

Detectie cell wall deficient bacteria (CWDB) geassocieerd met *Coxiella burnetti* in humaan, veneus bloed

Datum	16-02-2018
Betreft	Detectie cell wall deficient bacteria (CWDB) geassocieerd met <i>Coxiella burnetti</i> in humaan, veneus bloed
Auteur	dr. GJ Jansen, BioTrack bv, Agora 4, 8934 CJ, Leeuwarden
Project	BT0100
Status	concept
SecLev	<i>Confidentieel</i>

Aanleiding

Medio juli 2017 werd BioTrack, Leeuwarden benaderd door drs. L. Kunst, arts (vanaf nu: opdrachtgever) met de vraag in hoeverre het technisch mogelijk is om cell wall deficient bacteria (CWDB) in veneus bloed aan te tonen. Op basis van de daaropvolgende gesprekken werd besloten een meet programma uit te voeren waarin CWDB gemeten werden in een set van 50 geanonimiseerde samples veneus bloed. Er werd overeengekomen dat de analyses uitgevoerd zouden worden door BioTrack, Leeuwarden (vanaf nu: het Laboratorium).

Opdracht omschrijving en voorwaarden

De opdracht van dit project werd als volgt omschreven:

Vaststellen in hoeverre het mogelijk is om CWDB, in het bijzonder van het species Coxiella burnetti, te meten in humaan veneus bloed gebruik makende van fluorescentie in situ hybridisatie.

De voorwaarden waaronder dit project werden uitgevoerd worden hieronder vermeld:

- Alle bloed samples zijn gegarandeerd vrij van Hepatitis en HIV. Opdrachtgever is hiervoor verantwoordelijk.
- De selectie van bloed donoren en bloed afname worden volgens medisch gangbare procedures en onder gecontroleerd omstandigheden verricht door opdrachtgever.
- Alles samples worden getransporteerd gebruikmakend van wettelijk goedgekeurde methoden voor het transport van medisch materiaal. Opdrachtgever is hiervoor verantwoordelijk
- Alle bloed samples zijn door opdrachtgever geanonimiseerd voor vrijwilliger en voor afname tijdstip.
- Het laboratorium ontvangt de samples en analyseert deze binnen 4 uur na binnenkomst.
- Het laboratorium is een ML-1 faciliteit waarin ruime ervaring met het werken en afvoeren van microbiologisch besmet materiaal bestaat. Het personeel heeft minimaal 5 jaar ter zake doende ervaring op minimaal Hbo-niveau.
- De uitgevoerde analyse methode is experimenteel en geen enkele diagnostische dan wel therapeutische betekenis kan aan de behaalde meetresultaten gehecht worden.

Bovenstaande voorwaarden zijn besproken en geaccordeerd door zowel opdrachtgever als door het laboratorium voorafgaande aan het uitvoeren van de opdracht.

Samples

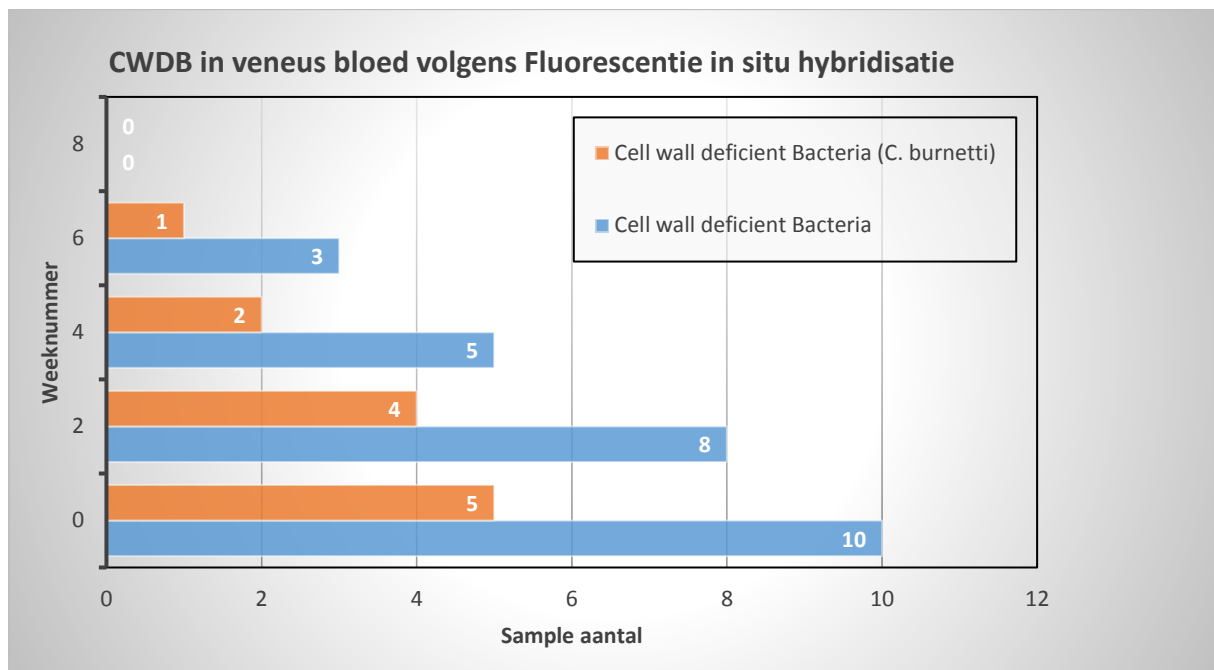
Vijftig samples humaan veneus bloed in gehepariniseerde vacutainers. Volume \geq 4 ml per sample. Alle samples zijn door opdrachtgever geanonimiseerd en werden in afgesloten verpakking en in correcte staat aangeleverd.

Methode

De exacte details van de gevolgde methodologie vallen onder vertrouwelijke bedrijfsinformatie van het laboratorium. Voor hier zal worden volstaan met een korte, algemene, beschrijving van de toegepaste methode: 5 μ l bloed werd gebruikt en gefixeerd in 70% ethanol. Daarna werd gehybridiseerd met een *Coxiella burnetti* specifieke en gelabelde DNA-probe en gewassen. Het preparaat werd vervolgens ingesloten met VectaShield™. De preparaten werden beoordeeld en digitaal gefotografeerd met behulp van een fluorescentie microscoop bij 1000x vergroting.

Resultaat

De samples werden geleverd in charges van 10 samples met een interval van 14 dagen. Iedere levering wordt aangeduid als een charge. Aangezien alle samples (ongeacht charge) met een uniek nummer zijn aangeduid is weergegeven van de individuele resultaten in dit rapport minder zinvol. Deze individuele (of 'ruwe') resultaten worden separaat en digitaal aan opdrachtgever ter beschikking gesteld. In de figuur hieronder worden de resultaten in histogram-weergave en per charge, gepresenteerd.



Figuur 1: Cell wall deficient bacteria gemeten met Cy3-gelabelde EUB338-probe en Cell wall deficient bacteria geassocieerd met *C. burnetti* gemeten met Cy3-gelabelde *C.bur*-probe.

Conclusies

- In sommige samples worden objecten aangetroffen (zowel intra- als extra cellulair) die positief hybridiseren met een DNA-probe specifiek voor *Coxiella burnetti*.
- Veel van deze objecten zijn morfologisch sterk gelijkend op celwand deficiënte cellen.
- Het aantal CWDB neemt af per charge
- In de laatste charge (week 8) zijn geen CWDB detecteerbaar
- In enkele samples worden ook kleine hematologische variaties gezien.

Afsluitend

Bovenstaande werkzaamheden werden volledig uitgevoerd onder het regime van boven genoemde voorwaarden. Over de behaalde resultaten wordt uitsluitend gecommuniceerd met de opdrachtgever. Biotrack communiceert over dit onderzoek en uitslagen uitsluitend met opdrachtgever. Dit onderzoek vindt plaats onder wederzijdse geheimhouding.