dringen (invasief) en zo systemische infecties te veroorzaken.

6.1 DOEL

Het doel van deze opdracht was een beperkte validatie en implementatie van de *Yersinia* PCR binnen de Stichting Medische Microbiologie om zo de detectie van *Yersinia enterocolitica* te versnellen en te verbeteren ten opzichte van de nu gebruikte kweek en agglutinatietest. De PCR is al uitgebreid gevalideerd door het Laboratorium voor Infectieziekten in Groningen. ⁽²⁴⁾

6.2 MATERIAAL EN METHODE

Het valideren in implementeren van de *Yersinia* PCR is op dezelfde manier verlopen als de STEC PCR. De *Yersinia* PCR draaide namelijk ook al in het Amphia ziekenhuis Breda waardoor er weer mogelijkheid was van het overnemen van stammen en protocollen. Omdat het validatieproces van de *Yersinia* PCR sterk lijkt op dat van de STEC, zal deze maar kort behandeld worden.

De stammen die gebruikt zijn voor de validatie zijn:

- *Yersinia enterocolitica*, invriesnummer 187, van 21-2-2002 (RIVM 1A)
- *Yersinia enterocolitica*, invriesnummer 112, type 3
- *Yersinia enterocolitica*, invriesnummer 113, type 8 (1994-I-1D)
- *Yersinia enterocolitica*, invriesnummer 114, type 3 (1997-I-1C)

Het principe van de *Yersinia* PCR is hetzelfde als die van de STEC PCR. Er worden namelijk dezelfde PCR reagentia en concentraties gebruikt. Het enige verschil is de samenstelling van de PPM.

Bereiding en testen *Yersinia* PPM

De primers en probes die gebruikt worden voor de *Yersinia* PCR staan weergegeven in tabel 24. In tabel 25 staat het pipetteerschema voor de Primer Probe Mix. De nieuwe PPM werd getest op 4 bekende *Y. enterocolitica* stammen in een concentratie van 10 pg/μl.

TABEL 24: PRIMERS EN PROBES *YERSINIA ENTEROCOLITICA* PCR

Primer/Probe	Sequentie
ail-F	GGG CCA TCT TTC CGC AT
ail-R1	TGA GCG GCC CCC AGT AA
ail-R2	CCG TGA GCA GCA CCC AGT A
ail-P-FAM-MGB	6-FAM-CAT AAA GGC TAA CAT ATT C-MGB
ystB-F	TAG CCG CTG AGA TAA ACA GAA AAG
ystB-R	CAT CAT TTT CTT CTG AAG GCG A
ystB-P-VIC-MGB	VIC- TGC GAT ACT CAG ACC C-MGB

TABEL 25: PIPETTEERSHEMA PPM *YERSINIA ENTEROCOLITICA*

Primer / Probe	Conc. Stockoplossing (nmol/μl)	Concentratie PPM (pmol/ 25μl reactie)	Hoeveelheid in PPM (μl)
ail-F	1	22,5	22,5
ail-R1	1	22,5	22,5
ail-R2	1	22,5	22,5
ail-P-FAM-MGB	0,1	7,5	75
ystB-F	1	22,5	22,5
ystB-R	1	7,5	7,5
ystB-P-VIC-MGB	0,1	7,5	75
PhHV-267s	1	7,5	7,5
PhHV-337as	1	7,5	7,5
PhHV305-Cy5	1	2,5	2,5
TE			735
Totaal			1000



Verdunningsreeks en test PPC

Om de Limit of Detection van de PCR te kunnen bepalen werd er ook voor de *Yersinia* een verdunningsreeks getest. Dit is dezelfde verdunningsreeks als voor de STEC PCR. De concentraties die werden getest zijn:

- 10pg/ μ l
- 1 pg/ μ l
- 100 fg/ μ l
- 10 fg/ μ l
- 1 fg/ μ l (komt overeen met 1 bacteriegenoom/PCR)

Ook zijn er verschillende PPC verdunningen getest om de optimale concentratie voor de PPC te bepalen. De volgende verdunningen zijn getest:

<u>Stam 113 (<i>ystB</i>)</u>	<u>+</u>	<u>Stam 114 (<i>ail</i>)</u>	
1.5 pg/ μ l	+	5 pg/ μ l	= Verdunning 1
0.8 pg/ μ l	+	2.5 pg/ μ l	= Verdunning 2
0.4 pg/ μ l	+	1.3 pg/ μ l	= verdunning 3

De validatie

Voor de validatie zijn verschillende positieve en negatieve klinische feces monsters getest. Deze monsters kwamen voornamelijk uit het Amphia Ziekenhuis Breda en het LVI. Er werden ook een aantal ruwe lysaten van stammen van het Veterinair Microbiologisch Diagnostisch Centrum (VMDC) Utrecht getest. Om de validatie compleet te maken werden er een aantal klinische- en QCMD monsters getest.

6.3 RESULTATEN

Yersinia PPM

De nieuwe PPM van MMB werd getest op eluaten van bekende *Y.enterocolitica* stammen (tabel 26). De concentratie van het DNA was 10 pg/μl.

TABEL 26: RESULTATEN TEST *YERSINIA* PPM

Target	Ct-waarde
Stam 112 <i>ail</i>	28.2
Stam 112 <i>ystB</i>	-
Stam 113 <i>ail</i>	40.2
Stam 113 <i>ystB</i>	26.8
Stam 114 <i>ail</i>	28.3
Stam 114 <i>ystB</i>	-
Stam 187 <i>ail</i>	38.3
Stam 187 <i>ystB</i>	26.4

Verdunningsreeks *Yersinia*

Van elke stam zijn zes verdunningen getest in TE zonder interne controle om de Limit of Detection te kunnen bepalen. Het resultaat hiervan staat weergegeven in tabel 27:

TABEL 27: RESULTATEN VERDUNNINGSRREEKS *YERSINIA*

Sample Name	Ct <i>ail</i>	Ct <i>ystB</i>
187 10pg/μl	-	26,9
187 1pg/μl	-	30,1
187 100fg/μl	-	32,9
187 10fg/μl	-	40,6
187 1fg/μl	-	-
112 10pg/μl	28,4	-
112 1pg/μl	31,8	-
112 100fg/μl	34,4	-
112 10 fg/μl	37,6	-
112 1 fg/μl	37,7	-
113 10pg/μl	-	26,9
113 1pg/μl	-	30,5
113 100fg/μl		33,9
113 10fg/μl	36,7	-
113 1fg/μl	-	-
114 10pg/ul	28,4	-
114 1pg/ul	31,7	-
114 100fg/ul	34,3	-
114 10 fg/ul	-	-
114 1fg/ul	-	-
ppc1	29,2	29,3
ppc2	30,4	30,6
ppc3	31,5	31,6
NOC	-	-
NOC	-	-
NOC	-	-



Validatie

De validatiemonsters van de *Yersinia* PCR staan in tabel 28 weergegeven. De Ct-waarden van MMB werden vergeleken met de referentie Ct-waarden uit andere laboratoria.

TABEL 28: RESULTATEN VALIDATIE MONSTERS *YERSINIA*

Validatie monsters <i>Yersinia</i>	Samenstelling	AIL	YstB	Referentie Ct	Ct FZR	Δ Ct	Ct-PhHV	
AC-B1 (SKMM) (Breda)	Lysaat <i>Y.enterocolitica ail</i> gen	+	-		34,5		30,7	
AD-H3 (SKMM) (Breda)	Lysaat <i>Y.enterocolitica ail</i> gen	+	-		28,3		29,9	
AD-B4 (SKMM) (Breda)	Lysaat <i>Y.enterocolitica ail</i> gen	+	-		33,9		30,2	
E2-F3 (Breda)	Lysaat <i>Y.enterocolitica ail</i> gen	+	-		34,4		30,7	
E2-F4 (Breda)	Lysaat <i>Y.enterocolitica ail</i> gen	+	-		33,9		30,9	
Seq-1-17 (Breda)	Lysaat <i>Y.enterocolitica ail</i> gen	+	-		32,9		30,6	
VMDC (Breda)	Lysaat <i>Y.enterocolitica ail</i> gen	+	-		31,3		30,2	
VMDC (Breda)	Lysaat <i>Y.enterocolitica ail</i> gen	+	-		30,5		30,1	
AB-B1 (SKMM) (Breda)	Lysaat <i>Y.enterocolitica ystB</i> gen	-	+		30,6		30,4	
1-1-2-01 (Breda)	Lysaat <i>Y.enterocolitica ystB</i> gen	-	+		30,3		30,4	
1-1-2-70 (Breda)	Lysaat <i>Y.enterocolitica ystB</i> gen	-	+		29,3		30,5	
1-1-3-21 (Breda)	Lysaat <i>Y.enterocolitica ystB</i> gen	-	+		29,5		29,9	
1-1-1-40 (Breda)	Lysaat <i>Y.enterocolitica ystB</i> gen	-	+		27,2		29,8	
1-7-6-2 (Breda)	Lysaat <i>Y.enterocolitica ystB</i> gen	-	+		29,9		29,9	
E2-I8 (Breda)	Lysaat <i>Y.enterocolitica ystB</i> gen	-	+		30,4		29,9	
E2-I9 (Breda)	Lysaat <i>Y.enterocolitica ystB</i> gen	-	+		29,8		30,5	
VMDC (Breda)	Lysaat <i>Y.enterocolitica ystB</i> gen	-	+		29,1		30	
VMDC (Breda)	Lysaat <i>Y.enterocolitica ystB</i> gen	-	+		29,1		29,9	
Stam 1 (Breda)	<i>Y. pseudotuberculosis</i> van Hi-agar ¹	-	-				30,5	
Stam 2 (Breda)	<i>Y. pseudotuberculosis</i> van Hi-agar ¹	-	-				30,8	
Stam 3 (Breda)	<i>Y. pseudotuberculosis</i> van Hi-agar ¹	-	-				30,9	
Stam 4 (Breda)	<i>Y. pseudotuberculosis</i> van Hi-agar ¹	-	-				30,9	
Stam 5 (VMDC)	<i>Y.enterocolitica</i> van Hi-agar ¹	+	-		27,1		29,7	
Stam 6 (VMDC)	<i>Y.enterocolitica</i> van Hi-agar ¹	-	+		25,7		29,7	
Stam 7 (VMDC)	<i>Y.enterocolitica</i> van Hi-agar ¹	-	+		26,3		29,6	

Validatie monsters Yersinia	Samenstelling	AIL	YstB	Referentie Ct	Ct FZR	Δ Ct	Ct-PhHV	
Stam 8 (VMDC)	<i>Y.enterocolitica</i> van Hi-agar ¹	+	+		28,3 / 37,7		29,3	
SSC 1 (QCMD)	"feces" ³ met <i>Salmonella</i> (ref ct: 26.4)	-	-				32,3	
SSC 4 (QCMD)	"feces" ² met <i>Campylobacter</i> (ref ct: 23.2)	-	-				31,9	
SSC 8 (QCMD)	"feces" ² met <i>Shigella</i> (ref ct:20.9)	-	-				31,7	
SSC 10 (QCMD)	Negatieve "feces" ²	-	-				32,1	
PARA 1 (QCMD)	"feces" ² met <i>Entamoeba histolytica</i> (ref ct:26.3)	-	-				31,5	
PARA 2 (QCMD)	Negatief "feces" ²	-	-				30,9	
PARA 3 (QCMD)	"feces" ² met <i>Cryptosporidium</i> (ref ct:28.4)	-	-				31,1	
PARA 8 (QCMD)	"feces" ² met <i>Giardia lamblia</i> (ref ct:24.3)	-	-				30,6	
		Feces	DNA				Feces	DNA
0013405149 (Lvl)	Feces/DNA	-	ystB	40	37,3	-2,7	31,1	32,5
0013420501 (Lvl)	Feces/DNA	-		40			31,9	
0013424551 (Lvl)	Feces/DNA	-		40			31,1	
0013450544 (Lvl)	Feces/DNA		ystB	37	34	-3		29,9
0013451977 (Lvl)	Feces/DNA	-	ystB	37	37,8	0,8	30,9	32,1
0013462572 (Lvl)	Feces/DNA	-	ail	22	22,2	0,2	31,2	29,7
0013464521 (Lvl)	Feces/DNA	ystB	ystB	35	33,4/30,4	-4,6	31,8	30
0013465116 (Lvl)	Feces/DNA	ystB	ystB	33	27,5/29,7	-3,3	32	29,8
0013472560 (Lvl)	Feces/DNA		-	40				
0013472638 (Lvl)	Feces/DNA		ystB	36	32,7	-3,3		30,7
0013472538 (Lvl)	Feces/DNA		ystB	35	31	-4		29,7
0013482721 (Lvl)	Feces/DNA		ystB	40	36,1	-3,9		31,4
0013491307 (Lvl)	Feces/DNA	-	ystB	38	37,4	-0,6	30,9	30,3

³ Synthetische feces matrix van QCMD.



6.4 CONCLUSIE/DISCUSSIE

Het doel van deze opdracht was het verbeteren en versnellen van de detectie van *Yersinia enterocolitica* door middel van het invoeren van de *Yersinia* PCR in de routine diagnostiek van de Stichting Medische Microbiologie.

Yersinia PPM

De PPM van MMB presteert naar verwachting en mag daarom ook voor de andere validatie testen worden gebruikt. Verder kan er geconcludeerd worden dat er twee stammen zijn met het *ail*-gen en twee stammen met het *ystB*-gen.

Van de stammen 113 (*ystB* positief) en 114 (*ail* positief) is uiteindelijk PPC gemaakt.

Verdunningsreeks

De ondergrens van deze PCR is 10 fg/μl. Wat gelijk staat aan twee kopieën van bacterieel DNA per μl monster (10 kopiën per PCR).

Voor de PPC zijn drie verschillende verdunningen getest om de optimale concentratie te bepalen. Het is gewenst een Ct-waarde van ongeveer 30 te behalen voor een PPC. Daarom is besloten om verder te gaan met de verdunning die 0,8 pg/μl van stam 113 + 2,5 pg/μl van stam 114 bevat.

Validatie

Er werden bij de feces monsters discrepanties verwacht in ΔCt omdat het referentielab (Lvl) de feces O/N verrijkt in seleniet medium en MMB niet. De verwachting was daarom dat feces monsters met een ref. Ct boven de 35 negatief zullen zijn in MMB. De 2 positieve fecesmonsters uit Lvl (ref. Ct resp 33 en 35) waren beide positief in MMB.

Er zijn 6 DNA monsters die een ref.Ct hadden >35 toch gedetecteerd in MMB (zie tabel 28, Lvl) Uit de ΔCt's (gemiddeld -2.4) is op te maken dat de PCR van MMB gevoeliger is dan die van het Lvl.

3 DNA monsters zijn gemist in de PCR van MMB. Deze hadden echter alle drie een ref. Ct van 40, dus dit was volgens verwachting. Ook was er 1 monster in MMB negatief; dit feces monster uit LVI (0013420501) was erg ingedroogd.

De positieve monsters met Ref. Ct <35 voldoen aan de verwachting. Er zijn er zelfs een aantal met een lagere Ct-waarde dan de referentie Ct.

Sensitiviteit en Specificiteit

Ter validatie zijn er verschillende testen uitgevoerd om zo de sensitiviteit en de selectiviteit van de PCR te bepalen. Er zijn in totaal 35 monsters getest. Dit zijn de positieve monsters afkomstig van het Lvl, VMDC en Breda.

Sensitiviteit *Yersinia*: $(32/35) \cdot 100\% = 91.4\%$

In totaal zijn er 3 positieve monsters gemist. Dit is echter te verklaren. De vals negatieve monsters hadden in het referentie lab al een Ct-waarde van 40. Dit is al erg hoog. Ook zijn deze monsters tijdens transport meerdere keren ingevroren en ontdooit. Hierdoor kan er DNA verloren gaan en zal de Ct-waarde nog hoger zijn. Ct-waarden boven de 40 worden automatisch negatief afgegeven. Als de monsters met Ref.Ct 40 buiten beschouwing worden gelaten wordt de sensitiviteit 100%. Ook mag er worden afgevraagd wat de klinische betekenis is van een monster met een Ct-waarde van boven de 40.

Selectiviteit *Yersinia*: $(12/12) \times 100\% = 100\%$ (negatieve *Y. enterocolitica* monsters VMDC en Breda)

Er zijn geen vals positieve monsters gedetecteerd tijdens de validatie. Dit betekent dat de PCR erg specifiek is en geen interactie geeft met andere veel voorkomende darmpathogenen.

De aantallen geteste monsters (vooral de negatieve) zijn de laag om nauwkeurig de sensitiviteit en selectiviteit te bepalen. Echter, het gaat hier om een zeer beperkte validatie (verificatie) van een test die eerder uitgebreid is gevalideerd door "Scholts et al."

Na overleg met de Medisch Moleculair Microbioloog zijn de waarden voor de sensitiviteit en selectiviteit goedgekeurd. Hiermee is de validatie geslaagd en kan de *Yersinia enterocolitica* PCR worden ingevoerd in de routinediagnostiek van de Stichting Medische Microbiologie.

Hiervoor moet er een validatierapport worden geschreven en moeten de voorschriften aangepast en aangevuld worden.

Op 8 januari 2014 is de *Yersinia* PCR in gebruik genomen. Alle monsters die voorheen op *Salmonella*, *Shigella* en *Campylobacter* werden aangevraagd zullen nu ook op *Yersinia* getest worden.



BIJLAGE 7 FECES OPWERKING M.B.V. MPLC

7.1 DNA/RNA ISOLATIE FECESMONSTERS

1. Suspendeer een brokje feces ter grootte van een halve erwt in 1 mL STAR buffer en bewaar deze suspensie voor minimaal 30 minuten bij -20°C
2. Plaats de ontdooide monsters in de MagNA Lyser en homogeniseer op speed 6000 gedurende 30 seconden
3. Centrifugeer de monsters 1 minuut bij 14.000 RPM
4. Pipetteer 10 µl IC Combi in ieder welletje van de MPLC sample cartridge
5. Pipetteer 200 µl supernatant in de MPLC sample cartridge volgens sticker volgorde tm-fae_PCR stikkers werklijst en meng 2 maal **(NB: zie onderaan)**
6. De monsters zijn nu klaar voor opwerking in MagNA Pure LC (volg het BDVS MagNA Pure LC)
7. Druk bij Protocol op "▼", selecteer "" en druk op "OK" **Total NA HP en protocol : Total NA HP 200 BLK**
8. Druk bij Sample Volume veld op "▼" selecteer "200 µl" en druk op "OK"
9. Druk bij Elution Volume veld op "▼" selecteer "100 µl" en druk op "OK"
10. Monsters zijn nu klaar voor opwerking in MagNA Pure LC
11. Wanneer de run klaar is verschijnt een scherm: **result screen**
12. Haal nu elution cartridge uit de MPLC en plaats deze in de QIAgility
13. Zie bedieningsvoorschrift QIAgility

13. Ruim nu de MPLC volgens desbetreffende voorschrift uit

NB Indien het monster erg slijmerig is, pipetteer 100 µl supernatant in 100µl STAR buffer in een Sample Tube. Meng goed. Indien dit supernatant nog slijmerig is, voeg 10 µl protK toe en zet dit 10 min bij 55°C (tussendoor vortexen)