

CAT **Critically Appraised Topic**

Diagnostiek van gastro-enteritis met behulp van het FilmArray Gastro-Intestinaal panel (BioFire Diagnostics).

Author: Dr. Katrien Hoet

Supervisor: Dr. Els Oris

Date: 9 mei 2017

Clinical Bottom line

Tot op heden heeft men voor de microbiologische diagnostiek van gastro-enteritis een combinatie van verschillende testen nodig, om zowel bacteriën, virussen als parasieten te kunnen detecteren. Ze hebben eerder een lage sensitiviteit, lange turn-around-time (TAT) en ze zijn vaak arbeidsintensief. Sommige pathogenen worden helemaal niet opgespoord bij gebrek aan aanwezige testen. Omwille van deze beperkingen zijn er de laatste jaren multiplex polymerase-chain-reaction (PCR) gastro-intestinale panels geïntroduceerd, die in 1 test een brede waaier aan enteropathogenen gelijktijdig kunnen detecteren. Deze syndroom gerelateerde moleculaire panels combineren een verbeterde sensitiviteit met een verbeterde TAT tegenover de conventionele methoden. Het FilmArray Gastro-Intestinaal panel (BioFire Diagnostics) is zo'n commercieel syndroom gerelateerd panel dat 22 enteropathogenen volledig automatisch kan detecteren in ongeveer 1 uur tijd. De voorbereidende hands-on time bedraagt slechts 2 minuten. Dit maakt dat dit een gebruiksvriendelijk en eenvoudig panel is met een zeer korte TAT. Het heeft door zijn grote voordelen het potentieel om de diagnostiek naar gastro-enteritis sterk te vereenvoudigen. Het grootste nadeel is echter de kostprijs van dit panel. Momenteel zijn er echter nog enkele vragen die in de toekomst beantwoord dienen te worden over het gebruik van deze syndroom gerelateerde panels, zoals totale impact op de kosten en het beleid van de patiënt en de klinische relevantie van de positieve resultaten.

Clinical/Diagnostics scenario

Ondanks de daling van de wereldwijde mortaliteit blijft infectieuze gastro-enteritis een belangrijk probleem. Dagelijks sterven ongeveer 2195 kinderen aan de gevolgen van diarree. Dit maakt diarree de 2^{de} grootste doodsoorzaak bij kinderen jonger dan 5 jaar (1,2). Daarnaast is diarree ook geassocieerd met een fysieke en mentale ontwikkelingsachterstand (3).

Hoewel voornamelijk de ontwikkelingslanden voor een groot deel getroffen worden door deze problematiek, blijft dit ook een significant probleem in de geïndustrialiseerde landen. Er wordt geschat dat er in de Verenigde Staten elk jaar 178.8 miljoen mensen getroffen worden

door een episode van infectieuze gastro-enteritis, wat resulteert in ongeveer 474 000 hospitalisaties en 5000 doden (3). Hoewel de mortaliteit van gastro-enteritis in de geïndustrialiseerde landen veel lager ligt dan in de ontwikkelingslanden, zorgt dit toch voor een grote belasting van de gezondheidszorg en een grote geassocieerde kost (4, 5, 6).

Infectieuze gastro-enteritis kan veroorzaakt worden door een grote verscheidenheid aan pathogenen, waaronder bacteriën, virussen en parasieten. De arts kan op basis van de klinische presentatie alleen niet bepalen welke van deze pathogenen de oorzakelijke verwekker is. Om tot een definitieve etiologische diagnose te komen is laboratoriumonderzoek onder vorm van microbiologisch stoelgangsonderzoek nodig (3). Met een correcte diagnose kan men komen tot een beter beleid, waaronder een correcter gebruik van antibiotica.

Traditioneel wordt voor de diagnostiek van gastro-enteritis een combinatie gebruikt van klassieke cultuur, antigeen-testen, microscopie en individuele PCR testen. Deze conventionele technieken hebben echter vaak een eerder lage gevoeligheid, zijn arbeidsintensief en zijn tijdrovend waardoor ze een lange TAT hebben. Elke test op zich detecteert slechts een beperkt aantal pathogenen. Het is de behandelende arts die kiest welke test(en) hij wenst, waardoor mogelijks sommige pathogenen niet gedetecteerd zullen worden omdat de test niet werd aangevraagd. Daarnaast worden sommige pathogenen gemist omdat er geen specifieke test voor bestaat (7).

Daarom is er de laatste jaren meer en meer interesse in het gebruik van syndroom gerelateerde panels in de diagnostiek van gastro-enteritis. Deze panels laten toe om op korte tijd een grote waaier aan pathogenen te detecteren waardoor de TAT drastisch kan dalen. Bij een snellere diagnose kan men onder andere sneller correcte antibiotica starten of onnodige antibiotica stoppen.

In deze CAT wordt gekeken wat syndroom gerelateerde panels op heden kunnen betekenen in de diagnose van gastro-enteritis en wordt naderhand het FilmArray Gastro-Intestinaal panel gedetailleerd besproken.

Questions

1. Wat is de plaats van syndroom gerelateerde gastro-intestinale panels in de diagnostiek van gastro-enteritis?
2. Performantiekarakteristieken van het FilmArray Gastro-Intestinale panel.
3. Implementatie van een gastro-intestinaal panel in ZOL Genk.

Search Terms

- 1) MeSH Database (PubMed): MeSH terms: “Gastroenteritis, diagnosis, multiplex polymerase chain reaction”

- 2) PubMed Clinical Queries (from 1966; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi>): Systematic Reviews; Clinical Queries using Research Methodology Filters (“gastroenteritis + multiplex polymerase chain reaction” “gastroenteritis + FilmArray”, “FilmArray gastrointestinal panel”)
- 3) Pubmed (Medline; from 1966), “gastroenteritis + multiplex PCR”, “gastroenteritis + Filmarray”, “gastroenteritis + diagnosis”, ‘gastroenteritis + molecular detection”
- 4) UpToDate Online version (2017)

Appraisal

I. Plaats van syndroom gerelateerde panels in de diagnostiek van gastro-enteritis

I.1 Conventionele diagnostiek

Infectieuze gastro-enteritis kan worden veroorzaakt door zowel bacteriën, virussen als parasieten (8). Het is onmogelijk om op basis van de klinische presentatie alleen een etiologische diagnose te maken aangezien diarree het predominant symptoom is bij alle vormen van infectieuze gastro-enteritis (3).

De meeste episodes van gastro-enteritis zijn mild en zelflimiterend waardoor detectie van het oorzakelijk agens bij recent ontstane diarree vaak niet nodig is. De behandeling in deze gevallen bestaat uit een louter supportief beleid. Microbiologisch stoelgangsonderzoek wordt wel aangeraden bij patiënten die zich presenteren met een ernstige ziekte, langdurige diarree, patiënten die immuungecompromitteerd zijn, patiënten die recent blootgesteld zijn aan antibiotica en/of patiënten die diarree hebben ontwikkeld 3 dagen na opname in het ziekenhuis en bij outbreaks van gastro-enteritis (9). Het opsporen van het oorzakelijk agens speelt hier voornamelijk een belangrijke rol bij het instellen van de correcte behandeling met correct gebruik van antibiotica en voor infectie controle om zo verspreiding te voorkomen (3, 7, 10). Bijkomend kan een etiologische diagnose belangrijke epidemiologische informatie bieden en kan men eventueel argumenteren dat dit ook een vorm van patiënt tevredenheid kan geven (11).

Klassiek wordt voor de detectie van enteropathogenen in stoelgang in het Ziekenhuis-Oost-Limburg te Genk (ZOL Genk) gebruik gemaakt van een combinatie van verschillende testen:

A. Bacteriën worden traditioneel opgespoord met cultuur, waarbij verschillende selectieve bodems worden geënt en geïncubeerd. In het ZOL Genk worden standaard volgende bodems gebruikt: MacConkey agar (McC), XyloseLysineDesoxycholaat agar (XLD), Yersiniaplaat, Campylobacterplaat, Brilliant Groen Agar, Seleniet en Rappaport *Salmonella* aanrijkingsbodem. Bij micro- of macroscopisch bloederige stalen wordt bijkomend een Sorbitol MacConkey agar (SMAC) ingezet van lactose positieve kolonies op de McC, die

geïdentificeerd werden als *E. coli* met behulp van de MaldiTOF, voor detectie van *Enterohemorragische E.coli* (EHEC O157). Kleurloze kolonies op deze SMAC worden verder getest met een latex agglutinatietest voor EHEC O157. Indien negatief worden deze stalen verstuurd naar het referentielaboratorium voor verdere typering.

Alles tezamen heeft men voor de detectie van bacteriën verschillende selectieve media en aanrijkingstappen nodig en overnacht incubatie. Definitieve resultaten zijn pas na 3 dagen beschikbaar. Dit maakt dat bacteriële kweek een lange TAT heeft. Daarnaast is in meerdere studies aangetoond dat de opbrengst van cultuur eerder laag is (3, 7, 8, 12).

B. Detectie van *Clostridium difficile* gebeurt momenteel niet meer met cultuur maar met een combinatie van antigeen-testen en individuele PCR. Infectieuze gastro-enteritis door *C. difficile* is een toxine-gemedieerde aandoening. Enkel de toxine producerende stammen hebben dus klinisch belang en zullen aanleiding geven tot isolatiemaatregelen en behandeling (13). Om de stalen te beperken die op aanwezigheid van toxines zullen worden getest, maakt men eerst gebruik van een screeningstest om de aanwezigheid van *C. difficile* te bepalen. Hiervoor gebruikt men een antigeentest ter opsporing van glutamaat dehydrogenase (GDH), een antigeen eigen aan *C. difficile*. In het ZOL Genk wordt hiervoor de *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*[®] gebruikt. Deze test kan echter geen onderscheid maken tussen de toxinogene en niet-toxinogene stammen. Positieve stalen worden dan verder getest met behulp van GeneXpert voor de detectie van toxine B.

C. Virale pathogenen worden opgespoord met behulp van antigeentesten. In het ZOL Genk maakt men gebruik van een gecombineerde immuunchromatografische test voor rotavirus en adenovirus 'SD BIOLINE Rota/Adeno ag rapid kit'. Norovirus wordt eveneens opgespoord met een immuunchromatografische test (RIDA[®]QUICK Norovirus), maar wordt enkel aangeboden en uitgevoerd bij vermoeden van een outbreak, zoals ook aangeraden door de CDC. De sensitiviteit van antigeentesten voor norovirus is te laag (50-75%) om betrouwbaar te gebruiken voor sporadische gevallen. Ook tijdens outbreaks adviseren zij om een negatieve antigeentest te laten bevestigen door een moleculaire test (14).

D. Tot slot worden parasieten opgespoord met microscopisch onderzoek. Enkel op specifieke vraag van de behandelende arts naar detectie van *Giardia lamblia* en/of *Cryptosporidium* species wordt in het ZOL Genk tevens bijkomend een afzonderlijke antigeentest voor respectievelijk *Giardia* en/of *Cryptosporidium* ingezet. Microscopisch onderzoek naar parasieten is echter weinig sensitief. De betrouwbaarheid van het onderzoek hangt sterk af van de ervaring van de uitvoerder en parasieten kunnen gemist worden door hun intermitterende uitscheiding in de stoelgang (5). Idealiter zou men 3 stoelgangsstalen op 3 opeenvolgende dagen moeten onderzoeken, wat uiteraard de TAT drastisch zou verlengen. Het onderzoek wordt verder ook beperkt in de detectie van *E. histolytica*, aangezien het morfologisch niet kan onderscheiden worden van de niet-pathogene *E. dispar* (15). Het is tevens een arbeidsintensieve test, waarbij zowel de voorbereiding van het

microscopisch plaatje als het screenen ervan de nodige tijd in beslag nemen (20-tal minuten per staal) (16).

E. Voor bepaalde pathogenen zoals bijvoorbeeld de enteropathogene *E. coli* stammen, astrovirus en sapovirus zijn geen routine testen aanwezig. Deze pathogenen worden dus momenteel gemist in de diagnostiek. Het is in vele studies echter gebleken dat deze pathogenen, voornamelijk de enteropathogene *E. coli* stammen en sapovirus, ook een significante betekenis hebben bij infectieuze gastro-enteritis (8, 17, 18).

Het is duidelijk dat deze traditionele methoden elk hun eigen beperkingen hebben. Samenvattend kan men besluiten dat de gevoeligheid van de meeste van deze testen niet optimaal is en dat ze arbeidsintensief zijn (3). Bacteriële kweek heeft daarbovenop een lange TAT door de noodzaak tot aanrijkingen en overnacht incubatie. Microscopisch onderzoek naar parasieten heeft tevens ook het nadeel dat er ervaren personeel voor nodig is en dat bepaalde species niet kunnen onderscheiden worden van elkaar (15). Daarnaast worden bepaalde belangrijke oorzakelijke enteropathogenen zoals oa. enteropathogene *E. coli* stammen, astrovirus en sapovirus vaak niet opgespoord in de huidige routine, waardoor mogelijk een etiologische diagnose gemist wordt (8, 17, 18, 19).

Voor de aanvragende arts is het momenteel ook een uitdaging om de correcte test(en) aan te vragen. Dit maakt dat de arts op basis van zijn patiënt toch min of meer een inschatting moet maken van de etiologie, hoewel er klinisch geen pathognomonische symptomen bestaan voor een bepaalde pathogeen (7, 19). Op deze manier kan men dus pathogenen missen gewoon omdat de test niet werd aangevraagd (3). Uiteraard zijn er wel enkele richtinggevend argumenten om bepaalde testen wel of niet aan te vragen. Zo zal bijvoorbeeld de klassieke bacteriële kweek voornamelijk zinvol zijn bij community-acquired gastro-enteritis, maar minder bij nosocomiale diarree omdat deze laatste vorm van diarree voornamelijk veroorzaakt wordt door *C. difficile* en norovirus en door niet-infectieuze oorzaken (8, 20).

1.2 Syndroom gerelateerde gastro-intestinale panels

Omwillen van deze beperkingen is er de laatste jaren meer interesse in het gebruik van moleculaire technieken in de diagnose van gastro-enteritis (7). Ze laten op een snelle en gevoelige manier toe om enteropathogenen te detecteren. Gebruik van PCR voor de detectie van micro-organismen rechtstreeks van een klinisch staal, waaronder zowel bacteriën, virussen, parasieten als fungi gebeurt reeds langer. Dit was tot recent echter een techniek die eerder beperkt werd gebruikt, vaak was voorbehouden voor bepaalde laboratoria en waarbij PCR's voornamelijk 1 per 1 werden uitgevoerd. Wanneer men echter te maken heeft met ziektebeelden waarbij een brede groep pathogenen de mogelijke oorzaak kan zijn, is het gebruik van meerdere van deze singleplex PCR's praktisch niet haalbaar (21). Daarom zijn er de laatste jaren verschillende syndroom gerelateerde panels gekomen, die verschillende oorzakelijke organismen gelijktijdig kunnen detecteren naargelang

het ziektebeeld. Deze panels zijn niet alleen interessant voor het gebruik binnen de diagnostiek van gastro-enteritis, maar ook voor andere ziektebeelden. Tot op heden zijn er dan ook al verschillende syndroom gerelateerde panels beschikbaar, zoals voor respiratoire infecties, meningitis, sepsis (positieve hemoculturen) en gastro-enteritis (13, 21).

Momenteel zijn de panels voor respiratoire pathogenen al enkele jaren op de markt en waarschijnlijk het beste ingeburgerd. Zo werd het eerste FDA-goedgekeurd syndroom gerelateerd panel voor respiratoire pathogenen geïntroduceerd in 2008. Sinds dan vindt deze techniek meer en meer zijn weg in de laboratoria (12, 13). Voor gastro-intestinale pathogenen zijn er intussen ook steeds meer verschillende commerciële panels verschenen, gaande van panels die enkel bacteriën detecteren (bv RIDA®GENE Bacterial Stool Panel) tot panels die 22 enteropathogenen tegelijkertijd kunnen opsporen (FilmArray Gastro-Intestinaal panel) (22).

Het is reeds in verschillende studies duidelijk geworden dat gastro-intestinale panels een hogere positieve opbrengst hebben dan conventionele technieken. In de studie van Khare et al. kwam men aan een percentage van positieve stalen van 28.3% met de FilmArray en 20% met de Luminex xTag GPP tegenover 8.3% met de conventionele methoden (7). In een andere studie kwam men zelfs aan een positief percentage van 54.2% met de FilmArray ten opzichte van 18.1% (8).

1.2.1 Voordelen

Ten eerste is in tal van de studies gebleken dat deze gastro-intestinale panels een goede sensitiviteit hebben (3, 7, 8, 23). De studie van Khare et al, een vergelijkende studie tussen 2 commerciële kits (Luminex xTag GPP en FilmArray Gastro-intestinaal panel), kon bijvoorbeeld aantonen dat beide panels voor de meerderheid van de pathogenen die ze detecteren een sensitiviteit hebben van >90% (7). Een uitgebreidere bespreking van de sensitiviteit van het FilmArray Gastro-Intestinale panel is terug te vinden in deel 2.

Ten tweede bieden ze de mogelijkheid tot detectie van pathogenen die niet worden gedetecteerd met conventionele methoden, zoals enteropathogene *E. coli* stammen, en eventueel sapovirus en astrovirus. Het belang van deze enteropathogenen is dankzij het gebruik van deze syndroom gerelateerde panels duidelijk geworden. In de studie van Spina et al. behoorden enteropathogene *E. coli* (EPEC), enteroaggregatieve *E. coli* (EAEC) en enterotoxigene *E. coli* (ETEC) tot de 6 meest gedetecteerde pathogenen (8). Een andere multicentrische studie van Buss et al. detecteerde EPEC, EAEC en ETEC in respectievelijk 22,4%, 7% en 2% van alle stalen. Daarnaast werd in deze zelfde studie sapovirus gedetecteerd in 3,8% van de stalen, waarbij dit de 5^{de} meest gevonden pathogeen was in deze stoelgangsstalen. Astrovirus werd hier gedetecteerd in 0,5% van de stalen (3). De klinische relevantie werd in deze studies niet verder onderzocht.

Ten derde kunnen ze met een beperkte voorbereidingstijd, gaande van een 45-tal minuten (Luminex xTag GPP) tot een 2-tal minuten (FilmArray Gastro-Intestinaal panel) voorbereiding, op korte tijd een breed spectrum aan pathogenen screenen. Naargelang welk panel voor enteropathogenen men gebruikt, kan de TAT variëren van enkele uren tot zelfs maar 1 uur met het FilmArray Gastro-Intestinaal panel (17, 22).

Het gebruik van een syndroom gerelateerd panel maakt de aanvraag voor de behandelende arts gemakkelijker. De aanvragende arts moet enkel het syndroom aankruisen waarvoor hij diagnostiek wenst en moet zelf geen selectie meer maken van verschillende testen.

Tot slot zijn ze gebruiksvriendelijk, eenvoudig en geautomatiseerd. Ze laten toe om de combinatie aan verschillende testen te vervangen door 1 test die alles omvat. Dit kan de workflow sterk vereenvoudigen in het laboratorium.

1.2.2 Beperkingen

Uiteraard brengt het gebruik van deze panels ook enkele uitdagingen met zich mee. Zo kunnen pathogenen asymptomatisch aanwezig zijn zoals *G. lamblia* of worden ze blijvend uitgescheiden, zelfs tot weken nadat de symptomen verdwenen zijn, zoals bijvoorbeeld *Salmonella* species en norovirus (3, 24). Daarnaast hebben verscheidene studies aangetoond dat het gebruik van gastro-intestinale panels veel co-infecties aan het licht brengt. Zo worden bijvoorbeeld percentages gevonden voor de aanwezigheid van multiple pathogenen in 27,0% (7), 30,2% (8) en 31,2% (3) van alle positieve stalen. In deze verschillende studies komen verschillende combinaties van co-infecties voor. Er is echter nog geen significante associatie aangetoond tussen de verschillende combinaties van pathogenen. De betekenis van deze co-infecties en de impact op het klinisch beeld van de patiënt is nog niet duidelijk. Er is dus momenteel nog niet geweten op welke manier dit het beleid voor de patiënt zal beïnvloeden. Positieve resultaten zullen omwille van deze redenen toch met enige voorzichtigheid geïnterpreteerd moeten worden. Er zal in de toekomst meer onderzoek nodig zijn, gericht op een integratie van klinische gegevens naast deze laboratorium resultaten om de betekenis hiervan duidelijker te maken (3, 17).

Men moet ook voorzichtig zijn bij de interpretatie van *C. difficile*, voornamelijk bij kinderen <1 jaar. Het is geweten dat asymptomatisch dragerschap met toxinogene stammen bij deze leeftijdsgroep voorkomt zonder symptomen, mogelijks omdat zij de targets missen waarop deze toxinen binden. De American Academy of Pediatrics adviseert om bij deze kinderen geen routinematig onderzoek te doen naar *C. difficile* (25). Dit maakt dat men bij het inzetten van een gastro-intestinaal panel bij kinderen < 1 jaar zal geconfronteerd worden met deze positieve resultaten en best afspraken maakt over wat men hiermee zal doen. Men kan eventueel besluiten om een positief resultaat voor *C. difficile* te blinderen. Bij specifieke situaties met screening naar *C. difficile* is het trouwens aan te raden gebruik te maken van de individuele PCR in plaats van de multiplex PCR (3, 26).

Daarnaast is er geen enkel panel dat alle mogelijke pathogenen bevat. Het FilmArray Gastro-Intestinale panel is momenteel het panel dat het grootste aantal pathogenen detecteert. Maar men moet zich er bewust van zijn dat er bepaalde bacteriën zoals bijvoorbeeld *Aeromonas* species, andere types van virussen (bijvoorbeeld norovirus GIV) en andere mogelijke parasieten toch gemist zullen worden met dit panel (26).

Tot slot zijn deze panels een stuk duurder dan de conventionele methoden en is er momenteel nog geen terugbetaling voorzien. De bedenking hierbij is dat wanneer er verschillende conventionele testen worden aangevraagd door de behandelende arts, de uiteindelijke kost (reagentia, materiaal en personeelskosten) mogelijks voordeliger uitvalt. Dit hangt af van de testen die het laboratorium nu gebruikt en het gekozen gastro-intestinale panel. Het is tevens belangrijk om voor de evaluatie van de kosteneffectiviteit ook de kosten buiten het laboratorium in rekening te brengen (24). Het lijkt mogelijk dat besparingen zich kunnen situeren ter hoogte van het stopzetten van onnodige antibiotica, sneller ontslaan van de patiënt en/of het isolatiebeleid (4, 27). Er is echter meer onderzoek nodig om de totale impact op de kost te bepalen (4, 17, 28).

1.2.3 Plaats in de diagnostiek van gastro-enteritis

Tot nu toe zijn er nog geen echte internationale richtlijnen omtrent de implementatie van deze panels in de routine diagnostiek van gastro-enteritis. Zoals net besproken is er enerzijds nog de hoge kost van deze panels en is er anderzijds nog niet voldoende geweten wat de invloed van deze panels zal zijn op het totale beleid van de patiënt (24). Mogelijks kan dit leiden tot een correcter antibioticabeleid (stopzetten van antibiotica bij een virale oorzaak), betere infectie controle en mogelijks kortere hospitalisatieduur (wanneer men weet dat het een virale oorzaak betreft) (3, 7, 11, 27).

Indicaties voor het inzetten van een syndroom gerelateerd panel kunnen zijn: ernstige ziekte, immuungecompromitteerde status en/of aanslepende diarree (17, 24). Mogelijke strategieën voor gebruik van een gastro-intestinaal panel worden besproken.

1.2.3.1 Gebruik van een gastro-intestinaal panel als routinetest

Het panel kan worden ingezet voor alle aangevraagde faeces stalen. Hierbij zou men vertrekken van de indicaties voor stoelgangsonderzoek in het algemeen: patiënten met langdurige diarree (7 dagen of meer), ernstige diarree en diarree bij immuungecompromitteerde patiënten. Alle andere patiënten (< 7 dagen, milde ziekte en niet immuungecompromitteerd) behoeven, zoals ook aanbevolen in de huidige richtlijnen (9), geen verdere diagnostiek.

Bij een positief bacterieel resultaat wordt bijkomend een kweek ingezet voor antibiogram. Bij een negatief resultaat kunnen, indien nodig, bijkomende testen worden ingezet zoals bacteriële kweek, antigeen-testen, microscopie en/of individuele PCR. Bacteriële kweek kan

bijvoorbeeld zinvol zijn voor de detectie van andere bacteriën die niet aanwezig zijn in het panel, zoals oa. *Aeromonas* species (niet opgenomen in het FilmArray Gastro-Intestinale panel) (29). Parasitair onderzoek met microscopisch onderzoek, antigeentesten en eventueel individuele PCR's kan bij een negatief panel resultaat nuttig zijn om intermitterende shedding op te sporen, infecties op te sporen bij terugkerende reizigers of bij immuungecompromitteerde patiënten (waarbij oa *Microsporidium* species kunnen voorkomen) (26).

Voor detectie van *C. difficile* kan de individuele test blijven. De indicaties voor screening naar *C. difficile* zijn goed afgelijnd waardoor het zinvol lijkt om in deze situaties een goedkopere individuele PCR aan te bieden in plaats van een duurder moleculair panel (3, 24, 26). Indien toch noodzakelijk, kunnen eventueel nadien een moleculair panel of andere testen worden ingezet. Daar nosocomiale diarree echter voornamelijk non-infectieuze oorzaken kent, kan een negatief resultaat voldoende zijn om een infectieuze oorzaak uit te sluiten (20).

Daarnaast zal bij outbreaks met een specifiek organisme het gebruik van de specifieke test voor de oorzakelijke pathogeen mogelijks ook de voorkeur hebben boven een volledig panel, indien reeds gekend welk organisme (26).

Zoals reeds aangehaald, zullen bacteriële kweken nog wel steeds nodig zijn voor o.a. bepaling van het antibiogram en epidemiologische onderzoeken (7). Daarnaast kan deze kweek ook een bevestiging vormen van het resultaat, waarbij er wordt verwacht dat levende bacteriën zullen groeien.

Het voordeel van deze manier van werken is een sterk vereenvoudigde workflow op het laboratorium, een snelle diagnose en een eenvoudigere manier van aanvragen voor de clinicus. De aanvragende arts moet slechts 1 syndroom aankruisen in plaats van zelf te selecteren.

Het nadeel is dat dit mogelijks tot overshooting kan leiden van het gebruik van een duur moleculair panel indien de indicaties niet strikt worden gevolgd. Het labo kan de arts hierin ondersteunen door de indicaties te vermelden op het aanvraagformulier die dan ook aangekruist dienen te worden. Indien het panel negatief is, blijft het ook de vraag wat er nadien moet gebeuren. Contacteert het laboratorium de aanvragende arts zelf? Of wordt er eventueel een commentaar toegevoegd aan het resultaat dat de arts het labo zelf moet contacteren? Er kan worden vermoed dat als de eerste strategie wordt gekozen, de arts vaak toch zal kiezen om het staal verder uit te werken. Uiteindelijk zal dit dan toch leiden tot een grote werkbelasting per staal. Ook hier kan het aanvraagformulier ondersteunend zijn, waarbij bepaalde klinische inlichtingen zoals terugkeer van de tropen, reeds kunnen worden vermeld. Tot slot blijft het een duur onderzoek dat tevens niet terugbetaald is voor de patiënt.

Een gelijkaardig algoritme kan worden gevonden bij de Mayo Clinic (Mayo Medical Laboratories) (26) (bijlage I)). Zij maken gebruik van het FilmArray Gastro-Intestinale panel. Ook in Nederland worden deze syndroom gerelateerde panels reeds op deze manier aanbevolen in hun richtlijnen. Een voorbeeld hiervan kan worden teruggevonden in de standaard 'acute diarree' van het Nederlandse huisartsen genootschap. De opmerking moet wel gemaakt worden dat in Nederland de kosten voor moleculaire diagnostiek sinds 2013 zijn verlaagd. Zij nuanceren echter ook wel dat, omdat deze technieken nog volop in ontwikkeling zijn, ze nog geen echt eenduidig advies kunnen formuleren (34).

1.2.3.2. Gebruik van het panel in geselecteerde gevallen met behoud van het klassieke systeem

Een andere mogelijke strategie is om het panel enkel in geselecteerde gevallen te gebruiken. De huidige manier van diagnostiek blijft, tenzij specifiek een panel wordt aangevraagd. Een mogelijke indicatie voor een panel is bijvoorbeeld patiënten met een ernstig ziektebeeld. Op het aanvraagformulier zal het panel dan worden aangeboden waarbij deze strikte indicatie(s) vermeld staan en moeten worden aangekruist.

Het voordeel hierbij is dat het gebruik van een moleculair panel gelimiteerd blijft en daarmee ook de kostprijs. Aangezien het panel wel wordt aangeboden, heeft de behandelende arts wel de optie om tot een snelle diagnose te komen indien dit noodzakelijk is.

Het nadeel is dat dit de workflow in het laboratorium niet vereenvoudigt en dat de bestaande beperkingen van de klassieke methode, zoals hierboven besproken, blijven bestaan. Er blijft een combinatie aan verschillende testen bestaan. De behandelende arts moet daarbij nog steeds zelf een selectie maken, waarbij er naast de reeds bestaande testen nog een extra test bijkomt.

1.3.4 Besluit

Men kan besluiten dat syndroom gerelateerde panels voor gastro-enteritis tal van voordelen bezitten die hun gebruik in klinische laboratoria in de toekomst zal stimuleren. Deze panels hebben het potentieel om de huidige manier van aanvragen en werken aanzienlijk te vereenvoudigen. Ze laten toe om op een gevoelige manier, snel tot een etiologische diagnose te komen.

Er zijn nog wel enkele uitdagingen verbonden aan deze panels. Positieve resultaten zullen niet altijd eenduidig te interpreteren zijn. Meer studies zullen zich in de toekomst moeten richten op de integratie tussen kliniek en resultaten om hier meer duidelijkheid over te krijgen. Daarnaast blijft de kost verbonden aan deze panels en de afwezigheid van terugbetaling nog een drempel. Ook hier zal meer onderzoek nodig zijn om het totale kostenplaatje volledig in kaart te brengen, waarbij breder gekeken wordt dan alleen het laboratorium (17).

De impact van deze panels op het beleid van de patiënt zal ook nog verder onderzocht moeten worden. Men kan echter verwachten dat dit kan leiden tot een correcter antibioticabeleid, betere infectie controle en mogelijkheid tot sneller ontslaan van de patiënt bij een eventuele virale oorzaak (3, 7, 11, 30).

Er kunnen meerdere strategieën bestaan voor het gebruik van een gastro-intestinaal panel. Zowel voor het routinematig gebruik als voor het gebruik in geselecteerde gevallen bestaan voor- en nadelen. Bacteriële kweek zal bij beide strategieën nodig blijven voor bepaling van het antibiogram en voor epidemiologische redenen.

Aangezien er in het ZOL Genk gekozen is voor de implementatie van het Filmarray Gastro-Intestinaal panel van BioFire, zal deze kit in het volgende deel meer gedetailleerd besproken worden.

2. FilmArray Gastro-intestinaal Panel van BioFire

2.1 Algemene karakteristieken

Het FilmArray Gastro-Intestinaal panel van BioFire Diagnostics is een nested multiplex PCR panel dat in 2014 goedgekeurd werd door de FDA voor de detectie van 22 pathogenen rechtstreeks op een stoelgangsstaal. De test maakt hiervoor gebruik van Cary Blair medium en een totaal volume van 200 microliter. Met dit testpanel is het FilmArray Gastro-Intestinaal panel het meest uitgebreide gastro-intestinale panel momenteel op de markt (3). Onderstaande tabel geeft weer welke bacteriën, virussen en parasieten gedetecteerd worden door het panel (Tabel 1) (3, 29).

Tabel 1: Overzicht van pathogenen gedetecteerd door FilmArray (27)

Bacteriën	Virussen
- <i>Campylobacter</i> species (<i>C. jejuni</i>, <i>C. coli</i>, <i>C. upsaliensis</i>) - <i>C. difficile</i> toxine A/B - <i>Plesiomonas Shigelloides</i> - <i>Salmonella</i> species - <i>Vibrio</i> species (<i>V. parahaemolyticus</i>, <i>V. vulnificus</i>, <i>V. cholerae</i>) - <i>Yersinia enterocolitica</i>,	- Adenovirus F40/41 - Astrovirus - Norovirus GI/II - Rotavirus A - Sapovirus
Enteropathogene E. coli/Shigella	Parasieten
- Enteroaggregatieve <i>E. coli</i> (EAEC) - Enteropathogene <i>E. coli</i> (EPEC) - Enterotoxigene <i>E. coli</i> (ETEC) - Enteroinvasieve <i>E. coli/Shigella</i> (EIEC) - Shiga-like toxine-producerende <i>E. coli</i> (STEC) met specifieke detectie van <i>E. coli</i> O157	- <i>Cryptosporidium</i> - <i>Giardia lamblia</i> - <i>Entamoeba histolytica</i> - <i>Cyclospora cayetanensis</i>

De Filmarray integreert staalvoorbereiding, amplificatie, detectie en analyse in 1 systeem waarbij de totale hand-on-time slechts 2 minuten bedraagt en resultaten beschikbaar zijn na ongeveer 1 uur. Het opzet van dit systeem is dat men per module slechts 1 staal kan analyseren. Het is nu echter mogelijk om tot 8 modules aan te sluiten op 1 computer, waardoor de capaciteit van het systeem verhoogd. (17, 29).

De volledige testreactie verloopt in een gesloten systeem (pouch) wat het risico op contaminatie verhindert. Alle reagentia voor deze testreacties zijn gevriesdroogd aanwezig in deze pouch (29).

2.2 Werkwijze

Voor de gebruiker de pouch in het toestel kan plaatsen en de run kan starten, moet het staal eerst in deze pouch worden gebracht. Hiervoor plaatst men de pouch in een soort cassette (pouch loading system) die de pouch ondersteunt. Eerst voegt men de 'hydration solution' toe in de pouch door deze op de aangeduide plek te doorprikken met de naald aanwezig op de 'hydration solution vial'. Vervolgens wordt de sample buffer samen met het staal in de 'sample injection vial' gebracht, dat na 3 keer zacht opmengen ook in de pouch wordt geïnjecteerd op de aangewezen plaats. De pouch kan vervolgens eenvoudig in het toestel geplaatst worden en de run wordt gestart. Alle reacties verlopen vervolgens volledig automatisch. Na ongeveer een uur wordt het resultaat tevens automatisch gegenereerd (bijlage 2) (29, 31)

Tijdens deze run komt het staal eerst terecht in de lysis kamer waar cellen en virale partikels gelyseerd worden zodat de nucleïnezuren vrijkomen (cell lysis). Deze nucleïnezuren worden gebonden aan magnetische beads en komen vervolgens terecht in de purificatie kamer (nucleic acid purification). Hier zal alle debris worden weggewassen met een wasbuffer, terwijl de nucleïnezuren die gebonden zijn aan de magnetische beads op hun plaats worden gehouden door een magnetisch veld. Nadien worden de nucleïnezuren opnieuw losgemaakt van de magnetische beads met behulp van een elutiebuffer. Deze nucleïnezuren migreren naar de volgende kamer waar de eerste fase PCR reactie zal plaatsvinden (first stage multiplex PCR). In deze fase zal voorafgaand aan de amplificatie alle virale RNA omgezet worden naar DNA met behulp van een reverse transcriptase stap (aangezien de virussen gedetecteerd in het FilmArray Gastro-Intestinaal panel RNA-virussen zijn). Dit wordt gevolgd door de multiplex PCR reactie waarbij zeer veel verschillende reacties plaatsvinden met het gebruik van duizenden primerparen. De resulterende producten worden verdund om resterende primers te limiteren en vervolgens weer vermengd met de volgende PCR reagentia, waaronder een fluorescerende DNA kleurstof (LCGreen Plus). Deze oplossing wordt verdeeld over de wells van de tweede fase PCR stap (second stage PCR). Elke individuele well bevat primers die gericht zijn op 1 specifieke pathogeen (elk in drievoud aanwezig). Deze primers zijn zo ontwikkeld dat ze de specifieke sequenties van het eerste fase product zullen amplificeren. Op deze manier wordt zowel de sensitiviteit als de specificiteit van de test verhoogd. In de laatste stap zal de FilmArray een smeltcurve

genereren door de temperatuur stilaan te verhogen en de fluorescentie in elke well te monitoren (DNA melting analysis). De software verwerkt automatisch de resultaten en zal voor elke pathogeen aangeven of de test positief of negatief is (bijlage 3) (29, 31, 32).

2.3 Performantiekarakteristieken

2.3.1 Analytische performantie

In dit deel worden de kenmerken van het FilmArray Gastro-Intestinaal panel besproken. Hierbij worden steeds de gegevens van de bijsluiter besproken. Indien er een validatie heeft plaatsgevonden van deze gegevens in het ZOL Genk worden deze als tweede puntje vermeld. De uitgebreide gegevens van de firma zijn allen terug te vinden in de FilmArray Gastrointestinal (GI) Panel CE-IVD Instruction Booklet (BioFire Diagnostics, LLC of het FDA rapport (29, 33).

2.3.1.1 Reproduceerbaarheid

1. Hiervoor heeft men een multicentrische studie uitgevoerd waarbij men stalen verzonden heeft naar drie verschillende sites. Elk staal werd gespiked met een combinatie van 4 verschillende pathogenen. Elke pathogeen werd geëvalueerd in drie verschillende concentraties (negatief, laag positief en matig positief). Stalen werden bewaard op zowel 4°C als op -70°C en werden voor beide bewaarcondities op verschillende dagen geanalyseerd. De resultaten uit deze studie tonen aan dat het FilmArray Gastro-Intestinaal panel een goede reproduceerbaarheid heeft voor alle pathogenen met een overall agreement van 99,87% (95% confidentie interval 99,81%-99,92%) (29 33).

2. Deze reproduceerbaarheid werd geverifieerd in het ZOL Genk waarbij twee pools werden gemaakt bestaande uit 5 bacteriën (*Campylobacter jejuni*, *Salmonella typhimurium*, *Yersinia enterocolitica*, *EPEC* en *Shigella flexneri*) en 2 parasieten (*Cryptosporidium* species en *Entamoeba histolytica*). 1 pool met een hoge concentratie en 1 pool met een lage concentratie. Er werd gebruik gemaakt van controlemateriaal, uitgezonderd voor *Entamoeba histolytica*, waarvoor een positief patiënten staal werd gebruikt. De stalen werden geanalyseerd op dag 1, 3 en 5 en werden bewaard bij 2-8°C (de temperatuur waarbij de stalen 4 dagen bewaard zouden kunnen worden volgens de bijsluiter). Voor beide concentraties werden op de drie dagen dezelfde kwalitatieve resultaten bekomen, uitgezonderd voor *E. histolytica*, dat niet meer gedetecteerd kon worden in het sterk positief staal op dag 5 (Tabel 2). De reproduceerbaarheid van *E. histolytica* werd op een later tijdstip herhaald waarbij een staal gespiked werd met enkel *E. histolytica* en op dag 1,3 en 4 werd getest na bewaring bij 2-8°C. Het staal werd op de drie dagen positief getest.

Tabel 2. Reproduceerbaarheid/staalbewaring FilmArray GI panel ZOL Genk

Staalbewaring/Reproduceerbaarheid			
Tijdstip	Dag 1	Dag 3	Dag 5
Zwak positief staal	<i>Campylobacter jejuni</i> <i>Salmonella typhimurium</i> <i>Yersinia enterocolitica</i> EPEC <i>Shigella flexnerii</i> <i>Cryptosporidium</i> sp. <i>Entamoeba histolytica</i>	<i>Campylobacter jejuni</i> <i>Salmonella typhimurium</i> <i>Yersinia enterocolitica</i> EPEC <i>Shigella flexnerii</i> <i>Cryptosporidium</i> sp. <i>Entamoeba histolytica</i>	<i>Campylobacter jejuni</i> <i>Salmonella typhimurium</i> <i>Yersinia enterocolitica</i> EPEC <i>Shigella flexnerii</i> <i>Cryptosporidium</i> sp. <i>Entamoeba histolytica</i>
Sterk positief staal	<i>Campylobacter jejuni</i> <i>Salmonella typhimurium</i> <i>Yersinia enterocolitica</i> EPEC <i>Shigella flexnerii</i> <i>Cryptosporidium</i> sp. <i>Entamoeba histolytica</i>	<i>Campylobacter jejuni</i> <i>Salmonella typhimurium</i> <i>Yersinia enterocolitica</i> EPEC <i>Shigella flexnerii</i> <i>Cryptosporidium</i> sp. <i>Entamoeba histolytica</i>	<i>Campylobacter jejuni</i> <i>Salmonella typhimurium</i> <i>Yersinia enterocolitica</i> EPEC <i>Shigella flexnerii</i> <i>Cryptosporidium</i> sp. /

1.1.1.2. Staalstabiliteit (FDA)

1. Volgens de bijsluiter kunnen stalen bewaard worden tot 4 dagen bij zowel kamertemperatuur als 2-8°C. Om deze staalbewaring te testen werden 10 stalen gespiked met de panel organismen. De stalen werden getest op dag 0 (vers) en nadien op dag 1-4, waarbij enerzijds een aliquot werd bewaard op kamertemperatuur en anderzijds een aliquot in de koelkast. De resultaten ondersteunen de aanbeveling dat staalbewaring kan plaatsvinden voor 4 dagen op zowel kamertemperatuur als in de koelkast (29, 33).

2. De resultaten van de reproduceerbaarheid in het ZOL zijn tevens gebruikt voor evaluatie van de staalbewaring. Er werd enkel gekeken naar staalbewaring bij koelkasttemperatuur. Zoals reeds beschreven kon worden aangetoond dat op alle drie de dagen eenzelfde kwalitatief resultaat werd bekomen, behalve voor *E. histolytica* op dag 5 (Tabel 2). Zoals vermeld bij de reproduceerbaarheid werd de staalbewaring voor deze laatste kiem herhaald op dag 1,3 en 4 met een staal waarin enkel *E. histolytica* werd gespiked. Hierbij werd *E. histolytica* op de drie dagen positief getest.

1.1.1.3. Limit of detection (LoD)

1. De limit of detection is de laagste concentratie van een organisme dat kan worden gedetecteerd, de concentratie waarbij 95% of meer van de stalen positief testen. De LoD werd geschat door verdunningen te maken waarbij stalen werden gespiked met 1 pathogeen

en multiple pathogenen (tot 4 per mix), om zo tevens na te gaan of de gevoeligheid van de test veranderd bij aanwezigheid van meerdere pathogenen. Bevestiging van de LoD gebeurde door organismen te spiken rond de geschatte LoD in 20 afzonderlijke stalen. De geschatte LoD werd bevestigd wanneer in 19/20 stalen het correcte organisme gedetecteerd werd (29, 33).

2. De LoD werd tijdens de validatie in het ZOL gecontroleerd door negatieve stalen te spiken met positief controlemateriaal zodat de eindconcentratie overeenkwam met de LoD zoals aangegeven in deze bijsluiter. Per pathogeen werden 3 stalen getest. De LoD wordt bevestigd wanneer 3/3 positief test voor het correcte organisme. Indien dit niet bevestigd kan worden, wordt de eindconcentratie in het staal verdubbeld tot de concentratie 3 maal gedetecteerd kan worden. Onderstaande tabel geeft de verschillende pathogenen weer die werden getest met het bijhorende resultaat (tabel 3, 4 en 5)

Tabel 3: Detectielimiet bacteriën

Detectielimiet bacteriën				
Pathogeen	<i>C. jejuni</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>Y. enterocolitica</i>	<i>S. flexnerii</i>
Gedetecteerde concentratie	40 000 CFU/ml	10 000 CFU/ml	50 000 CFU/ml	100 CFU/ ml
LoD volgens bijsluiter	40 000 CFU/ml	10 000 CFU/ml	50 000 CFU/ml	100 CFU/ml

Tabel 4: Detectielimiet parasieten

Detectielimiet Parasieten				
Pathogeen	<i>Cryptosporidium</i> sp.	<i>G. lamblia</i>	<i>E. histolytica</i>	<i>C. cayetanensis</i>
Gedetecteerde concentratie	5000 oocysten/ml	5000 kopieën/ml	50 kopieën/ml	6000 ge/ml
LoD volgens bijsluiter	5000 oocysten/ml	2000 kopieën/ml	50 kopieën/ml	180 ge/ml

De LoD's van de bacteriële enteropathogenen konden allen worden bevestigd. Bij de parasieten lag de detectielimiet voor *Giardia lamblia* iets hoger dan verwacht (5000 kopieën/ml ipv 2000 kopieën/ml), maar deze lag nog steeds in dezelfde range (< 0,5 log verschil). De LoD van *Cyclospora cayetanensis* lag duidelijk hoger dan de verwachte detectielimiet (> 1,5 log verschil).

De LoD van de virussen kon niet geverifieerd worden aangezien de eenheden die vermeld worden in de bijsluiter anders zijn dan de eenheden van het aanwezige controlemateriaal. Het controlemateriaal voor adenovirus, rotavirus als norovirus bevat concentraties uitgedrukt in RNA copies/ml. Voor adenovirus wordt de LoD in de bijsluiter uitgedrukt in TCID50/ml en voor rotavirus in FFU/ml. Er bestaat geen conversiefactor om dit om te rekenen. Er werd besloten om de LoD gewoon te objectiveren in RNA copies/ml. Vergelijking met andere panels is dan tevens mogelijk. Momenteel zijn hier nog geen resultaten van.

1.1.1.4. Kruisreactiviteit

I. Voor bepaling van kruisreactiviteit werd gebruik gemaakt van stalen met hoge concentraties aan organismen. Men heeft zowel organismen gebruikt die aanwezig zijn in het gastro-intestinaal panel als off-panel organismen. Deze off-panel organismen werden gekozen op basis van volgende factoren: Verwantschap tot de on-panel organismen, klinische relevantie, waarschijnlijkheid waarmee ze natuurlijk in stoelgang aanwezig zijn, genetische gelijkheid met de primers van het panel. Van de on-panel organismen werd geen enkel foutief resultaat bekomen. Bij de off-panel organismen werd bij enkele organismen wel kruisreactiviteit beschreven. De mogelijke oorzakelijk organismen met kruisreactiviteit staan beschreven in onderstaande tabel. Een positief resultaat voor I van deze organismen zou best geconfirmeerd worden. De andere organismen die werden getest waarbij geen kruisreactiviteit werd gevonden staan in bijlage (bijlage 4) (29, 33).

Tabel 6: Organismen met kruisreactiviteit (*FilmArray Gastrointestinal (GI) Panel CE-IVD Instruction Booklet (BioFire Diagnostics, LLC) (26)*

FilmArray GI Panel Test Result	Cross-Reactive Organism(s)
<i>Entamoeba histolytica</i>	<i>Entamoeba dispar</i>
<i>Giardia lamblia</i>	<i>Bifidobacterium spp.</i> ^a <i>Ruminococcus spp.</i> ^a
Enterotoxigenic <i>E.coli</i> (ETEC) <i>It/st</i> [ETEC 2 assay]	<i>Citrobacter koseri</i> <i>Citrobacter sedlakii</i> <i>Hafnia alvei</i> ^a <i>Cedeceae davisiae</i> ^a
<i>Salmonella</i> ^b	<i>E. coli</i> with variant type III secretion protein ^b
<i>Vibrio</i> (<i>V. parahaemolyticus</i> / <i>V. vulnificus</i> / <i>V. cholerae</i>)	<i>Vibrio alginolyticus</i> <i>Vibrio fluvialis</i> ^c <i>Vibrio mimicus</i> ^c <i>Grimontia</i> (formerly <i>Vibrio</i>) <i>hollisae</i>
<i>Yersinia enterocolitica</i>	<i>Yersinia frederiksenii</i> ^{a,d} <i>Yersinia kristensenii</i> ^d

2. Er werd bij de validatie in het ZOL voornamelijk gekeken naar de kruisreactiviteit bij parasieten. Voor de verificatie van kruisreactiviteit bij *G. lamblia* werd een suspensie gemaakt

van 4,0 McF van *Bifidobacterium* species, die beschreven wordt als mogelijk organisme met kruisreactiviteit voor *G. lamblia*. Ook *Ruminococcus* species kan dit geven, maar omdat we hier geen stam van ter beschikking hadden kon deze niet getest worden. Voor de verificatie van kruisreactiviteit bij *E. histolytica* werden retrospectieve stalen positief voor *Entamoeba dispar* (3 stalen) en *Entamoeba coli* (5 stalen) getest. Er kon met deze beperkte validatie geen kruisreactiviteit worden aangetoond met behulp van de FilmArray voor *G. lamblia* en *E. histolytica* (Tabel 7).

Tabel 7: Overzicht geteste organismen

Getest organisme	Aantal stalen	Resultaat
<i>Entamoeba coli</i>	5	Geen kruisreactiviteit
<i>Entamoeba dispar</i>	3	Geen kruisreactiviteit
<i>Bifidobacterium</i> species	1	Geen kruisreactiviteit

2.3.1.5 Interferentie

Om interferentie en inhibitie te bepalen door aanwezigheid van bepaalde substanties in het stoelgangsstaal werd een uitgebreid panel van mogelijke substanties toegevoegd aan stalen met verschillende organismen. Een overzicht van deze substanties kan worden teruggevonden in bijlage (bijlage 5). Er werden geen interferenties of inhibities aangetoond met deze substantie.

Een bevinding hier was de detectie van Rotavirus stammen die gebruikt worden in de vaccinaties. Het oraal toegediende rotavirus vaccin kan mogelijks aanwezig zijn in de stoelgang na toediening en voor positieve resultaten zorgen op de FilmArray. Het is reeds gekend dat rotavirus vaccinatie zorgt voor shedding in de stoelgang met mogelijke transmissie van het virus. Deze shedding zou aanwezig kunnen zijn gedurende 4-6 dagen en mogelijks zelfs tot 9 dagen na vaccinatie. Tot hoe lang dit detecteerbaar blijft met de FilmArray wordt niet beschreven (35).

Uiteraard kan men niet volledig uitsluiten dat er mogelijke andere inhibitoren aanwezig zijn die voor een negatief resultaat kunnen zorgen (29, 33).

1.1.1.6. Carry-over

De mogelijkheid van carry-over werd bepaald door alternerend stalen met een hoge concentratie van een bepaald organisme te testen, gevolgd door een negatief staal. Er werden in totaal 5 sets van een positief en negatief staal getest. Er werden geen vals positieve resultaten bekomen. Men kan besluiten dat men bij het volgen van de correcte procedure geen risico heeft op carry-over (29, 33).

1.1.1.7. Kwaliteitscontroles

Voor de procescontrole zijn er in elke reagent pouch van de FilmArray twee controles aanwezig: een RNA proces controle en een PCR2 controle. De RNA proces controle heeft als target een sequentie van *Schizosaccharomyces pombe*. Deze gist is gevriesdroogd aanwezig in de pouch en wordt gerehydrateerd wanneer het staal wordt geladen. Een positieve controle van deze gist betekent dat alle stappen van de FilmArray correct werden uitgevoerd. De PCR2 controle heeft als target een DNA sequentie die eveneens gevriesdroogd aanwezig is in de wells van de pouch. Een positief resultaat betekent dat de second stage PCR stap goed verlopen is. De FilmArray software zal de run automatisch afkeuren wanneer de smelttemperatuur voor de RNA proces controle of de PCR2 controle buiten de ingestelde waarden ligt. Wanneer 1 van de controles faalt, zal de software dus automatisch een 'invalid' resultaat geven (29, 33).

2.3.2 Klinische performantie

Voor het bepalen van de klinische performantie werd een multicentrische studie uitgevoerd in 4 verschillende geografische laboratoria in de Verenigde Staten tussen mei en september 2013 (Buss et al.) (3). Er werd gebruik gemaakt van prospectieve patiënten stalen. De stalen werden in Cary-Blair medium ontvangen door de verschillende laboratoria. Elk staal werd binnen de 4 dagen geënt voor cultuur en getest met het FilmArray GI panel. In totaal werden uiteindelijk 1556 patiënten stalen geïncubeerd. Deze stalen waren afkomstig van zowel ambulante als gehospitaliseerde patiënten en het betrof zowel volwassenen als kinderen.

De comparator method voor de meeste bacteriële pathogenen (*Campylobacter* species, *Plesiomonas shigelloides*, *Salmonella* species, *Vibrio* species, *Vibrio cholerae*, *Yersinia enterocolitica* en *E. coli* O157) was de klassieke kweek. Voor alle andere pathogenen was de comparator method een real-time PCR assay, waarbij andere sequenties werden geamplificeerd dan deze gebruikt door de FilmArray.

Een resultaat van de FilmArray werd aanvaard als echt-positief of echt-negatief wanneer het resultaat overeenkwam met de comparator method. Wanneer er discrepantie was tussen beide resultaten werd een PCR test gebruikt die nog andere sequenties target dan deze gebruikt in de FilmArray of de comparator method. Indien geen alternatieve PCR methode kon gebruikt worden werd gebruik gemaakt van dezelfde comparator PCR test volgens een uitgebreidere methode, waarbij het staal 10 maal herhaald werd met 10 extra cycli.

De FilmArray kon in totaal 1180 pathogenen detecteren, waarvan de comparator method er 943 kon oppikken. In vergelijking met de comparator method leverde dit 237 vals positieve resultaten op voor de FilmArray (20,1% van alle gedetecteerd resultaten met FilmArray). Na bijkomende analyse, waarbij deze discordante resultaten verder worden getest met een alternatieve PCR, kon men bij 199 van deze 237 pathogenen bevestigen dat het

gedetecteerde organisme daadwerkelijk aanwezig was. Er waren dus in totaal 38 echt vals positieve resultaten (3,2% van alle gedetecteerde pathogenen). 5 vals positieve resultaten werden verklaard door kruisreactiviteit. Voor de overige 33 vals positieve resultaten werd geen verklaring gevonden. Men kan hier uit besluiten dat de FilmArray meer positieve resultaten oplevert dan de comparator method. De klinische relevantie van deze resultaten werd hier niet verder nagekeken.

In deze studie werden in totaal 832 stalen (53,5%) positief bevonden voor 1 of meerdere pathogenen. In 262 van deze positieve stalen (31,5%) werden multiële pathogenen gevonden. 76% van alle co-infecties bestond uit 2 pathogenen, 19,1% uit drie pathogenen, 3,4% uit 4 pathogenen, 1,1% uit 5 pathogenen en zelfs 1 staal (0,4%) bestond uit 6 pathogenen. De meest frequente combinatie was *C. difficile* met EPEC, gevolgd door EAEC met EPEC. Er konden echter geen significante associaties gevonden worden in bepaalde combinaties van pathogenen en bijna alle pathogenen kwamen voor in co-infecties.

Voor 12/22 pathogenen werd een sensitiviteit/PPA van 100% gevonden: *P. shigelloides*, *Salmonella* species, *Y. enterocolitica*, ETEC, STEC, *E. coli* O157, *Cryptosporidium* species, *C. cayetanensis*, *G. lamblia*, astrovirus, rotavirus en sapovirus. Voor de andere pathogenen (7/12) werd een sensitiviteit/PPA bekomen van $\geq 94,5\%$: *Campylobacter* species, *C. difficile*, EAEC, EPEC, *Shigella* species/EIEC, adenovirus F40/41 en norovirus GI/GII. Voor de overige 3 pathogenen kon geen sensitiviteit/PPA worden berekend omdat deze helemaal niet gedetecteerd werden door geen enkele test: *Vibrio* species, *Vibrio cholerae* en *E. histolytica*. De specificiteit/NPA voor al deze targets was $\geq 97,1\%$ (cfr bijlage 6) (3).

Om de sensitiviteit/PPA te berekenen van *Vibrio* species, *Vibrio cholerae* en *E. histolytica* werden door de firma nog extra retrospectieve stalen getest als ook stalen gespiked met deze pathogenen. Men kwam zo op een sensitiviteit/PPA van 88% voor *E. histolytica*, 97,4% voor *Vibrio* species en 84,6% voor *Vibrio cholerae* (30). Ook voor enkele andere micro-organismen waarvoor weinig positieve stalen waren in de genoemde studie (*Y. enterocolitica*, *P. Shigelloides*, *E. coli* O157, astrovirus, rotavirus) werden nog bijkomende stalen getest. Men kwam zo ook op een sensitiviteit/PPA van 100%, uitgezonderd voor rotavirus, waar een sensitiviteit berekend werd van 96,9% in plaats van 100%.

Een andere studie, de studie van Khare et al, waarbij het FilmArray Gastro-Intestinaal panel vergeleken werd met de xTag Luminex GPP, kon eveneens een goede sensitiviteit en specificiteit aantonen voor de FilmArray. Het betrof hier echter wel een studie op een veel kleiner aantal stalen (230 stalen) in vergelijking met de eerste studie. Globaal genomen kwam men hier voor de FilmArray op een sensitiviteit van $>90\%$ voor alle pathogenen (uitgezonderd voor *Aeromonas* species, cfr infra) en een specificiteit $> 96\%$ (cfr bijlage 7) (7).

Wat betreft *Aeromonas* species, werd door de studie van Buss et al. een sensitiviteit van 80% berekend en een specificiteit van 100% (3). De studie van Khare et al. vond echter maar een sensitiviteit van 23,8% in vergelijking met klassieke kweek. Mogelijks kan het groot verschil in

deze cijfers verklaard worden daar in de studie van Khare et al. stalen werden gebruikt die > 1 maand waren ingevroren, in vergelijking met de studie van Buss et al. waarbij verse stalen werden gebruikt (7). De detectie van *Aeromonas* species is echter omwille van de lage sensitiviteit in vergelijking met de gouden standaard (cultuur) niet FDA-approved voor de FilmArray.

2.3.3 Methodevergelijking ZOL Genk

2.3.3.1 Werkwijze

Voor de methodevergelijking werden in totaal 48 positieve stalen getest waarvan 22 stalen positief voor parasieten (9 *Giardia lamblia*, 8 *Cryptosporidium* species, 5 *Entamoeba histolytica*), 17 voor bacteriën (5 *Campylobacter* species, 5 *Yersinia enterocolitica*, 5 *Salmonella* species, 2 *Shigella* species) en 9 voor virussen (3 norovirus, 3 rotavirus, 3 adenovirus). *Cyclospora cayetanensis*, de enteropathogene *E. coli* stammen, sapovirus en astrovirus werden niet gedaan omdat hier geen stammen voor beschikbaar waren en geen in-house methode voor aanwezig was ter vergelijking. Daarnaast werden ook 6 microscopisch negatieve stalen voor parasieten geverifieerd waarbij bacteriële kweek negatief was en andere antigeen-testen niet gekend waren.

Bij discordanties werden de stalen verder getest. Voor de parasieten werd een antigeentest ingezet en gebeurde een nieuw microscopisch onderzoek. Wanneer er blijvende discordanties waren en voor discordanties bij bacteriën en virussen werden de stalen verstuurd naar een ander (referentie)laboratorium.

2.3.3.2 Resultaten (Bijlage):

A. Bacteriën: Er werd vertrokken van stalen in de staalbewaring (-80°C) die in het verleden positief waren gebleken met de klassieke kweek (2010-2016). 16 van de 17 geteste stalen (94,1%) gaven een concordant resultaat. 1 staal dat positief was voor *Salmonella* groep B met klassieke kweek, werd negatief bevonden door het panel. Er werd getracht dit staal opnieuw te kweken, maar de kweek bleef negatief. Mogelijks kon er geen groei meer bekomen worden na langdurige bewaring bij -80°C (het betrof een staal van 2012). Een andere mogelijke verklaring is staalverwisseling of foutieve initiële identificatie. Er werd geen andere PCR gedaan op het oorspronkelijk staal om dit te verifiëren. De resultaten zijn weergegeven in tabel 8.

Tabel 8: Resultaten methodevergelijking bacteriën

Methodevergelijking bacteriën		
Getest organisme	Aantal geteste stalen	% concordante resultaten
<i>Campylobacter</i> species	5	5/5 (100%)
<i>Y. enterocolitica</i>	5	5/5 (100%)

<i>Salmonella</i> species	5	4/5 (80%)
<i>Shigella</i> species	2	2/2 (100%)

2. Virussen: Voor de virale pathogenen werd gebruik gemaakt van retrospectieve stalen (2016 en 2017) in staalbewaring (-20°C en -80°C) die positief waren met de antigeentesten. Er werd ook 1 prospectief patiënten staal geïncubeerd. Het betrof een stoelgangstaal bij een patiënte met symptomen van een ernstige acute gastro-enteritis waarop enkel bacteriële kweek was gevraagd, die negatief bleek. Op advies van de microbioloog werd een FilmArray Gastro-Intestinaal panel ingezet dat een positief resultaat gaf voor rotavirus. Dit resultaat werd bevestigd door een positieve antigeentest. In totaal werden 9 stalen getest. 9/9 stalen (100%) gaven een concordant resultaat (tabel 9).

Tabel 9: Resultaten methode vergelijking virussen

Methodevergelijking virussen		
Getest organisme	Aantal geteste stalen	% concordante resultaten
Adenovirus	3	3/3 (100%)
Rotavirus	3	3/3 (100%)
Norovirus	3	3/3 (100%)

3. Parasieten: Er werden zowel retrospectieve stalen (2010-2016) uit de staalbewaring (-80°C) als prospectieve stalen gebruikt. Alle 22 stalen (100%) gaven een concordant resultaat met beide technieken. (tabel 10).

Tabel 10: Resultaten methodevergelijking parasieten

Methodevergelijking parasieten		
Getest organisme	Aantal geteste stalen	% concordante resultaten
<i>Giardia lamblia</i>	9	9/9 (100%)
<i>Cryptosporidium</i> species	8	8/8 (100%)
<i>Entamoeba histolytica</i>	5	5/5 (100%)

Samenvattend werden 47 van deze 48 positieve stalen correct geïdentificeerd door de Filmarray wat resulteert in een overall agreement van 97.9%.

Naast deze 48 positieve stalen werden ook 6 stalen geanalyseerd die microscopisch negatief waren voor parasieten en negatief waren met bacteriële kweek. De stalen werden zowel met de FilmArray als de in-house PCR getest. Bij al deze stalen werd uiteindelijk wel een

enteropathogeen gedetecteerd door de FilmArray. Waar mogelijk werd dit resultaat bevestigd met een andere test (antigeentest en/of 2^{de} microscopisch onderzoek). Alleen sapovirus kon zo niet bevestigd worden aangezien er geen test voor aanwezig is (Tabel II). De positieve stalen voor sapovirus zullen echter nog worden doorgestuurd voor bevestiging naar het REGA instituut.

Tabel II: Resultaten van 6 microscopisch negatieve stalen

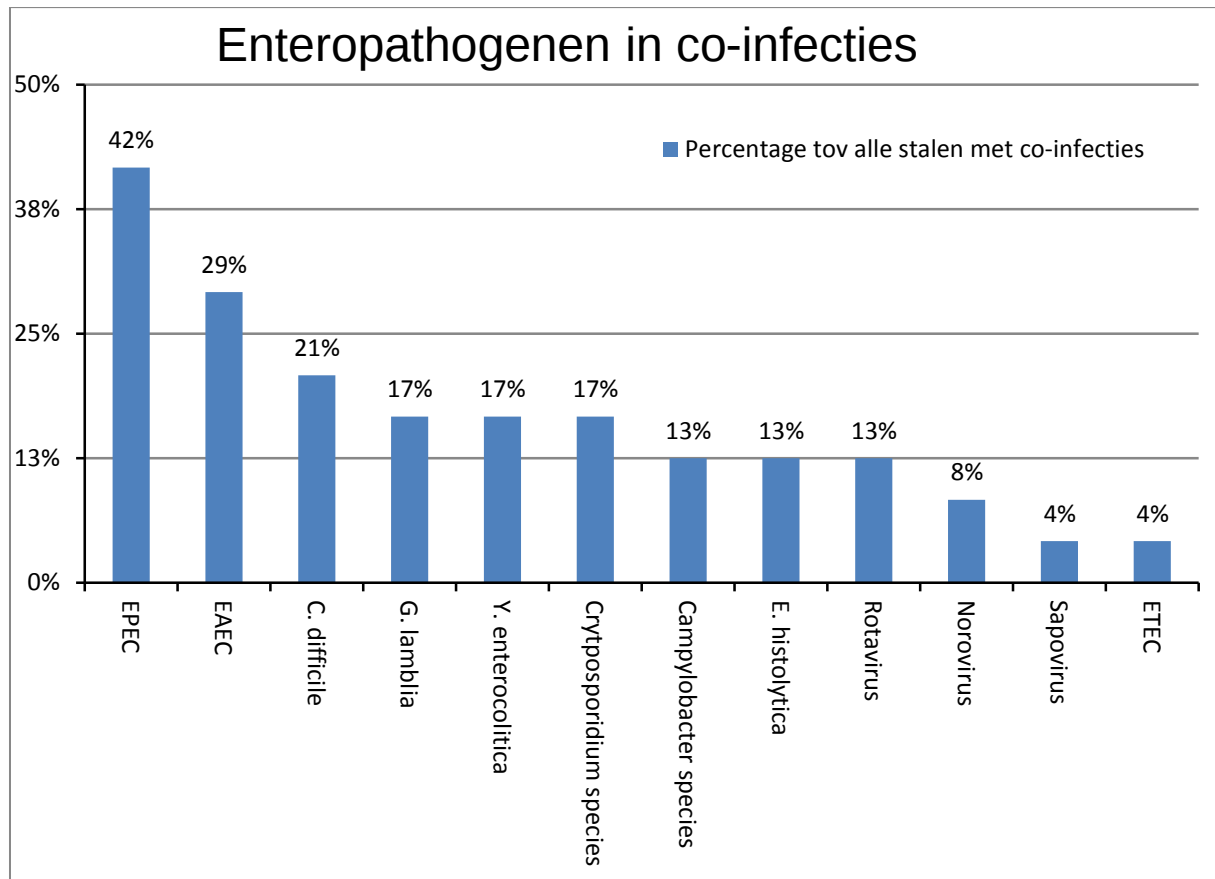
Nr.	1 ^{ste} microscopie parasieten	In-house PCR	FilmArray	Antigeen - test	2 ^{de} microscopie	Conclusie
1	Negatief	Niet gedetecteerd	<i>G. lamblia</i>	Negatief	Onvoldoende staal	Discordant
2	Negatief	/	Rotavirus	Positief	/	Positief voor Rotavirus
3	Negatief	/	Norovirus	Positief	/	Positief voor norovirus
4	Negatief	/	Norovirus	Positief	/	Positief voor norovirus
5	Negatief	<i>G. lamblia</i>	<i>G. lamblia</i>	Negatief	Positief <i>G. lamblia</i>	Positief voor <i>G. lamblia</i>
6	Negatief	/	Sapovirus	/	/	/

1.1.1.3. Co-infecties

Bij de stalen gebruikt voor vergelijking van bacteriën werden in 10/17 stalen (58,8%) meerdere pathogenen gedetecteerd, waarvan 1 staal positief voor 3 pathogenen (*Salmonella* species, rotavirus, norovirus). Bij de virussen werden co-infecties vastgesteld bij 4/9 stalen (44,4%). Bij de parasieten in 10/22 stalen (45,5%). Hier varieerde het aantal kiemen per co-infectie van 2 kiemen tot zelfs 1 staal met 4 kiemen (*Cryptosporidium* species, *Campylobacter* species, EAEC, EPEC). STEC werd ook 1 maal gedetecteerd als co-infectie, maar werd door het referentiecentrum niet bevestigd. De aanwezigheid van de andere co-infecties werd niet bevestigd met een andere test.

Samenvattend werden in 24/48 of 50% van de stalen co-infecties gevonden. De drie meest voorkomende pathogenen waren EPEC, EAEC en *C. difficile*. In tabel 12 staat per organisme weergegeven in hoeveel procent van de stalen met co-infecties deze voorkwamen.

Tabel 12: Percentages van enteropathogenen in de stalen met co-infecties



Omdat het zowel in talrijke studies als in onze eigen beperkte dataset duidelijk is dat men vaak meerdere pathogenen detecteert, werd nog extra geverifieerd of de FilmArray in staat is om alle aanwezige pathogenen te detecteren in een staal. Hiervoor werden er 3 pools gemaakt (Tabel 12).

Tabel 12: Detectie multipale pathogenen met FilmArray

Pool	Pathogenen per pool	Resultaat Filmarray GI panel
1	<i>Cryptosporidium</i> sp. EHEC, <i>Campylobacter</i> sp.	<i>Cryptosporidium</i> sp. STEC-EHEC, <i>Campylobacter</i> sp.
2	<i>Giardia lamblia</i> , <i>Salmonella</i> sp. <i>Y. enterocolitica</i>	<i>Giardia lamblia</i> , <i>Salmonella</i> sp <i>Y. enterocolitica</i>

3	<i>Campylobacter</i> sp. <i>Toxigene Clostridium difficile</i> , <i>Salmonella</i> sp. <i>Vibrio cholera</i> , <i>Yersinia enterocolitia</i> , STECC, <i>E. coli</i> O157 <i>Shigella</i> sp. <i>Cryptosporidium</i> sp. <i>Cyclospora cayetanensis</i> <i>Giardia lamblia</i> <i>Entamoeba histolytica</i>	<i>Campylobacter</i> sp. <i>Clostridium difficile</i> tox A/B <i>Salmonella</i> sp. <i>Vibrio (Vibrio cholera)</i> <i>Yersinia enterocolitia</i> STECC, <i>E. coli</i> O157 <i>Shigella</i> /EIEC <i>Cryptosporidium</i> sp. <i>Cyclospora cayetanensis</i> <i>Giardia lamblia</i> /
---	--	---

De FilmArray kon alle pathogenen detecteren in de 3 pools, uitgezonderd voor *E. histolytica* in pool 3. Bij de validatie van de reproduceerbaarheid zag men dat deze kiem ook niet meer gedetecteerd kon worden in een staal met 7 verschillende pathogenen op dag 5. Mogelijks kan *E. histolytica* minder efficiënt gedetecteerd worden in een staal met zoveel pathogenen. Het lijkt echter in de praktijk niet realistisch dat 1 stoelgangstaal zoveel pathogenen bevat.

2.5 Besluit FilmArray

We kunnen besluiten dat de FilmArray een robuuste test is. De test combineert een goede performantie met een minimale hands-on-time (2 minuten), een gelijktijdige screening van een uitgebreid panel en een korte run-time van slechts 1 uur. Hierdoor kan het de TAT enorm verlagen en heeft de test het potentieel om zowel de workload als de aanvraag door de behandelende arts sterk te vereenvoudigen. De mogelijkheid om 8 modules op 1 computer aan te schakelen vergroot de capaciteit van de test.

3. Implementatie gastro-intestinale panel in het ZOL Genk

Zoals reeds aangehaald is voornamelijk de kostprijs van moleculaire panels nog een drempel voor een grootschalige routinematige implementatie (17). De FilmArray is daarbij 1 van de duurdere panels op de markt momenteel. De test is ook niet terugbetaald en de kost is dus nog integraal voor de patiënt. Tegenover deze kost staan natuurlijk de talrijke voordelen van het gastro-intestinale panel, die mogelijks op breder niveau een besparing kunnen betekenen (cfr supra) (4, 17, 28).

Om een idee te krijgen van het kostenplaatje in het ZOL Genk werd de totale kostprijs van de conventionele technieken die hier worden gebruikt vergeleken met deze van de FilmArray (reagentia en personeelskosten). Uit deze kostenberekening blijkt dat wanneer men alle mogelijke testen samen zou aanvragen, men op een kost uitkomt van 47.2 euro indien geen GeneXpert werd ingezet (GDH screening negatief) en op 84.6 euro indien wel GeneXpert werd ingezet (GDH positief) (tabel 13). Wat betreft de FilmArray ligt de catalogusprijs per kit momenteel rond de 100 euro. Als men hierbij de prijs per Fecal Swab

Cairy-Blair en de personeelskost optelt, respectievelijk 1.3 euro (per swab) en 1.4 euro (2 minuten hands-on-time), komt men op 102.7 euro. Hieruit kan worden besloten dat wanneer alle testen worden ingezet, inclusief GeneXpert voor *C. difficile*, de kosten voor de conventionele testen toch lager blijven dan de FilmArray. Het verschil is echter de grotere werkbelasting, de langere TAT voor bacteriële pathogenen en de afwezigheid van detectie van enteropathogene *E. coli* stammen, sapovirus en astrovirus met deze conventionele methode.

Er moet wel worden opgemerkt dat het inzetten van het antibiogram niet werd verrekend in deze kostprijs voor zowel de conventionele methoden als voor de FilmArray. De totale kostprijs van een volledig uitgewerkt staal zal dus voor beide methoden hoger liggen. Daarnaast zal er bij de FilmArray eerst nog een gewone plaat moeten worden geënt om groei te bekomen alvorens het antibiogram kan worden ingezet.

Tabel 13: Overzicht kostenberekening conventionele methoden

Kostenberekening				
Test	Prijs per staal (euro)	Hands-on time (minuten)	Kost MLT in euro (0,69 euro/minuut)	Totaal in euro* (MLT + staal)
Bacteriële kweek	5,1	15	10,4	
Clostridium difficile				
GDH negatief (inzetten GDH)	4,0	3	2,1	
GDH positief (+ inzetten GeneXpert)	37,9	5	3,5	
Rota-/adenovirus	2,8	2	1,4	
Norovirus	3,4	2	1,4	
Parasieten	3,0	20	13,8	
TOTAAL (zonder GeneXpert <i>C. difficile</i>)	18,2	42	29,0	47,2
TOTAAL (met GeneXpert <i>C. difficile</i>)	52,2	47	32,4	84,6

*In deze prijsberekening werden enkele sporadisch gebruikte testen niet meegerekend waaronder *Giardia* en *Cryptosporidium* sneltest en drySPOT *E. coli* O157. Indien deze meegerekend zouden worden zou deze kostprijs hoger liggen aangezien de kostprijs van deze testen per stuk ook enkele euro's bedraagt: *Giardia* sneltest 6.187 euro/stuk, *Cryptosporidium* sneltest 3.392 euro/stuk en drySPOT *E. coli* O157 1.420 euro/stuk.

In het ZOL Genk is momenteel gekozen om de klassieke manier van werken te behouden en het FilmArray Gastro-Intestinaal panel aan te bieden voor geselecteerde gevallen, namelijk patiënten met ernstige diarree. Op het aanvraagformulier wordt dit syndroom gerelateerd panel vermeld bij de moleculaire testen onder 'gastro-enteritis'. Er wordt gevraagd naar klinische inlichtingen (fig. 1). Er wordt ook vermeld dat deze test niet terugbetaald is voor de patiënt. Er wordt momenteel nagedacht of een gastro-intestinaal panel volledig in de routine zou kunnen gebruikt worden (cfr supra 1.2.3). Naarmate de ervaring met deze syndroom gerelateerde panels groeit, zal dit mogelijks antwoorden bieden. Er zal in de toekomst ook gekeken worden naar andere panels naast de FilmArray.

Gastro-intestinaal panel (*) €

Faeces

Panel omvat: *Campylobacter species*, *Clostridium difficile*, *Plesiomonas shigelloides*, *Salmonella species*, *Vibrio species*, *Yersinia enterocolitica*, *Enteraggregative E.coli*, *Enteropathogenic E.coli*, *Enterotoxigenic E.coli*, *Shigella-like toxin-producing E.coli*, *E.coli* O157, *Shigella/Enteroinvasive E.coli*, *Adenovirus F40/41*, *Astrovirus*, *Norovirus GI/GII*, *Rotavirus A*, *Sapovirus*, *Cryptosporidium species*, *Cyclospora cayetanensis*, *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia*.

85061 ☐ Ernstige gastro-enteritis *

(*) Klinische inlichtingen vereist

Figuur 1: Aanvraagformulier Gastro-intestinaal panel

To Do/actions

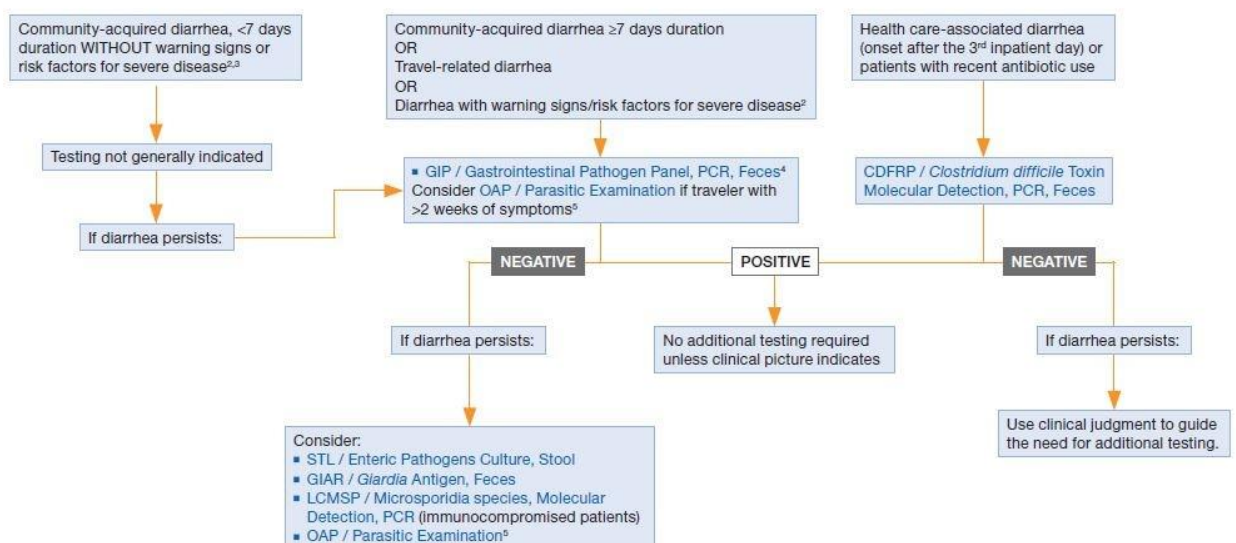
- Het algoritme van stoelgangsonderzoek in het ZOL Genk herevalueren en nakijken welke plaats een syndroom gerelateerd panel kan hebben.
- Evalueren welk panel, naast de FilmArray, mogelijks in aanmerking zou komen.
- De literatuur opvolgen met betrekking tot enkele openstaande vragen: Totale impact op het patiëntenbeleid en kosten, klinische relevantie van de resultaten.

Bijlagen

Bijlage I: Algoritme infectieuze diarree Mayo Medical Laboratories (26). Laboratory Testing for



Laboratory Testing for Infectious Causes of Diarrhea¹



¹ This panel should NOT be used for chronic diarrhea.

² Warning signs and risk factors for severe disease include fever, bloody diarrhea, dysentery, severe abdominal pain, dehydration, hospitalization, and immunocompromised state.

³ During the summer, consider ordering STFRP / Shiga toxin, Molecular Detection, PCR, Feces on children with diarrhea even if they don't have frankly bloody diarrhea, are not toxic-appearing, and diarrhea has been present <7 days.

⁴ GI Pathogen Panel tests for common bacterial, viral and parasitic causes of diarrhea

⁵ Submit 3 stool collected on separate days for maximum sensitivity

Note: In outbreak scenarios with a known organism, consider ordering a specific test for that organism (CYCL / Cyclospora Stain, CRYPS / Cryptosporidium Antigen, Feces, GIAR / Giardia Antigen, Feces, bacterial stool culture)

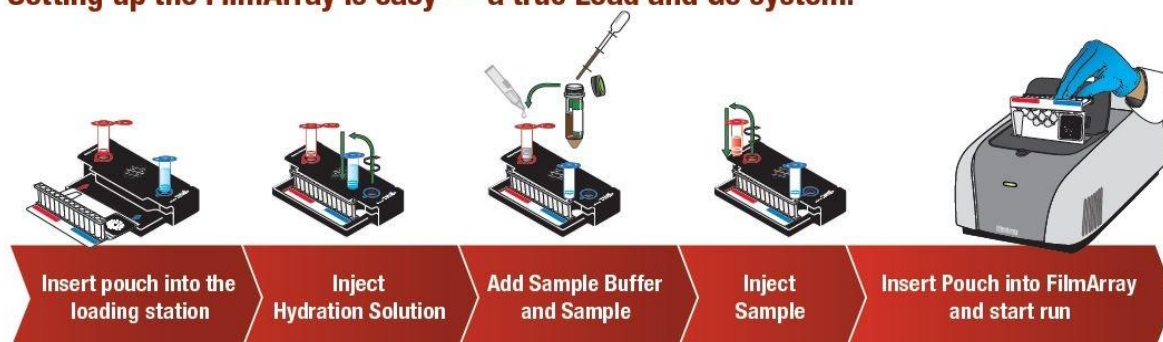
© Mayo Foundation for Medical Education and Research (MFMER). All rights reserved.
MAYO, Mayo Medical Laboratories and the triple-shield Mayo logo are trademarks and/or service marks of MFMER.

Reviewed 8/2016

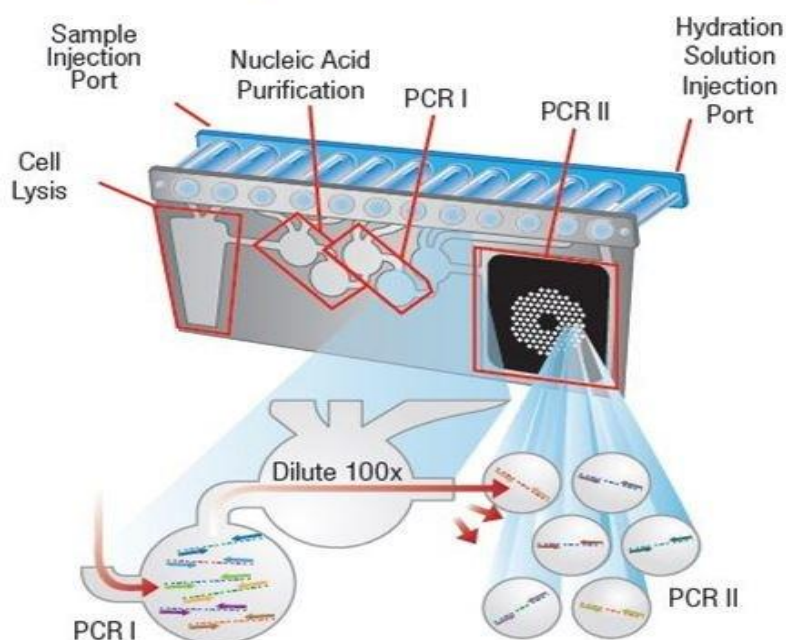
Infectious Causes of Diarrhea. Mayo Medical laboratories (Mayo Clinic). 2017. Available: <http://www.mayomedicallaboratories.com/test-catalog/Clinical+and+Interpretive/63169>.)

Bijlage 2: Voorbereiding van de FilmArray : klaarmaken van de pouch
(FilmArray GI panel brochure, Biomerieux Diagnostics)

Setting up the FilmArray is easy — a true Load and Go system.



The FilmArray Pouch



Bijlage 3:
De
FilmArray
pouch
(FilmArray
GI panel
brochure,
Biomerieux
Diagnostics)

Bijlage 4: Organismen waarbij geen kruisreactiviteit werd gevonden
(FilmArray Gastrointestinal (GI) Panel CE-IVD Instruction Booklet (BioFire Diagnostics, LLC).

Table 40. No Cross-Reactivity with FilmArray GI Panel Assays (Observed or Predicted by *in silico* Analysis)

BACTERIA				
Tested				
<i>Abiotrophia defectiva</i>	<i>Campylobacter mucosalis</i>	<i>Desulfovibrio piger</i>	<i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>Ruminococcus flavefaciens</i> ^a
<i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>Campylobacter rectus</i>	Diffusely adherent <i>E. coli</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Ruminococcus obeum</i> ^a
<i>Acinetobacter lwoffii</i>	<i>Campylobacter showae</i>	<i>Escherichia blattae</i>	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Selenomonas ruminantium</i>
<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>Campylobacter sputorum</i>	<i>Escherichia fergusonii</i>	<i>Lactobacillus reuteri</i>	<i>Serratia liquefaciens</i>
<i>Alcaligenes faecalis</i>	<i>Campylobacter ureolyticus</i>	<i>Escherichia hermannii</i>	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Serratia marcescens</i>
<i>Anaerococcus tetradius</i>	<i>Cedecea davisae</i> ^b	<i>Escherichia vulneris</i>	<i>Leminorella grimmii</i>	<i>Shewanella algae</i>
<i>Arcobacter butzleri</i>	<i>Chlamydia trachomatis</i>	<i>Edwardsiella tarda</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Arcobacter cryaerophilus</i>	<i>Citrobacter amalonaticus</i>	<i>Eggerthella lenta</i>	<i>Megamonas hypermegale</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
<i>Bacillus cereus</i>	<i>Citrobacter freundii</i>	<i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>Megasphaera elsdenii</i>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
<i>Bacteroides fragilis</i>	<i>Clostridium acetobutylicum</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Methanobrevibacter smithii</i>	<i>Streptococcus agalactiae</i>
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	<i>Clostridium botulinum</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Morganella morganii</i>	<i>Streptococcus intermedius</i>
<i>Bacteroides vulgatus</i>	<i>Clostridium difficile</i> non-toxigenic ^c	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Peptoniphilus asaccharolyticus</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i>
<i>Bifidobacterium adolescentis</i> ^a	<i>Clostridium histolyticum</i>	<i>Eubacterium cylindroides</i>	<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	<i>Streptococcus salivarius</i>
<i>Bifidobacterium bifidum</i> ^a	<i>Clostridium methylpentosum</i>	<i>Eubacterium rectale</i>	<i>Photobacterium damsela</i>	<i>Streptococcus suis</i>
<i>Bifidobacterium longum</i> ^a	<i>Clostridium novyi</i>	<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	<i>Porphyromonas asaccharolytica</i>	<i>Trabulsiella guamensis</i>
<i>Campylobacter concisus</i>	<i>Clostridium perfringens</i>	<i>Fusobacterium varium</i>	<i>Prevotella melaninogenica</i>	<i>Veillonella parvula</i>
<i>Campylobacter curvus</i>	<i>Clostridium ramosum</i>	<i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Yersinia bercovieri</i>
<i>Campylobacter fetus</i>	<i>Clostridium septicum</i>	<i>Gemella morbillorum</i>	<i>Proteus penneri</i>	<i>Yersinia frederiksenii</i> ^d
<i>Campylobacter gracilis</i>	<i>Clostridium sordellii</i>	<i>Haemophilus influenzae</i>	<i>Proteus vulgaris</i>	<i>Yersinia intermedia</i>
<i>Campylobacter helveticus</i>	<i>Clostridium tetani</i>	<i>Hafnia alvei</i> ^b	<i>Providencia alcalifaciens</i>	<i>Yersinia mollaretii</i>
<i>Campylobacter hominis</i>	<i>Collinsella aerofaciens</i>	<i>Helicobacter fennelliae</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>
<i>Campylobacter hyointestinalis</i>	<i>Corynebacterium genitalium</i>	<i>Helicobacter pylori</i>	<i>Ruminococcus bromii</i> ^a	<i>Yersinia rohdei</i>
<i>Campylobacter lari</i>				
PROTOZOA/PARASITES				
Tested		In silico Analysis Only		FUNGI
<i>Babesia microti</i>	<i>Entamoeba moshkovskii</i>	<i>Ancylostoma duodenale</i>	<i>Entamoeba hartmanni</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>
<i>Blastocystis hominis</i>	<i>Giardia muris</i>	<i>Ascaris lumbricoides</i>	<i>Entamoeba polecki</i>	<i>Candida albicans</i>
<i>Conidiobolus lachnoides</i>	<i>Pentatrichomonas hominis</i>	<i>Balantidium coli</i>	<i>Enterobius vermicularis</i>	<i>Candida catenulata</i>
<i>Conidiobolus lobatus</i>	<i>Schistosoma mansoni</i>	<i>Chilomastix mesnili</i>	<i>Enteromonas hominis</i>	<i>Penicillium marneffei</i>
<i>Encephalitozoon hellem</i>	<i>Toxoplasma gondii</i>	<i>Dientamoeba fragilis</i>	<i>Isospora belli</i>	<i>Saccharomyces boulardii</i>
<i>Encephalitozoon intestinalis</i>	<i>Trichomonas tenax</i>	<i>Endolimax nana</i>	<i>Necator americanus</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>Entamoeba gingivalis</i>		<i>Entamoeba coli</i>		
VIRUSES				
Tested		In silico Analysis Only		
Adenovirus A:31	Adenovirus E:4a	Coronavirus 229E	Enterovirus 68	Adenovirus G52
Adenovirus B:34	Astrovirus variant VA1	Coxsackievirus B3	Hepatitis A	Norovirus GIV

Bijlage 5: Geteste substanties voor interferentie.

(FilmArray Gastrointestinal (GI) Panel CE-IVD Instruction Booklet (BioFire Diagnostics, LLC).

Table 43. Endogenous and Exogenous Substances Tested – No Interference

Endogenous Substances	Exogenous Substances	
Human Whole Blood	Bacitracin	Glycerin
Triglycerides	Doxycycline	Hydrocortisone
Cholesterol	Nystatin	Loperamide hydrochloride
Fatty acids (palmitic acid)	Metronidazole	Magnesium hydroxide
Fatty acids (stearic acid)	Naproxen sodium	Mineral oil
Bovine Mucin ^a	Bisacodyl	Phenylephrine hydrochloride
Human Bile	Bismuth subsalicylate	Sodium phosphate
Human Urine	Calcium carbonate	Nonoxynol-9
Human stool (overflow of Cary Blair vial)	Docusate sodium	Bleach
		Ethanol

^a Unexpected EPEC results reported due to contamination of the mucin with EPEC nucleic acid.

Bijlage 6: Overzicht van sensitiviteit/PPA en specificiteit/NPA FilmArray GI panel Buss et al. (3) (Buss SN, Leber A, Chapin K, et al. Multicenter evaluation of the BioFire FilmArray gastrointestinal panel for etiologic diagnosis of infectious gastroenteritis. J Clin Microbiol. 2015 Mar;53(3):915-25.)

TABLE 5 Performance summary and characteristics of the FilmArray GI Panel versus those of comparator assays (stool culture or PCR and sequencing)

Analyte	No. of detections ^a		Sensitivity/PPA ^b			Specificity/NPA ^b		
	C	FA	TP/(TP+FN)	%	95% CI (%)	TN/(TN+FP)	%	95% CI (%)
<i>Campylobacter</i> spp.	35	58	34/35	97.1	85.1–99.9	1,497/1,521	98.4	97.7–99.0
<i>C. difficile</i>	165	204	163/165	98.8	95.7–99.9	1,350/1,391	97.1	96.0–97.9
<i>P. shigelloides</i>	3	18	3/3	100	29.2–100	1,538/1,553	99.0	98.4–99.5
<i>Salmonella</i> spp.	31	37	31/31	100	88.8–100	1,519/1,525	99.6	99.1–99.9
<i>Vibrio</i> spp.	0	2	0/0			1,554/1,556	99.9	99.5–100
<i>V. cholerae</i>	0	1	0/0			1,555/1,556	99.9	99.6–100
<i>Y. enterocolitica</i>	1	1	1/1	100	NA ^c	1,555/1,555	100	99.8–100
EAEC	83	109	82/83	98.8	93.5–100	1,446/1,473	98.2	97.3–98.8
EPEC	317	348	314/317	99.1	97.3–99.8	1,167/1,201	97.2	96.1–98.0
ETEC	22	31	22/22	100	84.6–100	1,525/1,534	99.4	98.9–99.7
STEC	33	38	33/33	100	89.4–100	1,518/1,523	99.7	99.2–99.9
<i>E. coli</i> O157	3	4	3/3	100	29.2–100	34/35	97.1	85.1–99.9
<i>Shigella</i> spp./EIEC (culture) ^d	49 (31)	49	47/49	95.9	86.0–99.5	1,505/1,507	99.9	99.5–100
<i>Cryptosporidium</i> spp.	18	24	18/18	100	81.5–100	1,532/1,538	99.6	99.2–99.9
<i>C. cayetanensis</i>	19	19	19/19	100	82.4–100	1,537/1,537	100	99.8–100
<i>E. histolytica</i>	0	0	0/0			1,556/1,556	100	99.8–100
<i>G. lamblia</i>	20	27	20/20	100	83.2–100	1,529/1,536	99.5	99.1–99.8
Adenovirus F 40/41	44	55	42/44	95.5	84.5–99.4	1,499/1,512	99.1	98.5–99.5
Astrovirus	7	8	7/7	100	59.0–100	1,548/1,549	99.9	99.6–100
Norovirus GI/GII	55	70	52/55	94.5	84.9–98.9	1,483/1,501	98.8	98.1–99.3
Rotavirus A	6	18	6/6	100	54.1–100	1,538/1,550	99.2	98.7–99.6
Sapovirus	46	59	46/46	100	92.3–100	1,497/1,510	99.1	98.5–99.5

^a C, comparator method as defined in Table 1; FA, FilmArray GI Panel.

^b Targets that utilized clinical reference standard comparator methods (i.e., stool culture) are reported in terms of sensitivity and specificity. However, the terms positive and negative percent agreement (PPA and NPA, respectively) are typically used to describe performances for analytes that used PCR as a reference. As detailed in Materials and Methods, sensitivity is calculated in the same manner as is PPA, and specificity is calculated in the same manner as is NPA. CI, confidence interval.

^c NA, not applicable.

^d Molecular methods targeting both *Shigella* spp. and EIEC were utilized for comparator testing and calculation of FilmArray GI Panel performance characteristics. However, culture was used by the clinical study sites to identify *Shigella* spp. for informational purposes, and the culture results are noted in parentheses.

Bijlage 7: Sensitiviteit en specificiteit FilmArray in de studie van Khare et al. (6)
 (Khare R, Espy MJ, Cebelski E et al. Comparative evaluation of two commercial multiplex panels for detection of gastrointestinal pathogens by use of clinical stool specimens. J Clin Microbiol. 2014 Oct;52(10):3667-73)

TABLE 2 Comparison of two commercial multiplex panels for routine tests using prospective stool samples (*n* = 230)^a

Target ^b	FilmArray ^c				Luminex				FilmArray ^d		Luminex ^e	
	TN	TP	FP	FN	TN	TP	FP	FN	Sensitivity (95% CI)	Specificity (95% CI)	Sensitivity (95% CI)	Specificity (95% CI)
<i>Aeromonas</i> spp.	84	1	0	0					100 (16.7, 100)	100 (94.8, 100)		
<i>Campylobacter</i> spp.	227	3	0	0	227	3	0	0	100 (38.3, 100)	100 (98, 100)	100 (38.3, 100)	100 (98, 100)
<i>Clostridium difficile</i> toxin A/B	198	24	7	0	200	23	6	1	100 (83.7, 100)	96.6 (93.0, 98.5)	95.8 (78.1, 99.9)	97.2 (93.8, 98.8)
<i>Plesiomonas shigelloides</i>	88	0	0	0					ND	100 (95, 100)		
<i>Salmonella</i> spp.	228	1	1	0	229	1	0	0	100 (16.7, 100)	99.6 (97.3, 99.9)	100 (16.7, 100)	100 (98, 100)
<i>Yersinia enterocolitica</i>	230	0	0	0	230	0	0	0	ND	100 (98, 100)	ND	100 (98, 100)
<i>Vibrio</i> spp.	5	0	0	0					ND	100 (51.1, 100)		
<i>Vibrio cholerae</i>	230	0	0	0	230	0	0	0	ND	100 (98, 100)	ND	100 (98, 100)
EAEC	0	0	0	0					ND	ND		
EPEC	0	0	0	0					ND	ND		
ETEC	227	2	0	0	227	2	0	0	100 (38.3, 100)	100 (98, 100)	100 (29, 100)	100 (98, 100)
STEC	229	0	1	0	230	0	0	0	ND	99.6 (97.3, 100)	ND	100 (98, 100)
<i>E. coli</i> 0157	230	0	0	0	230	0	0	0	ND	100 (98, 100)	ND	100 (98, 100)
<i>Shigella</i> /EIEC	228	2	0	0	227	2	1	0	100 (29, 100)	100 (98, 100)	100 (29, 100)	99.6 (97.3, 99.9)
<i>Cryptosporidium</i> spp.	228	1	0	0	229	1	0	0	100 (16.7, 100)	100 (98, 100)	100 (16.7, 100)	100 (98, 100)
<i>Cyclospora cayentanensis</i>	15	0	0	0					ND	100 (76.1, 100)		
<i>Entamoeba histolytica</i>	230	0	0	0	230	0	0	0	ND	100 (98, 100)	ND	100 (98, 100)
<i>Giardia lamblia</i>	229	1	0	0	228	1	0	0	100 (16.7, 100)	100 (98, 100)	100 (16.7, 100)	100 (98, 100)
Adenovirus 40/41	227	1	1	0	229	1	0	0	100 (16.7, 100)	99.6 (97.3, 100)	100 (16.7, 100)	100 (98, 100)
Norovirus GI/GII	216	11	1	1	198	12	20	0	91.7 (62.5, 100)	99.5 (97.2, 100)	100 (71.8, 100)	90.8 (86.2, 94.0)
Rotavirus A	229	0	1	0	227	0	2	0	ND	99.6 (97.3, 100)	ND	99.1 (96.7, 100)
Sapovirus	0	13	0	0					100 (73.4, 100)	ND		
Astrovirus	0	4	0	0					100	ND		

^a The reference standard for a positive result was defined as an organism detected by (i) bacterial culture or microscopy or (ii) ≥ 2 methods. Empty cells, not present on the panel.

^b EAEC, enteroaggregative *E. coli*; EPEC, enteropathogenic *E. coli*; ETEC, enterotoxigenic *E. coli* (lt/st); STEC, Shiga-like toxin-producing *E. coli* (stx₁/stx₂; *E. coli* 0157); EIEC, enteroinvasive *E. coli*.

^c TN, true negative; TP, true positive; FP, false positive; FN, false negative.

^d FilmArray yielded additional detections for *Aeromonas* (*n* = 3), *Vibrio* spp. (*n* = 1), EAEC (*n* = 4), EPEC (*n* = 2), *Cryptosporidium* (*n* = 1), *C. difficile* (*n* = 1), adenovirus (*n* = 1), norovirus (*n* = 1), and rotavirus (*n* = 1) that were not confirmed due to the lack of a confirmatory test or insufficient remaining sample volume. These specimens were not included in the calculation of performance characteristics. CI, confidence interval; ND, not done.

^e Luminex yielded additional detections for *Giardia* (*n* = 1) and rotavirus (*n* = 1) that were not confirmed due to the lack of a confirmatory method or insufficient remaining sample volume. These specimens were not included in the calculation of performance characteristics.

Relevant evidence/references

1. Centers for disease control and prevention (CDC), Global diarrhea burden. 2017. Available : <https://www.cdc.gov/healthywater/global/diarrhea-burden.html>

2. Liu LI, Oza S2, Hogan D et al. Global, regional, and national causes of child mortality in 2000–13, with projections to inform post-2015 priorities: an updated systematic analysis. *Lancet*. 2015 Jan 31;385(9966):430-40
3. Buss SN, Leber A, Chapin K, et al. Multicenter evaluation of the BioFire FilmArray gastrointestinal panel for etiologic diagnosis of infectious gastroenteritis. *J Clin Microbiol*. 2015 Mar;53(3):915-25.
4. Goldenberg SD, Bacelar M, Brazier P et al. A cost benefit analysis of the Luminex xTAG Gastrointestinal Pathogen Panel for detection of infectious gastroenteritis in hospitalised patients. *J Infect*. 2015 May;70(5):504-11 (Original article)
5. Improved detection of five major gastro-intestinal pathogens by use of a molecular screening approach
6. Friesema IHI, Lugnér AK, van Duynhoven YT et al. Costs of gastroenteritis in the Netherlands, with special attention for severe cases. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2012 Aug;31(8):1895-900
7. Khare RI, Espy MJI, Cebelinski E et al. Comparative evaluation of two commercial multiplex panels for detection of gastrointestinal pathogens by use of clinical stool specimens. *J Clin Microbiol*. 2014 Oct;52(10):3667-73
8. Spina A, Kerr KG, Cormican M et al. Spectrum of enteropathogens detected by the FilmArray GI Panel in a multicentre study of community-acquired gastroenteritis. *Clin Microbiol Infect*. 2015 Aug;21(8):719-28
9. (Thielman NMI, Guerrant RL. Clinical practice. Acute infectious diarrhea. *N Engl J Med*. 2004 Jan 1;350(1):38-47. (guideline)
10. Approach to the adult with acute diarrhea in resource-rich settings. Uptodate 2017 Approach to the adult with acute diarrhea in resource-rich settingsApproach to the adult with acute diarrhea in resource-rich settingsApproach to the adult with acute diarrhea in resource-rich settingsApproach to the adult with acute diarrhea in resource-rich settings
11. Point-Counterpoint: Large multiplex PCR panels should be first-line tests for detection of respiratory and intestinal pathogens.
12. Zhang H, Morrison S, Tang YW. Multiplex polymerase chain reaction tests for detection of pathogens associated with gastroenteritis. *Clin Lab Med*. 2015 Jun;35(2):461-86
13. Polage CR, Gyorke CE, Kennedy MA et al. Overdiagnosis of *Clostridium difficile* Infection in the Molecular Test Era. *JAMA Intern Med*. 2015. Nov;175(11):1792-801
14. <https://www.cdc.gov/norovirus/lab-testing/diagnostic.html>
15. Van Lint PI, Rossen JW, Vermeiren S et al. Detection of *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium* spp. and *Entamoeba histolytica* in clinical stool samples by using multiplex real-time PCR after automated DNA isolation. *Acta Clin Belg*. 2013 May-Jun;68(3):188-92.
16. Svraka-Latifovic S, Bouter S, Naus H et al. Impact of transition from microscopy to molecular screening for detection of intestinal protozoa in Dutch patients. *Clin Microbiol Infect*. 2014 Nov;20(11):O969-71
17. Binnicker MJ. Multiplex Molecular Panels for Diagnosis of Gastrointestinal Infection: Performance, Result Interpretation, and Cost-Effectiveness. *J Clin Microbiol*. 2015 Dec;53(12):3723-8. (Review)
18. Corcoran MSI, van Well GT, van Loo IH. Diagnosis of viral gastroenteritis in children: interpretation of real-time PCR results and relation to clinical symptoms. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2014 Oct;33(10):1663-73
19. Stockmann C, Rogatcheva M, Harrel B et al. How Well Does Physician Selection of Microbiologic Tests Identify *Clostridium difficile* and other Pathogens in Paediatric Diarrhoea? Insights Using Multiplex PCR-Based Detection. *Clin Microbiol Infect*. 2015 Feb;21(2):179.e9-15
20. Halligan EI, Edgeworth J, Bisnauthsing K et al. Multiplex molecular testing for management of infectious gastroenteritis in a hospital setting: a comparative diagnostic and clinical utility study. *Clin Microbiol Infect*. 2014 Aug;20(8):O460-7 (Original article)
21. New Developments in Clinical Bacteriology Laboratories

22. Reddington KI, Tuite NI, Minogue E et al. A current overview of commercially available nucleic acid diagnostics approaches to detect and identify human gastroenteritis pathogens. *Biomol Detect Quantif*. 2014 Aug 14;1(1):3-7
23. Nicholson MRI, Van Horn GT2, Tang YW. Using Multiplex Molecular Testing to Determine the Etiology of Acute Gastroenteritis in Children. *J Pediatr*. 2016 Sep;176:50-56.e2
24. Liesman RMI, Binnicker MJ. The role of multiplex molecular panels for the diagnosis of gastrointestinal infections in immunocompromised patients. *Curr Opin Infect Dis*. 2016 Aug;29(4):359-65 (review)
25. Schutze GE, Willoughby RE; Committee on Infectious Diseases; American Academy of Pediatrics. Clostridium difficile infection in infants and children. *Pediatrics*. 2013 Jan;131(1):196-200.
26. Laboratory Testing for Infectious Causes of Diarrhea. Mayo Medical laboratories (Mayo Clinic). 2017. Available : <http://www.mayomedicallaboratories.com/test-catalog/Clinical+and+Interpretive/63169>.
27. Gray J, Coupland LJ. The increasing application of multiplex nucleic acid detection tests to the diagnosis of syndromic infections. *Epidemiol Infect*. 2014 Jan;142(1):1-11
28. Bignardi GEI, Settle C2. Can the luminex xTag GI panel really save money? *J Infect*. 2015 Oct;71(4):498-9
29. FilmArray Gastrointestinal (GI) Panel CE-IVD Instruction Booklet (BioFire Diagnostics, LLC). 2017. Available: <http://www.biomerieux-diagnostics.com/filmarray-gi-panel>
30. Rand KH, Tremblay EE, Hoidal M et al. Multiplex gastrointestinal pathogen panels: implications for infection control. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2015 Jun;82(2):154-7
31. Brochure FilmArray GI panel. Biomerieux Diagnostics. 2017. Available: http://www.biomerieux-diagnostics.com/sites/clinic/files/mrkt-prt-0334_filmarray_info_sheet_gi_panel_en.pdf
32. Information video FilmArray GI panel. Biomerieux Diagnostics. 2017. Available: <http://www.biomerieux-diagnostics.com/video/2585/player>. 2017
33. Food and drug administration (FDA) rapport FilmArray GI panel. 510(k) SUBSTANTIAL EQUIVALENCE DETERMINATION DECISION SUMMARY. 2017. Available : https://www.accessdata.fda.gov/cdrh_docs/reviews/k140407.pdf
34. Nhg standaard 'acute diarree'. 2017. Available online: <https://www.nhg.org/standaarden/volledig/nhg-standaard-acute-diarree#Voorlichtingenadviezen>
35. Yen CI, Jakob K, Esona MD et al. Detection of fecal shedding of rotavirus vaccine in infants following their first dose of pentavalent rotavirus vaccine. *Vaccine*. 2011 May 31;29(24):4151-5