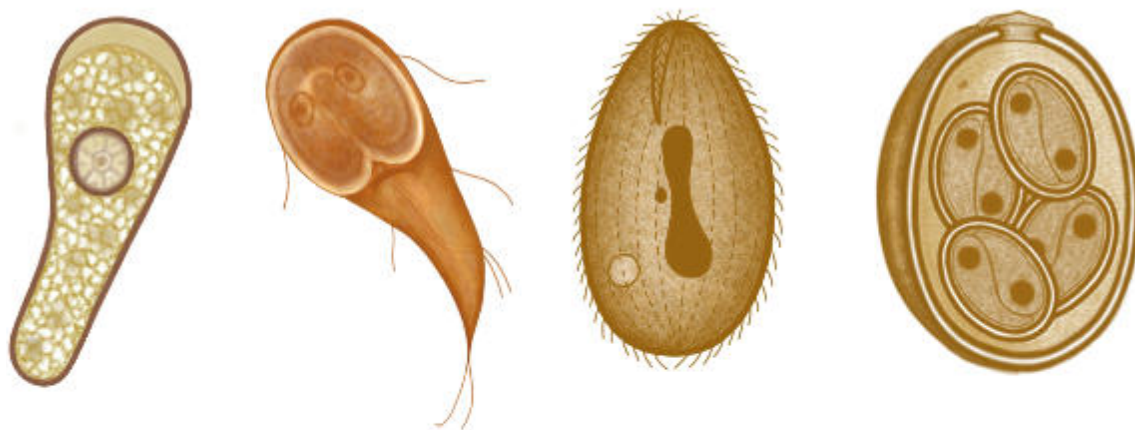


Professionele Bachelor Agro- en Biotechnologie
Biotechnologie



OPTIMALISATIE EN VALIDATIE VAN
DETECTIEMETHODEN TER OPSPORING VAN
PARASITEN EN BACTERIËN IN FECES

Ruben Bortels

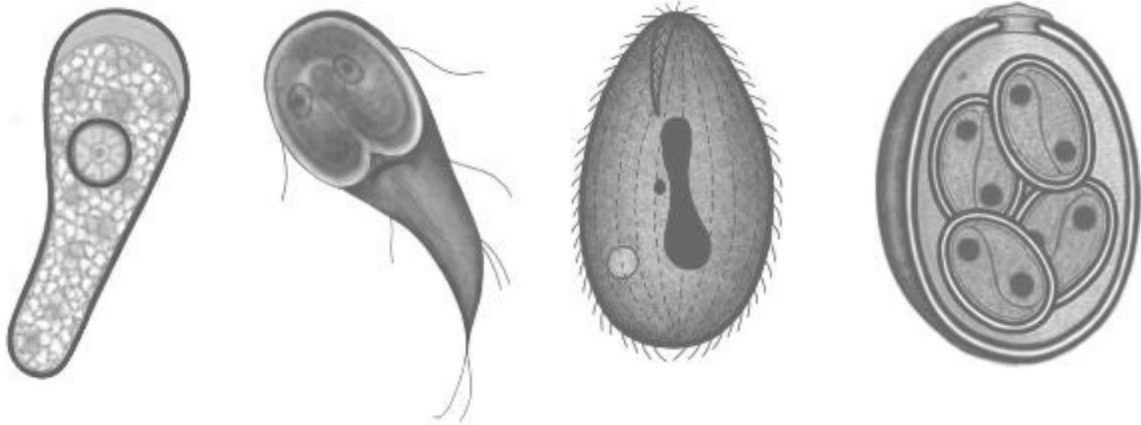
Promotoren:

Dr. Els Oris
M. Sc. Katrien Vandebroek
Dr. Elke Clynen

Ziekenhuis Oost-Limburg
Ziekenhuis Oost-Limburg
PXL



Professionele Bachelor Agro- en Biotechnologie
Biotechnologie



**OPTIMALISATIE EN VALIDATIE VAN
DETECTIEMETHODEN TER OPSPORING VAN
PARASIETEN EN BACTERIËN IN FECES**

Ruben Bortels

Promotoren:

Dr. Els Oris
M. Sc. Katrien Vandebroek
Dr. Elke Clynen

Ziekenhuis Oost-Limburg
Ziekenhuis Oost-Limburg
PXL

Dankwoord

Ongeveer vier maanden geleden begon ik aan mijn bachelorproef. Alles begon met het zoeken naar een geschikte stageplek. Mijn keuze voor het moleculaire labo van het Ziekenhuis Oost-Limburg (ZOL) was snel gemaakt en toen bleek dat ik hier effectief mijn stage kon lopen, begon voor mij het avontuur. Na vier maanden kan ik zeggen dat het een leerrijke periode was, zowel op inhoudelijk vlak, als voor mijn persoonlijke ontwikkeling in de werkomgeving. Een aantal mensen hebben van deze stage, die omgevlogen is, een aangenaam leerproces gemaakt. Deze personen zou ik hierbij willen bedanken voor al de hulp en steun.

Eerst en vooral zou ik mijn stagepromotor Dr. Els Oris willen bedanken om mij een kans te geven ervaring op te doen. Zonder haar had ik nooit aan dit onderzoek kunnen beginnen. Daarnaast wil ik haar bedanken voor haar steun en feedback. Ook aan M. Sc. Katrien Vandebroek, mijn tweede stagepromotor, wil ik dank uitbrengen voor haar dagelijkse begeleiding. Haar kennis, tips en enthousiasme werkten zeer motiverend.

Verder wil ik mijn schoolpromotor Dr. Elke Clynen bedanken om steeds weer tijd vrij te maken. Ook wil ik haar bedanken voor haar kritische blik en feedback en haar interesse in mijn bachelorproef.

Daarnaast wil ik enkele mensen van het laboratorium bedanken. Mijn dank gaat speciaal uit naar Diane Merckx, Daisy Bosmans, Ilse Geusens en Jonas Penny voor al hun hulp en tips. Alle andere mensen van het labo die nog niet vermeld zijn, wil ik bedanken voor hun aangename ontvangst en al hun enthousiasme op de werkvloer.

Ook wil ik mijn mama bedanken voor het nalezen van deze scriptie. Zonder al deze personen zou dit eindwerk nooit hetzelfde zijn geweest.

Tot slot wil ik u bedanken voor deze scriptie te lezen en wens ik u hierbij veel leesplezier!

Samenvatting

Diarree veroorzakende ziekten behoren tot de voornaamste oorzaken van morbiditeit en mortaliteit van kinderen wereldwijd. Om infectieuze gastro-enteritis correct te behandelen, is er nood aan een snelle detectie van pathogenen die met de ziekte geassocieerd worden. Momenteel worden hiervoor verschillende methoden gebruikt die vaak arbeidsintensief zijn, een lange doorlooptijd en een eerder lage gevoeligheid hebben. In het Ziekenhuis Oost-Limburg werden drie PCR-methodes voor de detectie van gastro-intestinale pathogenen geëvalueerd. Deze drie methodes zijn een commerciële real-time PCR (GeneXpert), een multiplex in-house real-time PCR (Rotor-Gene) en tenslotte een commerciële multiplex nested PCR-platform (FilmArray GI (gastro-intestinaal) panel). De studie richt zich specifiek op parasieten (*Cryptosporidium*, *Cyclospora cayetanensis*, *Entamoeba histolytica* en *Giardia lamblia*) en enterobacteriën (*Campylobacter*, *Clostridium difficile*, *Salmonella*, *Shigella* en *Yersinia enterocolitica*). *Clostridium difficile* werd gevalideerd op de GeneXpert in kader van de surveillance van ziekenhuisinfecties.

Een vergelijkende studie werd gehouden tussen de in-house real-time PCR en de commerciële nested PCR. Alvorens deze studie uitgevoerd kon worden, werd de in-house real-time PCR geoptimaliseerd. De oligonucleotideconcentraties, de invloed van additieven en de annealingtemperatuur werden bestudeerd. Na optimalisatie hiervan werden geen specifieke amplificatiecurves voor *Giardia lamblia* meer waargenomen. Ook werd de technische validatie van de in-house real-time PCR vervolledigd. Volgende parameters werden doorlopen: bepaling van de detectielimiet voor *Cryptosporidium*, de invloed van de staalbewaring en een methodevergelijking met de lichtmicroscopie. 87,5% van de stalen geanalyseerd met de in-house real-time PCR waren concordant aan het resultaat van de lichtmicroscopie.

Vervolgens werd een validatie van het gastro-intestinaal panel uitgevoerd. Hiervoor werd de vergelijkende studie tussen de commerciële nested PCR, de in-house real-time PCR en de lichtmicroscopie/kweek gehouden. Het commerciële GI panel is een snelle methode die met weinig hands-on time een resultaat levert na één uur. Van 22 pathogenen wordt tegelijk een uitslag verkregen. Verder is er geen voorgaande extractie nodig en is er weinig kans op contaminatie. Voor het GI panel bedraagt de sensitiviteit 95,2% en de specificiteit 85,7%. De twee stalen die vals positief waren op het panel werden met een referentiemethode (sequencing) onderzocht. Het resultaat hiervan was niet doorslaggevend. Het GI panel is dus specifiek en gevoelig. De in-house multiplex PCR is eveneens een specifieke en gevoelige methode. De sensitiviteit bedroeg namelijk 92,3% en de specificiteit 96,7%. Daarnaast zijn de benodigde reagentia goedkoop en is de techniek relatief snel. Echter vraagt deze methode meer hands-on time en kunnen hiermee slechts drie parasieten tegelijk geanalyseerd worden.

Ten slotte kunnen ook bepaalde virussen met het GI panel worden gedetecteerd. Dit zijn: het adeno-, astro-, noro-, rota- en sapovirus. Deze moeten nog gevalideerd worden op het panel. Concreet is het GI panel een gevoelige en specifieke methode die het potentieel heeft om de etiologische diagnose van gastro-enteritis sterk te vereenvoudigen.

Inhoudsopgave

Dankwoord.....	2
Samenvatting	3
Inhoudsopgave.....	4
Lijst met gebruikte afkortingen en symbolen	7
1. Inleiding.....	9
2. Literatuurstudie.....	11
2.1 Gastro-enteritis	11
2.1.1 Symptomen	11
2.1.2 Oorzaken	11
2.1.2.1 Virussen.....	11
2.1.2.2 Bacteriën	12
2.1.2.3 Parasieten.....	14
2.2 PCR	18
2.2.1 Reactiecomponenten	18
2.2.2 Temperatuurprofiel.....	19
2.2.3 Real-time PCR.....	19
2.2.3.1 Principe.....	19
2.2.3.2 Verwerking resultaat	20
2.2.4 Multiplex PCR	22
2.2.5 Nested PCR.....	22
2.3 DNA-Sequencing.....	22
2.4 Massaspectrometrie	24
2.5 Toestellen	25
2.5.1 QIASymphony	25
2.5.2 Rotor-Gene.....	26
2.5.3 FilmArray	28
2.5.4 GeneXpert	30
2.5.5 MALDI-TOF	30
2.5.6 Genetic analyzer.....	31
3. Materialen en methoden	32
3.1 Proefopzet.....	32
3.2 Materialen en methoden DNA-extractie	34
3.2.1 Materialen DNA-extractie	34
3.2.2 Methoden DNA-extractie	37
3.3 Materialen en methoden in-house real-time PCR	38

3.3.1	Materialen in-house real-time PCR.....	38
3.3.2	Methoden in-house real-time PCR.....	41
3.3.2.1	Algemene methode in-house real-time PCR.....	41
3.3.2.2	Werkwijze optimalisatie in-house real-time PCR.....	43
3.3.2.3	Werkwijze bepaling detectielimiet op matrix van Cryptosporidium	44
3.3.2.4	Werkwijze staalbewaring	45
3.4	Materialen en methoden commerciële nested PCR.....	46
3.4.1	Materialen commerciële nested PCR.....	46
3.4.2	Methoden commerciële nested PCR.....	48
3.4.2.1	Algemene werkwijze van de nested PCR	48
3.4.2.2	Werkwijze verificatie detectielimiet	49
3.4.2.3	Werkwijze nagaan reproduceerbaarheid/staalbewaring	49
3.4.2.4	Werkwijze nagaan invloed van “inhibitoren”	50
3.4.2.5	Werkwijze methodevergelijking met de real-time in-house PCR	50
3.4.2.6	Werkwijze controleren specificiteit	51
3.4.2.7	Werkwijze onderzoeken menginfecties.....	52
3.5	Materialen en methoden commerciële real-time PCR	52
3.5.1	Materialen commerciële real-time PCR	52
3.5.2	Methoden commerciële real-time PCR.....	53
3.5.2.1	Validatie interrun precisie/staalbewaring.....	53
3.5.2.2	Detectielimiet op matrix	53
4.	Resultaten	54
4.1	In-house real-time PCR.....	54
4.1.1	Optimalisatie	54
4.1.2	Detectielimiet op matrix	55
4.1.3	Staalbewaring.....	56
4.1.4	Methodevergelijking met lichtmicroscopie	58
4.2	Commerciële nested PCR	59
4.2.1	Validatie parasieten	59
4.2.1.1	Verificatie detectielimiet.....	59
4.2.1.2	Reproduceerbaarheid/staalbewaring	61
4.2.1.3	Invloed van “inhibitoren”	63
4.2.1.4	Methodevergelijking met de in-house real-time PCR.....	64
4.2.1.5	Specificiteit	69
4.2.1.6	Menginfecties.....	70
4.2.2	Validatie bacteriën	71

4.2.2.1 Validatie detectielimiet	71
4.2.2.2 Reproduceerbaarheid/staalbewaring	72
4.2.2.3 Invloed van “inhibitoren”	72
4.2.2.4 Methodevergelijking met de gekweekte bacteriën	72
4.3 Validatie <i>Clostridium difficile</i> op GeneXpert	77
4.3.1 Interrun	77
4.3.2 Detectielimiet op matrix	77
4.4 Kostenberekening	78
5. Discussie	79
6. Besluit	83
Literatuurlijst	84
Figurenlijst	89
Tabellenlijst	90
Bijlage	92

Lijst met gebruikte afkortingen en symbolen

Afkorting	Betekenis
ATL	Animal Tissue Lysis
bv.	bijvoorbeeld
cAMP	Cyclisch adenosine monofosfaat
<i>Campylo</i>	<i>Campylobacter</i>
<i>C. cayetanensis</i>	<i>Cyclospora cayetanensis</i>
<i>C. difficile</i>	<i>Clostridium difficile</i>
<i>Crypto</i>	<i>Cryptosporidium</i>
CE	Capillaire elektroforese
CE-IVD/FDA	European Conformity- <i>in vitro</i> diagnostics/ Food and drug administrations
CFU	Colony forming units
Ct	Cycle threshold
ddNTP's	Dideoxyribonucleotide trifosfaat
DMSO	Dimethylsulfoxide
DNA	Desoxyribonucleïnezuur
dNTP's	Deoxyribonucleotide trifosfaat
EAEC	Enteraggregatieve <i>E. coli</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>E. dispar</i>	<i>Entamoeba dispar</i>
EIEC	Enteroinvasieve <i>E. coli</i>
<i>Ent. coli</i>	<i>Entamoeba coli</i>
<i>E. histolytica</i>	<i>Entamoeba histolytica</i>
EPEC	Enteropathogene <i>E. coli</i>
et al.	et alii (=en anderen)
etc.	Et cetera
ETEC	Enterotoxigene <i>E. coli</i>
FDA	Food and Drug Administration
Fwd.	Forward
GI	Gastro-intestinaal
G-kracht	Gravitatiekracht
<i>G. lamblia</i>	<i>Giardia lamblia</i>
HID	Human Identification
HRM	High Resolution Melt channel
IC	Interne controle
IGE	Infectieuze gastro-enteritis
i.p.v.	in plaats van
ITG	Instituut Tropische Geneeskunde
IUO	Investigational use only
IVD	<i>In-vitro</i> diagnostica
LAF	Laminaire air flow
LED	Light emitting diode
MALDI	Matrix assisted laser desorption/ionization
m.b.v.	met behulp van
McF	McFarland
mPCR	multiplex PCR
MS	Massaspectrometrie
nPCR	nested PCR
PAGE	Poly-Acrylamide gelelektroforese
PBS	Fosfaatgebufferde zoutoplossing

PC	Positieve controle
PCR	Polymerase chain reaction
pH	pondus Hydrogenium
qPCR	quantitative PCR = kwantitatieve PCR
Rev.	Reverse
RNA	Ribonucleïnezuur
RPM	Rotaties per minuut
rRNA	ribosomaal RNA
SD	Standaard deviatie
SLG	Sint-Lucas Gent
Spp.	Specie(s)
SSU	Small subunit
STEC	Shiga-like toxin-producing <i>E. coli</i>
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
t.e.m.	tot en met
Tm	Smelttemperatuur
TOF	Time of flight
t.o.v.	ten opzichte van
UV	Ultra violet
<i>V. cholerae</i>	<i>Vibrio cholera</i>
WIV	Wetenschappelijks Instituut Volksgezondheid
<i>Y. enterocolitca</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i>
ZOL	Ziekenhuis Oost-Limburg

1. Inleiding

Ondanks de vooruitgang van sanitaire voorzieningen en voedselveiligheid blijft gastro-enteritis een ziekte die wereldwijd voorkomt [1]. Infectieuze gastro-enteritis (IGE) is een belangrijke oorzaak van morbiditeit en mortaliteit, die dagelijks bijdraagt tot de dood van ongeveer 2200 kinderen. Diarree gerelateerde ziekten hebben een grotere prevalentie in ontwikkelingslanden in vergelijking met geïndustrialiseerde landen, maar de ziekte blijft ook bij geïndustrialiseerde landen een significant probleem [2]. Jaarlijks is er in België een uitbraak van gastro-enteritis gelinkt aan een bepaald micro-organisme. In 2010 kwamen zelfs meer dan 18.000 inwoners van de Antwerpse gemeenten Schelle en Hemiksem in contact met vervuild drinkwater. Een acute gastro-intestinale uitbraak was het gevolg hiervan [3]. In vele gevallen is het norovirus verantwoordelijk voor een infectie, maar ook andere virussen, parasieten en bacteriën kunnen de aanleiding zijn tot de ziekte [4]. Teneinde de ziekte bedachtzaam te behandelen is het belangrijk dat de ziekteverwekker geïdentificeerd wordt.

In dit eindwerk wordt een vergelijkende studie opgezet tussen verschillende detectiemethoden ter opsporing van parasieten en bacteriën in klinische fecesstalen. De studie kan onderverdeeld worden in drie deelonderzoeken: de optimalisatie en validatie van de in-house real-time PCR (Polymerase Chain Reaction); de validatie van een gastro-intestinaal (GI) commercieel panel (nested PCR) op de Filmarray; de validatie van *Clostridium difficile* op een commerciële real-time PCR.

Alvorens de in-house moleculaire methode onderworpen kan worden aan de vergelijkende studie wordt de gebruikte mastermix geoptimaliseerd. Hiervoor wordt gebruik gemaakt van positief controlemateriaal. Na PCR en gelelektroforese zal de aanwezigheid van primer-/probe-dimeren voor *Giardia lamblia* worden nagegaan. Dit wordt gevolgd door de optimalisatie van de annealingtemperatuur, de DMSO-concentratie en het ontdoen van een eventuele contaminatie. Analyse gebeurde met de in-house real-time multiplex PCR. Voor de technische validatie werden volgende parameters doorlopen: bepaling van de detectielimiet voor *Cryptosporidium*, de staalbewaring en een methodevergelijking met de lichtmicroscopie. Voor de detectielimiet van *Cryptosporidium* zal eerst een klinisch vers fecesstaal negatief voor parasieten worden gespiked met controlemateriaal van deze parasiet. Een 1/10^{de} verdunningsreeks wordt aangemaakt en na extractie hiervan zal de analyse plaatsvinden. Vervolgens wordt er van de zo geschatte detectielimiet een 1/2^{de} verdunningsreeks gemaakt om nauwkeuriger de detectielimiet te bepalen. De staalbewaring vertrekt van hetzelfde soort staal, maar wordt gespiked met telkens één van de drie parasieten, namelijk *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica* en *Cryptosporidium* species (spp). Per parasiet wordt er gedurende een periode van zeven dagen drie keer zowel een zwak als sterk positief gespiked staal geëxtraheerd en geanalyseerd. In deze tijdsperiode wordt een staal bewaard bij gekoelde opslag (2-8°C) vergeleken met een staal bij diepgevroren opslag (-20°C). De methodevergelijking zal vertrekken vanuit retrospectieve (voor langere tijd bewaard) klinische fecesstalen positief voor parasieten die geëxtraheerd en vervolgens vergeleken worden met de lichtmicroscopie.

Nadat de in-house PCR geoptimaliseerd en gevalideerd is, zal de vergelijkende studie met het GI-panel op de FilmArray van BioFire (multiplex nested PCR) aanvangen. Dit panel bevat targets van 22 organismen gerelateerd aan gastro-enteritis. Het is een snelle methode waarmee resultaat wordt verkregen door enkel het staal te laden op het panel. De in-house methode is ook een relatief snelle methode die gevoeliger is dan de microscopie. Het volgende onderdeel van de studie behandelt de validatie van het GI-panel. Vermits dit een commerciële techniek is, die CE-IVD/FDA

gelabeld is, moet deze alleen nog gevalideerd worden. De validatie zal enkel gebeuren voor de parasieten en bacteriën, niet voor de virussen. Voor de verificatie van de detectielimiet, de validatie van de reproduceerbaarheid en menginfecties en de invloed van inhibitoren wordt vertrokken uit klinisch verse stalen negatief voor parasieten en bacteriën. Deze werden vervolgens gespiked met het positieve controlemateriaal of de gekweekte bacteriën. De bacteriën in deze validatie worden eerst geïdentificeerd op de MALDI-TOF massaspectrometer. De detectielimiet zal driemaal geverifieerd worden. De reproduceerbaarheid zal in een tijdspanne van zeven dagen driemaal getest worden met een zwakke en sterke positieve pool. De detecteerbaarheid van combinaties aan pathogenen wordt bij de menginfecties nagegaan. Een staal zal vier maal tweevoudig serieel verdund worden en gespiked met dezelfde concentratie om de invloed van inhibitoren (mogelijke DNases) in het staal te bepalen. De validatie van de methodevergelijking met de in-house real-time PCR zal gebeuren op retrospectieve klinische stalen. In geval van discordanties worden de stalen verstuurd naar referentielaboratoria of worden ze gesequenced op de genetic analyzer. Als laatste onderdeel zal de specificiteit gecontroleerd worden. Hierbij worden bij zowel retrospectieve klinische stalen als gespikte stalen de kruisreactiviteit onderzocht. Op basis van deze validatie zal bepaald worden of de analyse van gastro-enteritis met het GI panel een geschikte onderzoeksmethode is. De voor- en nadelen t.o.v. de in-house real-time PCR ter interpretatie van gastro-enteritis zullen beschouwd worden.

Clostridium difficile werd, in tegenstelling tot de andere enterobacteriën, gevalideerd op de GeneXpert om de ziekenhuishygiëne te handhaven. Het laatste onderdeel van de studie is validatie van de detectielimiet en interrun van deze bacterie op de GeneXpert, een commerciële real-time PCR. Er wordt voor beide validaties vertrokken vanuit anaëroob gekweekte *C. difficile* kolonies. Voor de bepaling van de detectielimiet zal vanuit een 0,5 McF-suspensie een verdunningreeks worden gemaakt. De detectielimiet zal drie keer gedetecteerd moeten worden op de GeneXpert. Om de interrun te valideren worden de gekweekte kolonies opgelost in een vers vloeibaar fecesstaal negatief voor *Clostridium difficile*. Het staal zal vervolgens op dag één, drie en vijf geanalyseerd worden.

Ten slotte zal een kostprijsberekening van verschillende algoritmen worden gemaakt. Hierin wordt bepaald wanneer een staal het best al dan niet op het GI panel zal worden getest. Een voorstel wordt gedaan om het GI panel te implementeren in routineonderzoek.

2. Literatuurstudie

2.1 Gastro-enteritis

Gastro-enteritis is een samenstelling van gastro wat maag betekent en enteron wat darm betekent. Het is de benaming voor maag- en darmziekten die ontstaan door een ontsteking van de mucosa in de maag en darmen. Dit kan optreden na inname van verdovende of chemische middelen, maar meestal is de ziekte het gevolg van een infectie van besmettelijke aard. In deze studie zal alleen ingegaan worden op deze tweede oorzaak [5]. Tot het eind van de vorige eeuw waren infecties van besmettelijke aard een belangrijke oorzaak van morbiditeit en mortaliteit. Dit komt omdat twee typische symptomen, namelijk overgeven en diarree, dehydratatie veroorzaken, waardoor de water-, zout- en suikerbalans van het lichaam verstoord raken. Hoewel iedereen door de ziekte getroffen kan worden, zijn kleine kinderen in crèches en oudere personen in tehuisen de grootste risicogroepen [2] [4].

2.1.1 Symptomen

Het ziektebeeld kan beschreven worden door drie symptomen, namelijk diarree, braken en buikpijn. Patiënten met gastro-enteritis zullen vrijwel altijd last hebben van diarree. Braken komt iets minder voor en treft ongeveer de helft van de besmette personen. Buikpijn komt in één op de vier gevallen voor. Andere symptomen die soms optreden zijn een verminderde eetlust, misselijkheid en zelfs koorts. Deze kenmerken zijn echter niet typerend voor gastro-enteritis [6].

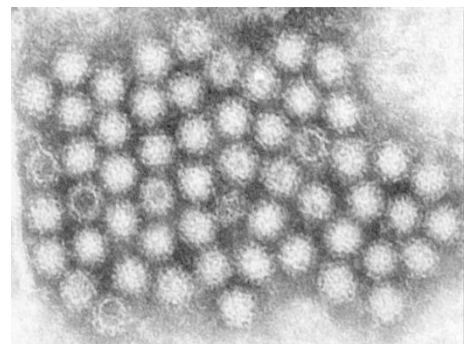
2.1.2 Oorzaken

Gastro-enteritis veroorzaakt door een infectie kan te wijten zijn aan virussen, bacteriën en parasieten. Deze worden hieronder besproken.

2.1.2.1 Virussen

De twee meest voorkomende gastro-enteritis veroorzakende virussen zijn het rotavirus en het norovirus (zie onderstaande figuur). Een infectie met deze pathogenen is het meest voorkomend in de Verenigde Staten. De werking van deze virussen berust op het besmetten van enterocyten (bekledende cellen van de dunne darm [7]) in het darmepitheel van de dunne darm. Hierdoor zal er een exsudatie (uittreden uit de bloedbaan) van vocht en zouten optreden. Door de veranderende druk in de bloedvaten zal het vocht diffunderen uit het bloedvat naar het intestinaal lumen toe. De patiënt krijgt dan last van diarree die kan verergeren door een verstoorde opname van koolhydraten. Dit wordt dan osmotische diarree genoemd. Inflammatoire diarree is als er witte of rode bloedcellen aanwezig zijn, wat ongebruikelijk is [5].

Een virale gastro-enteritis infectie kan door vijf types van virussen worden verwekt. Dit zijn de twee bovenstaande, rota- en norovirus, en het astro-, adeno- en sapovirus. Jonge kinderen zijn de grootste infectiegroep van het rotavirus. Volwassenen worden alleen besmet indien er een nauw contact is met een geïnfecteerd kind. De infecties spelen zich af rond de winter tot de vroege lente. Het norovirus treft dan weer vaker oudere kinderen en volwassenen. Ook zijn er het hele jaar door mensen geïnfecteerd hiermee. Het astrovirus zal, net zoals het rotavirus, voornamelijk de zuigelingen treffen. Tenslotte zal het adenovirus het hele jaar gastro-enteritis veroorzaken met een lichte piek in de zomer. De grootste groep van slachtoffers hiervan zijn kinderen [5].

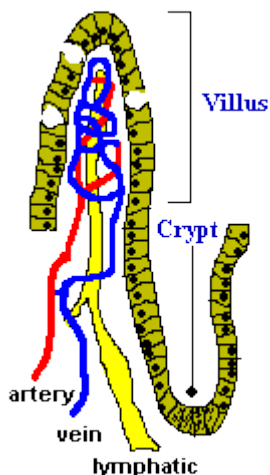


Figuur 1: Norovirus onder elektronenmicroscop

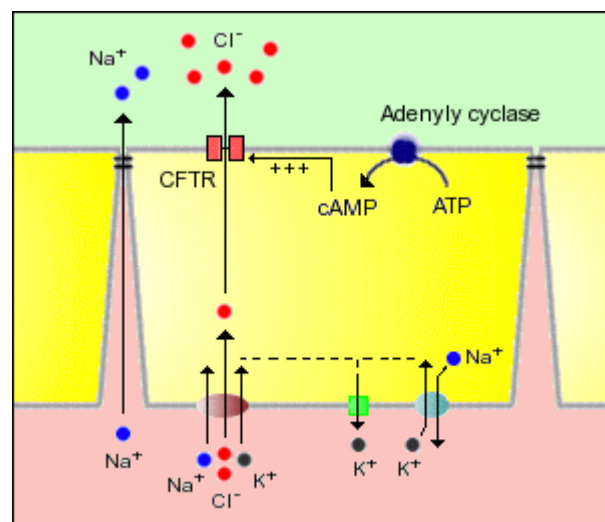
2.1.2.2 Bacteriën

Bacteriën die het vaakst voorkomen in verband met gastro-enteritis zijn *Salmonella*, *Campylobacter*, *Shigella* en *Escherichia coli*. Bacteriële gastro-enteritis is een type van maag- en darminfecties met een kleinere prevalentie. Naargelang hun verschillende werking worden de bacteriën ingedeeld in entero-invasieve en entero-toxigene bacteriën [8]. De eerste soort kan ingedeeld worden in twee ondersoorten. Beide ondersoorten veroorzaken een ontsteking en de tweede ondersoort is bovendien invasief. De meest voorkomende ziekte is deze waarbij de bacterie zich zal hechten aan het darmslijmvlies met een ontsteking als gevolg. Hier veroorzaken ze dan zweren, bloedingen en afscheidingen van eiwitrijke vloeistof. Door het afweermecanisme van het lichaam wordt de stoelgang slijmerig. Verder kan de stoelgang ook witte- en rode bloedcellen bevatten of zelfs grof bloed. Voorbeelden van deze soort bacteriën zijn *Shigella*, *Salmonella* en *Campylobacter*. De andere soort bacteriën onder de entero-invasieve groep hebben ook een invasieve eigenschap, waarmee ze het mucosa kunnen penetreren. Koorts en een eventuele shock zijn het gevolg hiervan. *Salmonella Typhi/Paratyphi* en *Yersinia enterocolitica* zijn hiervoor verantwoordelijk [5].

De entero-toxigene bacteriën produceren een toxine dat zich vasthecht aan het darmweefsel [8]. De geproduceerde toxines zullen adenylaat cyclase stimuleren, waardoor er een aanhoudende toename is van de intracellulaire concentratie cyclisch AMP in de enterocyten in de crypten (zie figuur 2). In figuur 3 is te zien dat een verhoogde intracellulaire concentratie aan cAMP in de crypten de Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator (CFTR) activeert. Dit zijn chloridekanalen die voor de secretie van chloride-ionen in het lumen zorgen. Hierdoor ontstaat er een negatief potentiaal over het membraan. Natrium-ionen zullen vervolgens aangetrokken worden door het elektrisch potentiaal, waardoor er een netto secretie is van natriumchloride (NaCl). Een osmotische gradiënt ontstaat zo over het membraan wat tot de secretie van water leidt. Dit heeft een ongecontroleerde secretie van elektrolyten en water als gevolg wat resulteert in waterige diarree [9] [10].



Figuur 2: Darmvlok met crypt



Figuur 3: Secretie van NaCl in crypten

Doordat er hier toxines geproduceerd worden gaat het hier niet om een infectie, maar om een vergiftiging. Bacteriën die toxines produceren in het darmstelsel of de toxines zelf kunnen aanwezig zijn in voedsel, waardoor het een voedselvergiftiging kan veroorzaken. De symptomen ervan zijn sneller en treden op binnen 12 uur na het consumeren van het bedorven voedsel [5]. Deze bacteriën worden nooit overgedragen van mens op mens [11]. Voorbeelden van bacteriën met dit werkingsprincipe zijn *Vibrio cholerae*, Enterotoxigene *Escherichia coli* (ETEC) en *Staphylococcus aureus*. Ook *Clostridium difficile*-toxine heeft een soortgelijk werkingsprincipe, wanneer de infectie het gevolg is van overmatig antibioticagebruik [5]. In tabel 1 wordt een kort overzicht gegeven van drie typen bacteriële gastro-enteritis [12].

Tabel 1: Types bacteriële gastro-enteritis [12]

Parameter	Secretory gastroenteritis	Inflammatory gastroenteritis	Invasive gastroenteritis
Location	Proximal small intestine	Colon	Distal small intestine
Type of illness	Watery diarrhea	Dysentery	Enteric fever
Stool examination	No fecal leukocytes	Fecal polymorphonuclear leukocytes	Fecal mononuclear leukocytes (if patient has diarrhea)
Mechanism	Enterotoxin or bacterial adherence/invasion causes a shift in water and electrolyte excretion/adsorption	Bacterial invasion or cytotoxins cause mucosal damage that leads to inflammation	Bacteria penetrate the mucosa and invade the reticuloendothelial system
Classic pathogens	<i>Vibrio cholerae</i> , ETEC, <i>Clostridium perfringens</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Shigella</i> , STEC, <i>Salmonella</i> (not <i>Salmonella</i> Typhi/Paratyphi), <i>Vibrio parahaemolyticus</i> , <i>Clostridium difficile</i> , <i>Campylobacter</i>	<i>Salmonella</i> Typhi/Paratyphi, <i>Yersinia enterocolitica</i>

Hieronder worden enkele entero-invasieve bacteriën besproken.

Clostridium difficile

Clostridium difficile is een anaërobe staafbacterie die onderdeel kan zijn van de darmflora, ook zonder dat de patiënt er symptomen door heeft. Als de weerstand van de darm verzwakt wordt, zoals bijvoorbeeld bij antibioticagebruik, dan zal deze bacterie zich vermeerderen. Doordat de bacterie gifstoffen (toxinen) produceert, gaat dit aantal te groot worden bij de vermeerdering, waardoor de geïnfecteerde persoon ziek kan worden. De voornaamste symptomen van een infectie hiermee zijn diarree en eventueel misselijkheid, buikpijn, etc. Ook kan er in een ernstig geval een darmperforatie ontstaan. Hierdoor ontstaat er een gat in de darmwand, waardoor bacteriën zich kunnen verplaatsen naar de buikholte, wat een buikvliesontsteking tot gevolg kan hebben. Dit is een levensbedreigende aandoening [13].

De dosis nodig om een infectie te veroorzaken is niet gekend [14]. De reden hiervoor is dat *Clostridium difficile* een opportunistische bacterie is. Daardoor kan deze niet beginnen te koloniseren op zichzelf, maar bij een gebrek aan commensalen bacteriën (bv. antibiotica behandeling) kan het de dikke darm innemen. Bij ongeveer 2-3% van de bevolking is deze bacterie aanwezig in de darmen [15].

Salmonella

Salmonella is een staafvormige bacterie (zie figuur 4) die van nature uit voorkomt in de darmen van dieren zoals varkens, kippen, koeien, pluimvee, etc. Een besmetting treedt op door contact met deze dieren of door het eten van onvoldoende verhit voedsel. De bacterie kan naast gastro-enteritis ook buiktyfus en lokale weefselinfecties veroorzaken. Normaal wordt er geen antibiotica voorgeschreven, tenzij er sprake is van lokale weefselinfecties. In dit geval zit de *Salmonella* al in de bloedbaan en moet men tot zes weken lang een antibioticakuur volgen [16].



Figuur 4: *Salmonella typhi* bacterie

De infectieuze dosis hangt af van het serotype *Salmonella*. Zo heeft niet-typhoïde *Salmonella* een infectieuze dosis van ongeveer 10^3 bacillen en de typhoïde variant een dosis van ongeveer 10^5 bacillen. Deze dosis varieert voor patiënten met een verminderde immuniteit en op basis van de zuurtegraad van de maag [17].

Shigella

Shigella is een bacterie die wereldwijd dysenterie veroorzaakt. Dysenterie is een vorm van diarree die gekenmerkt wordt door bloed aanwezig in een waterige ontlasting. Shigellose is een zeer besmettelijke ziekte die vaak van persoon tot persoon wordt overgedragen, maar soms wordt het ook veroorzaakt door besmet voedsel. De bacterie zal de binnenwand van de darm doorboren, wat leidt tot zweren, en in sommige gevallen kan er zelfs een darmperforatie optreden. Naast de standaard symptomen bij gastro-enteritis is het verkrijgen van epileptische aanvallen bij kinderen een symptoom voor shigellose. Het is niet geweten of dit een resultaat is van de hoge koorts of een complicatie specifiek aan shigellose. Een inname vanaf 10-200 organismen kan leiden tot een infectie [18].

Campylobacter

Deze bacterie veroorzaakt campylobacteriose na ongeveer twee tot vijf dagen. Doordat de persoonlijke overdracht ongewoon is, zijn de grote meerderheid van de infecties geïsoleerd en komen ze zelden voor in een epidemie. Uitbraken aan *Campylobacter* worden meestal geassocieerd met besmet drinkwater. Ook is het een seizoensgebonden aandoening met een piek in de zomermaanden. Hoewel campylobacteriose niet als levensbedreigend wordt gezien, kan het, indien het zich verspreidt naar de bloedbaan, soms levensbedreigende infecties veroorzaken [19].

Bij de meeste infecties is deze spiraalvormende bacterie van het *jejuni* species, maar ook andere soorten zoals *C. coli* en *C. upsaliensis* kunnen bij de mens voorkomen. Hoewel het een infectie is die meestal geneest zonder complicaties, kan het in zeldzame gevallen artritis of het Guillain-Barre syndroom veroorzaken. Vanaf een inname van 500 organismen kan het infectieus zijn. Een vrijwilligersstudie toonde echter aan dat er 9000 bacteriën benodigd waren om in 50% van de patiënten campylobacteriose te veroorzaken [19].

Yersinia enterocolitica

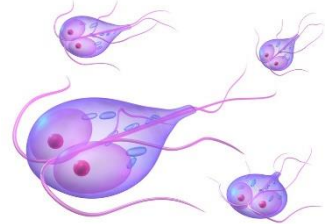
De ziekte wordt naast diarree gekenmerkt door matige koorts en pijn in de onderbuik. Ook kunnen er rode of paarse vlekken ontstaan, meestal op de benen en de romp van de patiënt. De bacterie wordt voornamelijk opgenomen door het drinken van besmette ongepasteuriseerde melk. Echter kunnen ook gepasteuriseerde melk en zuivelproducten een uitbraak veroorzaken, vermits *Yersinia* kan vermeerderen bij een gekoelde temperatuur. Ook het eten van rauwe groenten wordt hiermee geassocieerd. Over de mogelijkheid van overdracht van persoon tot persoon zijn verschillende studies het oneens. Besmetting via bloed heeft zich al voorgedaan, maar een fecale-orale overdracht is bij mensen nog niet gerapporteerd [20]. De infectieuze dosis is gesteld op 10^8 bacteriën of meer bij orale inname [21].

2.1.2.3 Parasieten

De laatste groep van micro-organismen die gastro-enteritis veroorzaken zijn de parasieten. Het woord 'parasiet' komt van het Latijnse parasitos. De betekenis van para hierin is 'naast' en sitos betekent 'voedsel'. Parasitos betekent letterlijk iets dat mee-eet. Deze organismen kunnen daardoor ten koste van de gastheer overleven. Parasieten kunnen onderverdeeld worden in drie groepen, de protozoa, helminten en geleedpotigen. Protozoa zijn eencellige organismen, helminten zijn wormen en geleedpotigen zijn insecten, schaaldieren en spinachtigen. Vier soorten van protozoa, namelijk *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica*, *Cryptosporidium* species en *Cyclospora cayetanensis*, worden hieronder beschreven [22].

Giardia lamblia

Zoals in figuur 5 te zien is, is *Giardia Lamblia* (oftewel *G. duodenalis*, *G. intestinalis*) een flagellaat parasiet, wat betekent dat het gebruik maakt van zweepachtige draden (acht flagelen) om zich voort te bewegen. Deze protozoaire species komt wereldwijd voor en veroorzaakt giardiasis. Besmetting treedt op via fecaal-oraal contact, waardoor het kan optreden door contact met besmet water, besmet voedsel en via lichamelijk contact. De ziekte komt voornamelijk voor in gebieden met slechte sanitaire systemen en ongefilterd drinkwater. Giardiasis is een infectie in de dunne darm. Hier zullen ingeslikte cysten van de parasiet openen en tot leven komen. Doordat het een watergedragen parasitaire ziekte is, kunnen ook zoogdieren besmet raken. Het is echter niet geweten hoe vaak huisdieren de ziekte op hun baasje overdragen [23]. De hoeveelheid aan cysten die nodig is om de ziekte op te wekken, is bijzonder laag. Slechts 10-25 cysten zijn nodig om in 32% van de onderzochte patiënten reeds giardiasis te veroorzaken en indien er een opname is van meer dan 25 cysten dan is de patiënt met 100% zekerheid drager [24].



Figuur 5: *Giardia lamblia* parasiet

Meestal is giardiasis een infectie die na een paar weken vanzelf overgaat. Echter kan een patiënt er chronische diarree of een darmprobleem aan overhouden. Hoewel verschillende geneesmiddelen effectief zijn tegen de parasiet, zal niet elke persoon reageren op de medicatie. Hierdoor is preventie noodzakelijk [25].

Giardiasis is de meest voorkomende parasitaire gastro-intestinale aandoening met 20% van de wereldbevolking als chronisch geïnfecteerde patiënten. De symptomen van de ziekte zijn te wijten aan een trofozoiet, wat de actieve vorm van de parasiet is. Deze heeft een zuignap, waarmee het zich aan het slijmvlies van de dunne darm kan hechten. Trofozoieten zijn echter niet verantwoordelijk voor de verspreiding, vermits ze niet in leven blijven buiten het lichaam. De verspreiding gebeurt door een inactieve vorm van de parasiet, een cyste genoemd. Zo een cyste kan langdurig buiten het lichaam overleven. Als het eenmaal wordt opgenomen, zal het zich na aanraking met maagzuur ontwikkelen tot een trofozoiet. Deze maakt weer nieuwe cysten aan die het lichaam verlaten via de ontlasting. Zo kan de parasiet zich van persoon tot persoon verspreiden [25].

De symptomen die het meest voorkomen zijn diarree en buikpijn met veel krampen. Bij 60% tot 90% van de patiënten komt zelfs aanhoudende diarree voor. Andere symptomen zijn misselijkheid, vermoeidheid en gewichtsverlies, wat optreedt als giardiasis de absorptie van vet in de darm weerhoudt. Als patiënten niet behandeld worden, kunnen de klachten tot jaren aanhouden. Het is mogelijk dat de symptomen worden veroorzaakt door een bacteriële overgroei in de dunne darm [25].

Als behandeling wordt metronidazol (Flagyl) toegediend gedurende vijf tot tien dagen. Ondanks dat het in minstens 85% van de gevallen positief werkt, veroorzaakt het vaak bijwerkingen zoals een metaalachtige smaak, duizelig- en misselijkheid. Een ander medicament is fuazolidon (Fluroxone) dat gedurende zeven tot tien dagen moet worden genomen. De effectiviteit van deze behandeling bedraagt meer als 90% van de behandelde patiënten. Om de symptomen te behandelen wordt er een dieet toegepast. Het is hierbij noodzakelijk om minimaal drie liter water per dag te drinken om uitdroging te vermijden. Vloeistoffen met suiker en zout zijn ook goed, omdat ze het vocht in het lichaam behouden. Sportdranken, frisdranken en vruchtensappen worden afgeraden. Een mogelijke bijwerking die tot 40% bij volwassenen voorkomt is de ontwikkeling van lactose-intolerantie [25].

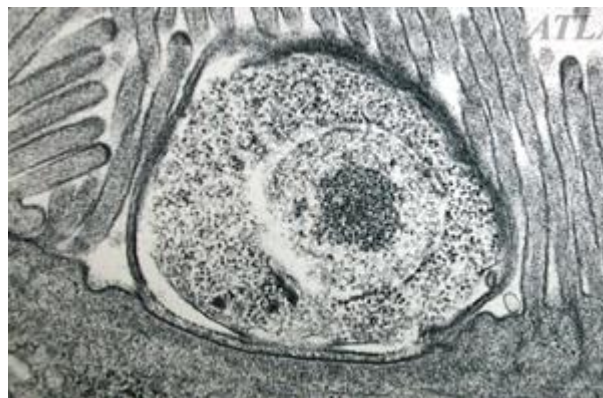
Cryptosporidium

Cryptosporidium is een apicomplexa protozoa. Deze sporenvormende parasieten kunnen elk binnendringen in de cellen van de gastheer m.b.v. unieke organellen. Een infectie kan door een grote variëteit van verschillende soorten worden veroorzaakt. Hierbij zal de eencellige parasiet het lichaam binnendringen. Vervolgens zal het zich verplaatsen tot het darmkanaal, waar het zich in de wanden van de dunne darm nestelt en vermeerdert (zie figuur 6). Tenslotte zal de parasiet het lichaam weer verlaten via de ontlasting. Deze ontlasting is ook de besmettingsbron, waarmee contact vermeden moet worden. Net zoals giardiasis kan het ook verkregen worden door het drinken van besmet water of het eten van ongekookt voedsel dat ermee besmet was. Deze parasiet ontwikkelt twee soorten oöcysten, namelijk één met een dunne en één met een dikke wand. De dikke wand oöcyst is degene die in de ontlasting zit en voor de besmetting zorgt. Een dikwandige oöcyst bestaat uit vier dunwandige, die vrijkomen nadat de wand breekt bij de opname van de oöcyst [26].

Over het algemeen heeft de besmetting alleen waterige diarree als gevolg. Dit en nog andere symptomen zoals koorts, gewichtsverlies en misselijkheid kunnen tot twee weken aanhouden. Mensen met een verzwakt immuunsysteem zijn gevoeliger voor de ziekte en zonder behandeling kan het bij deze personen zelfs dodelijk zijn. Er zijn ook gezonde mensen die na de infectie geen symptomen ervaren [26]. Cryptosporidiosis is een zeer infectieuze ziekte. Er zijn namelijk maar $10-10^3$ oöcyten nodig om de ziekte bij de mens te verwekken met gemiddelde infectieuze dosis van 10^2 oöcyten [27]. Indien rekening wordt gehouden met immunodeficiëntie personen is de infectieuze dosis echter maar één tot vijf oöcyten [28].

De parasiet is zelf moeilijk te behandelen. Door zijn buitenmantel is hij namelijk resistent tegen vele op chloor gebaseerde desinfectiemiddelen. Daarnaast wordt hij niet effectief verwijderd door vele waterfilters (hij is slechts 3-6µm groot) en overleeft hij bij verschillende temperaturen. Alleen door bevroering of koken kan hij effectief vernietigd worden [26].

Om een diagnose te kunnen stellen wordt een ontlastingsonderzoek uitgevoerd. Hierbij wordt nagegaan of het DNA van de parasiet al dan niet aanwezig is. Bij een positieve test zullen mogelijke complicaties worden opgespoord bv. controle van de lever (kijken of infectie zich verspreidt). Een echte behandeling is er niet, wat meestal ook niet nodig is, vermits vele mensen herstellen binnen twee weken. Als een persoon een verzwakt immuunsysteem heeft, zal hij wel een behandeling krijgen om de symptomen te verlichten en ter verbetering van het immuunsysteem. Zo kan er bijvoorbeeld vocht en anti-parasitaire middelen worden toegediend [29].



Figuur 6: Trofozoiet van Cryptosporidium parvum op het oppervlak van intestinale epitheelcellen

Entamoeba histolytica

Deze eencellige parasiet is, zoals de naam het zegt, een amoebe. Dit betekent dat de darmparasiet van vorm kan veranderen. Hij veroorzaakt een infectie (amoebiasis) van de dikke darm, maar kan ook andere organen aantasten. Deze ziekte heeft hetzelfde principe als *Giardia lamblia*: er zijn namelijk twee vormen; een actieve parasiet en een cyste in rusttoestand. Wanneer cysten worden opgenomen zullen deze openbreken en komen de trofozoïeten vrij (zie figuur 7). Deze veroorzaken zweren in de darmen, met name op de binnenwand (dit zijn de darmplooiën met darmvlokken) met diarree als gevolg. Zowel de cysten als de trofozoïeten worden uitgescheiden, maar enkel de cysten kunnen buiten het lichaam overleven. Als deze worden opgenomen door een nieuwe persoon begint de cyclus opnieuw [30].

Amoebiasis is een ziekte die voornamelijk in Latijns-Amerika, Afrika en het Indisch subcontinent voorkomt. Als de ziekte in Europa voorkomt is het waarschijnlijk een importziekte [30]. De gemiddelde infectieuze dosis aan cysten is meer dan 1000 organismen, maar er zijn echter ook gevallen geweest waarbij de ziekte reeds werd veroorzaakt door de opname van maar één cyste [31].

Niet iedereen die geïnfecteerd is met de ziekte ontwikkelt de symptomen. Patiënten die wel symptomen vertonen hebben last van flatulentie en diarree en soms zelf slijm en bloed in de ontlasting. Als iemand een chronische infectie heeft dan uit zich dat in een gewichtsafname en in bloedarmoede. Ook kan er een amoeboom (grote klonter) worden gevormd die de darm afsluit. Een ernstig symptoom dat soms optreedt is dat de trofozoïeten de darmwand perforeren. Hierdoor komen ze in de buikholte terecht, wat een buikinfectie als gevolg heeft [30].

Ter diagnose kan de dikke darm bekeken worden met een colonoscoop voor de detectie van eventuele zweren. Ook worden monsters van de ontlasting genomen om onderzoek op uit te voeren. Ten slotte kan het moeilijk zijn om de diagnose te stellen, wanneer de ziekte zich naar andere organen heeft verspreid. Hierdoor komt het voor dat er geen parasieten meer aanwezig zijn in hun feces. Als er een vermoeden is van een leverabces kan anti-amoebica toegediend worden. Op basis van de al dan niet positieve respons hiervan kan een diagnose gesteld worden. Een voorbeeld van zo een anti-amoebica is Metronidazol, maar dit vernietigt niet altijd alle cysten aanwezig in de ontlasting. Hiervoor kan er bijvoorbeeld diloxanide gebruikt worden [30].

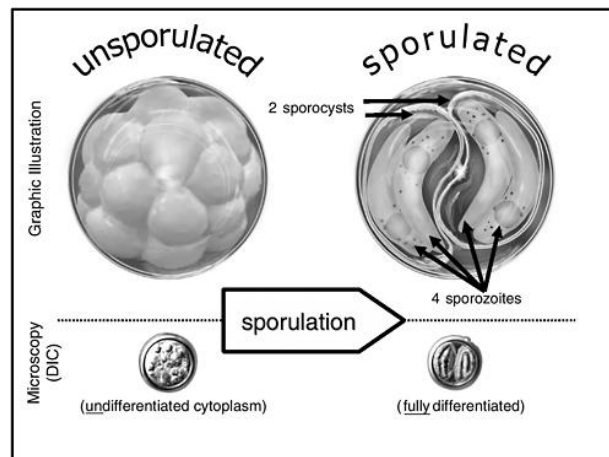


Figuur 7: Entamoeba histolytica trofozoiet

Cyclospora cayetanensis

De laatste protozoa parasiet die in deze studie wordt onderzocht is *Cyclospora cayetanensis*. Kenmerkend voor een infectie hiermee is de waterige diarree en de lange duur (tot enkele weken) hiervan. Ook andere symptomen zoals vermoeidheid, misselijkheid en gewichtsverlies treden op. Zowel immuun competente als immuun gecompromitteerde patiënten kunnen een infectie oplopen, door het eten en drinken van besmet water en voedsel. Er is nog geen overdracht van mens op mens bekend. De parasiet komt voornamelijk voor in tropische gebieden. Dit maakt het ook een oorzaak van reizigersdiarree. In landen waar het een endemische ziekte is, treedt het voornamelijk op bij kinderen jonger dan 10-15 jaar. Kleine kinderen van minder dan 18 maanden zijn minder frequent geïnfecteerd [32]. Cyclosporiasis heeft een zeer kleine dosis nodig, namelijk 10-100 oöcyten, om infectieus te zijn [33].

In figuur 8 is te zien dat de oöcyten die aanwezig zijn in de stoelgang van een besmette patiënt gewoonlijk sferisch zijn met een duidelijke afgelijnde rand. Er zijn meerdere grote korrels aanwezig, waardoor zijn uitzicht gelijkenissen vertoont met een morula. In een gesporuleerde oöcyte zijn er twee sporocysten aanwezig, met elk weer twee sporozoïeten [34]. In tegenstelling tot andere parasieten zijn de oöcyten van *Cyclospora cayetanensis* in de stoelgang nog niet besmettelijk. De sporulatie begint namelijk pas na enkele dagen of weken bij een temperatuur van 22° tot 32°C. Hierdoor kan fecaal-oraal besmetting ook niet optreden [35]. Een infectie krijgen gaat vaak gepaard met het eten en drinken van besmet voedsel.



Figuur 8: Verschil ongesporuleerde en gesporuleerde oöcyten *Cyclospora cayetanensis*

2.2 PCR

PCR, wat staat voor polymerase chain reaction, is een techniek die gebruikt wordt om desoxyribonucleïnezuur (DNA)-fragmenten exponentieel te amplificeren. De techniek imiteert de cellulaire DNA-replicatie m.b.v. bepaalde reactiecomponenten en een temperatuurprofiel [36].

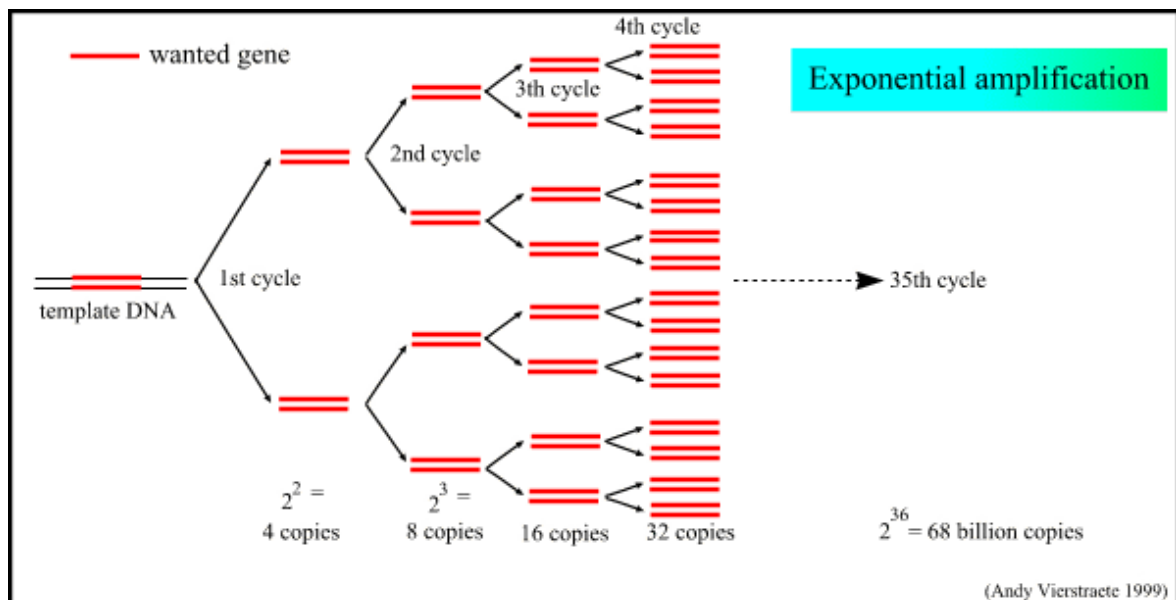
2.2.1 Reactiecomponenten

Om een PCR-reactie succesvol te laten verlopen zijn er meerdere reactiecomponenten vereist. Als eerste is er nood aan een DNA-polymerase dat thermostabiel is. Deze heeft als functie de synthese te katalyseren. Met andere woorden versnelt het de vorming van DNA. Een voorbeeld en veelgebruikt enzym is *Thermus aquaticus* (Taq)-polymerase. Ook moeten er desoxyribonucleotide trifosfaten (dNTP's) aan de reactie toegevoegd worden. Dit zijn de bouwstenen van DNA om een dubbelstrengige DNA-streng te maken. Bij het maken van de reactiemix wordt water als eerste toegevoegd gevolgd door de buffer. Deze laatste component is nodig om de pH te optimaliseren en de ionische sterkte te garanderen. Vervolgens moeten er ook primers aan de reactiemix worden toegevoegd. Dit zijn korte stukjes DNA die dienen als startplaats en stopplaats voor de synthese. De primers zullen binden aan het gedeneatureerde template DNA. Tenslotte worden er ook cofactoren zoals magnesium toegevoegd [36].

2.2.2 Temperatuurprofiel

Een PCR-reactie bestaat uit drie grote stappen, namelijk een denaturatie-, annealing- en elongatiestap. Allereerst wordt de template DNA-streng enkelstrengig gemaakt. Vervolgens bindt aan elke streng een primer en tenslotte wordt het weer een dubbelstreng door de aanhechting van complementaire dNTP's aan het 3' uiteinde van elke primer door het DNA-polymerase [37].

Elke stap heeft het beste resultaat bij een andere temperatuur. Hierdoor moet er een temperatuurprofiel voor de reactie ingesteld worden om optimale resultaten te verkrijgen. De denaturatiestap vereist een temperatuur van 94-95°C om de waterstofbindingen tussen de complementaire basen te verbreken. Hierna volgt de annealing, wat gebeurt bij een temperatuur van 37-65°C, zodat de primers nieuwe waterstofbruggen met de matrijsstreng kunnen maken. Idealiter ligt de temperatuur hier tussen 55°C en 65°C. Tot slot is er nog een elongatiestap op 72°C, waarbij het DNA-polymerase geactiveerd wordt. De tijden die bij elk van deze stappen horen, zijn afhankelijk van de lengte van het amplicon. Deze drie stappen vormen een cyclus. Afhankelijk van de reactie worden er 25-40 cycli doorlopen. Zoals in figuur 9 te zien is, is de PCR-amplificatie een exponentiële techniek. Hierdoor zullen er na 30 cycli reeds meer dan een miljard amplicons gelijk zijn aan de targetsequentie [37].



Figuur 9: PCR-amplificatie

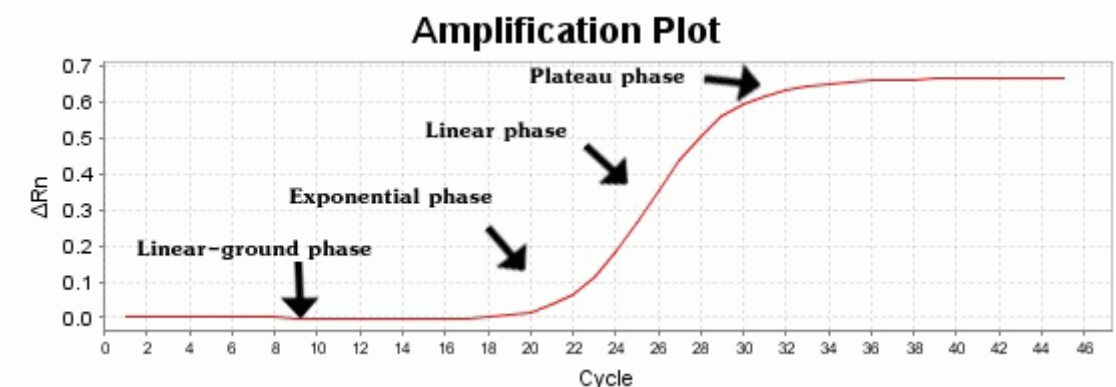
Na de amplificatie van het gen via traditionele PCR kan het geamplificeerde DNA op een agarosegel worden geladen. Met behulp van gelelektroforese en het toevoegen van een DNA-bindende kleurstof (bv. gelred, Ethidiumbromide en SYBR green) kan het amplicon zichtbaar worden gemaakt. Als er dan een heel felle kleur is, dan zijn er veel kopieën van het DNA [36].

2.2.3 Real-time PCR

2.2.3.1 Principe

Real-time PCR is een techniek die is afgeleid van de standaard PCR. Er zijn heel wat overeenkomsten, maar ook enkele grote verschillen. Real-time PCR verschilt van gewone PCR doordat er na elke cyclus (in real time) de hoeveelheid aan gevormde PCR-producten wordt bepaald. In figuur 10 komt dit overeen met de exponentiële en lineaire fase. Gedurende deze fasen meet de real-time PCR de gevormde producten. Er kan dan ook m.b.v. standaarden en ijklijnen de hoeveelheid aan startmateriaal worden bepaald. Het is een soort van kwantitatieve PCR en wordt

bijgevolg ook qPCR (*quantitative*) genoemd. De standaard PCR daarentegen meet de producten pas in de plateau fase, maar omdat een PCR-reactie exponentieel verloopt, is het niet mogelijk om accuraat de beginwaardes hieruit te bepalen [38].



Figuur 10: Amplificatie curve

Het principe van de qPCR-techniek berust op het meten van de geamplificeerde producten met behulp van een fluorescent label. Tijdens de amplificatie zal een fluorescente kleurstof binden aan de geamplificeerde DNA-moleculen. Hierdoor ontstaat er fluorescentie die recht evenredig is aan de DNA-concentratie. De amplificatie zal vervolgens gemeten worden door een spectrometer die in het PCR-toestel aanwezig is. Derhalve moet er een ander soort thermocycler gebruikt worden dan bij gewone PCR [39].

De fluorescente kleurstof kan zowel direct als indirect binden aan de geaccumuleerde DNA-moleculen. SYBR green is een voorbeeld van een directe DNA-bindende fluorescente kleurstof die niet specifiek is. Anderzijds worden probes gebruikt die sequentie specifiek zijn om de fluorescente kleurstof indirect te binden aan de DNA-moleculen. Deze probes werken op een soortgelijke manier als primers. Dit betekent dat het ook oligonucleotiden zijn die binden op de matrijsstreng. De probes vervangen de primers echter niet en binden ook niet op dezelfde sequentie van het DNA. Primers dienen ervoor om het DNA af te bakenen en probes zullen in dit afgebakende gebied binden. Dit tweede type van oligonucleotide is gelabeld met een reporter fluorescerende kleurstof en een quencher kleurstof. Als de probe intact is, zal de quencher de geëmitteerde fluorescentie van de reporter reduceren. Wanneer de probe bindt in het amplicon zal deze quenching verstoord raken waardoor er fluorescentie door de reporter wordt uitgezonden. Afhankelijk van het type probe zal de fluorescentie ontstaan in een andere stap van het temperatuurprofiel [40].

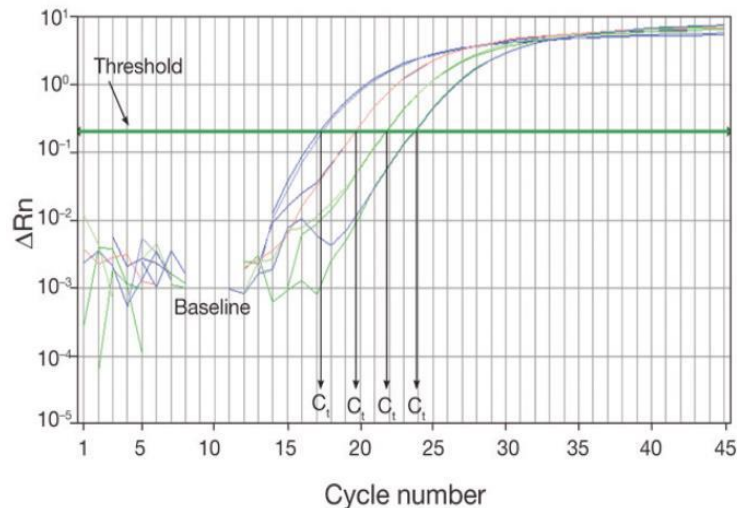
Het gebruik van Real Time PCR heeft enkele voordelen t.o.v. de klassieke PCR. Om te beginnen geeft het een beeld van de reactie. Er kan waargenomen worden welke reacties wel en niet gewerkt hebben. Ook kan de efficiëntie precies worden berekend. Verder moet er geen post-PCR analyse zoals gelelektroforese worden uitgevoerd. Het grootste voordeel blijft dat er met de data van real-time PCR echte kwantitatieve analyses kunnen worden uitgevoerd. Bij standaard PCR is dit eerder semi-kwantitatief.

2.2.3.2 Verwerking resultaat

De data worden geanalyseerd aan de hand van gespecialiseerde softwareprogramma's om het resultaat te verwerken. Deze data worden m.b.v. verschillende grafieken en waardes uitgedrukt.

In figuur 11 is een mogelijk resultaat van een real-time PCR weergegeven. Onder de groene rechte kunnen er hoekige lijnen worden waargenomen. Dit zijn de basislijnen van de curves, wat het signaal is dat voornamelijk gedurende de eerste cycli voorkomt. Deze fluorescentie ontstaat door

de veranderende reactiecondities in de PCR, waardoor er als het ware een achtergrondruis ontstaat. Met behulp van deze achtergrondruis in de initiële cycli bepaalt men de basislijn fluorescentie. Deze moet zorgvuldig worden gesitueerd om een nauwkeurige bepaling van de threshold toe te staan. Zonder het meten van de achtergrondruis en het instellen van de basislijn kan men nooit exact meten hoeveel de targetsequentie bedroeg in het staal [41].



Figuur 11: Resultaat van een real-time PCR-reactie

Vervolgens wordt de threshold ingesteld. Dit is een waarde die voor elke run een statistisch significant punt boven de basislijn aangeeft. Deze waarde, ook de drempelwaarde genoemd, stelt men in op het buigpunt van de curve [41]. Hiermee kan men de Ct-waarde bekomen. Deze cycle threshold geeft het cyclinummer aan bij welke de amplificatie tot boven de threshold is gekomen. Met andere woorden: de Ct-waarde geeft aan wanneer een bepaalde well voldoende geamplificeerde amplicons bevat om statistisch gezien significant boven de basislijn te liggen [41].

Ct-waardes zijn invers aan de hoeveelheid nucleïnezuur in het staal. Dit betekent dat als een Ct-waarde onder de 29 cycli ligt er overvloedig nucleïnezuren aanwezig zijn en als de Ct-waarde boven de 38 cycli ligt er minimale hoeveelheden aanwezig zijn en er misschien een contaminatie is. Fluorescentie die men meet aan het begin van de exponentiele fase van de cycli is veel accurater dan op het eindpunt van de reactie. Als dit eindpunt wordt bereikt, zullen inhibitoren geaccumuleerd zijn, polymerases geïnactiveerd en reagentia gelimiteerd, waardoor er veel variatie op de waardes van het eindpunt ontstaat. De software zal zelf de berekeningen maken en de grafieken van de Ct-waardes opstellen [42].

Om de resultaten juist te interpreteren moeten de Ct-waardes ook correct zijn. Deze zijn echter afhankelijk van verschillende factoren. Zo zal de geëmitteerde fluorescentie beïnvloed worden door de pH en zoutconcentratie in de buffer [42].

Ook de efficiëntie van de reactie is van belang. Dit hangt af van de mastermix, het PCR-programma en de kwaliteit van het staal. Om deze efficiëntie te bepalen moet er een seriële verdunning worden gemaakt van een gekende concentratie. Van deze verdunningen moet telkens de log-waarde berekend worden. Deze waarden worden uitgezet in een grafiek en hierdoor wordt een trendlijn getrokken. De bekomen curve wordt de standaardcurve genoemd. Als de R^2 -waarde hiervan groter is dan 0,99 dan is de efficiëntie van de reactie in orde. Hieruit kan ook de hoeveelheid initieel DNA in het staal worden berekend. De R^2 -waarde, ook het kwadraat van de correlatiecoëfficiënt genoemd, geeft aan hoe goed de lineariteit van de curve is. Een optimale waarde hiervoor is één [42].

2.2.4 Multiplex PCR

Met behulp van multiplex PCR kunnen meerdere targets amplificeren in één PCR-reactie. Hiervoor moeten meerdere primerparen gebruikt worden in dezelfde reactie. Bij de ontwikkeling van deze primers wordt rekening gehouden met hun onderlinge complementariteit. Als er maar twee primers in de hele mix een grote complementariteit hebben, kunnen er reeds primerdimeren ontstaan. Het voordeel aan deze techniek is dat er veel tijd en moeite bespaard wordt [43].

Er bestaan twee soorten multiplex PCR, namelijk single template PCR en multiple template PCR. Bij de techniek waar er maar één template wordt gebruikt, zullen verschillende forward en reverse primers binden op verschillende delen van dezelfde template. Hierdoor kunnen meerdere genen op hetzelfde template DNA geamplificeerd worden. De multiple template PCR reactie gebruikt meerdere templates en primerpairs. Hierdoor kunnen verschillende genen op verschillende DNA-fragmenten vermenigvuldigd worden [43].

Een multiplex PCR-reactie staat of valt bij een goed primerontwerp. Al de primers moeten aan dezelfde eisen voldoen, maar mogen niet complementair zijn aan elkaar. De primers van een multiplex PCR zijn eerder kort, met ongeveer 18-22 basenparen. Al de primers moeten ook een vergelijkbare T_m hebben van ongeveer 55-60°C. Als de primers een hoog percentage hebben aan G- en C- basen, dan moet de smelttemperatuur vanzelfsprekend hoger liggen. De T_m is in zo een geval liefst 75-80°C. De verschillende smelttemperaturen mogen tot 3°C à 5°C verschillen [43].

Het voordeel van multiplex PCR is dat elk amplicon een interne controle (IC) aanbiedt voor de andere geamplificeerde fragmenten. De kosten en tijden zijn ook verminderd t.o.v. meerdere singleplex PCR-reacties [43].

2.2.5 Nested PCR

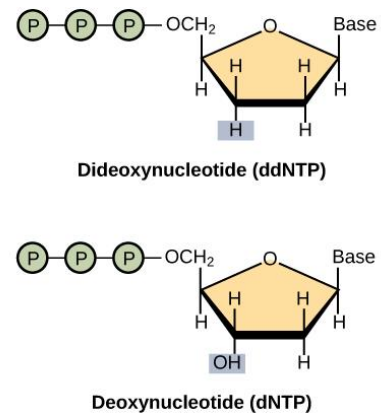
Nested PCR is een aanpassing aan de standaard PCR om contaminatie door aspecifieke bindingen te vermijden. Bij dit type PCR kan met een grotere zekerheid gezegd worden dat de verkregen sequentie na het uitvoeren van de PCR effectief de juiste is. Bij een gewone PCR kan er altijd een aspecifieke binding optreden tussen de matrijsstreng en de primers. Nested PCR lost dit op door extra primers toe te voegen aan de reactiemix, maar in tegenstelling tot multiplex PCR binden deze niet op andere delen van de sequentie. De extra primers zullen binden op het amplicon verkregen met de eerste PCR-reactie. Bij de ontwikkeling van nested primers moet er minstens één primerpaar gelegen zijn tussen een andere primerpaar. De nested primers kunnen alleen binden als de eerste primers specifiek zijn gebonden. Het verkregen amplicon, wat gelegen is in het eerste, is dan met een grote zekerheid specifiek. Indien het eerste primerpaar aspecifiek bindt, zal het nested primerpaar niet binden en wordt er geen amplicon verkregen. Dit type van PCR wordt ook twee-stage PCR genoemd, omdat er twee maal een normale PCR uitgevoerd wordt [44]. Samengevat zorgt nested PCR voor de verhoging van de betrouwbaarheid, zeker als er van minimaal doelwit-DNA wordt uitgegaan [44].

2.3 DNA-Sequencing

Het doel van DNA-sequencing is de precieze volgorde van nucleotiden te bepalen van een stuk DNA. Op basis van de bepaalde DNA-sequentie kan dan worden nagegaan van welk species dat DNA afkomstig was, of er eventuele mutaties aanwezig zijn die wijzen op bv. een erfelijke aandoening etc. Bij zo een sequentiereactie wordt er steeds vertrokken van een templatestreng. Zoals in een normale PCR-reactie wordt er hiermee een nieuwe streng gemaakt. Het verschil is dat er bij een sequentiereactie nog extra additieven worden toegevoegd. Traditionele methoden voor het uitvoeren van sequentieanalyses zijn de methode van Maxam-Gilbert en van Sanger. De eerste traditionele methode (Maxam-Gilbert) is ook gekend als de chemische sequencing van het DNA.

Radioactieve labels worden toegevoegd aan de reactie en het DNA zal in verschillende fragmenten worden afgesplitst. Het feit dat het een destructieve methode is en er radioactieve stoffen worden toegevoegd heeft het gebruik ervan na de verfijning van de Sangermethode sterk verminderd [45].

Deze tweede methode (Sanger), die ongeveer op hetzelfde moment is ontwikkeld, is gebaseerd op de terminatiereactie. Bij een gewone PCR zal het DNA-polymerase aan ketenverlenging doen vanaf een vrij 3'OH-uiteinde. Het principe van de terminatiereactie berust daarom op het toevoegen van de vier dideoxynucleotiden (ddNTP's) aan een polymerisatiereactie. Zoals in figuur 12 te zien is, zijn dit deoxynucleotiden (dNTP's) die geen OH-, maar een H-groep hebben op de 3'-positie. Door het gebrek aan het zuurstofatoom kan de fosfodiësterbinding niet worden gemaakt waardoor, op de plaats waar een ddNTP bindt, de ketenverlenging stopt. Om informatie van de sequentie te verkrijgen, zullen er vier reacties worden gemaakt met elk een ander ddNTP (ddATP, ddTTP, ddCTP of ddGTP) [45].

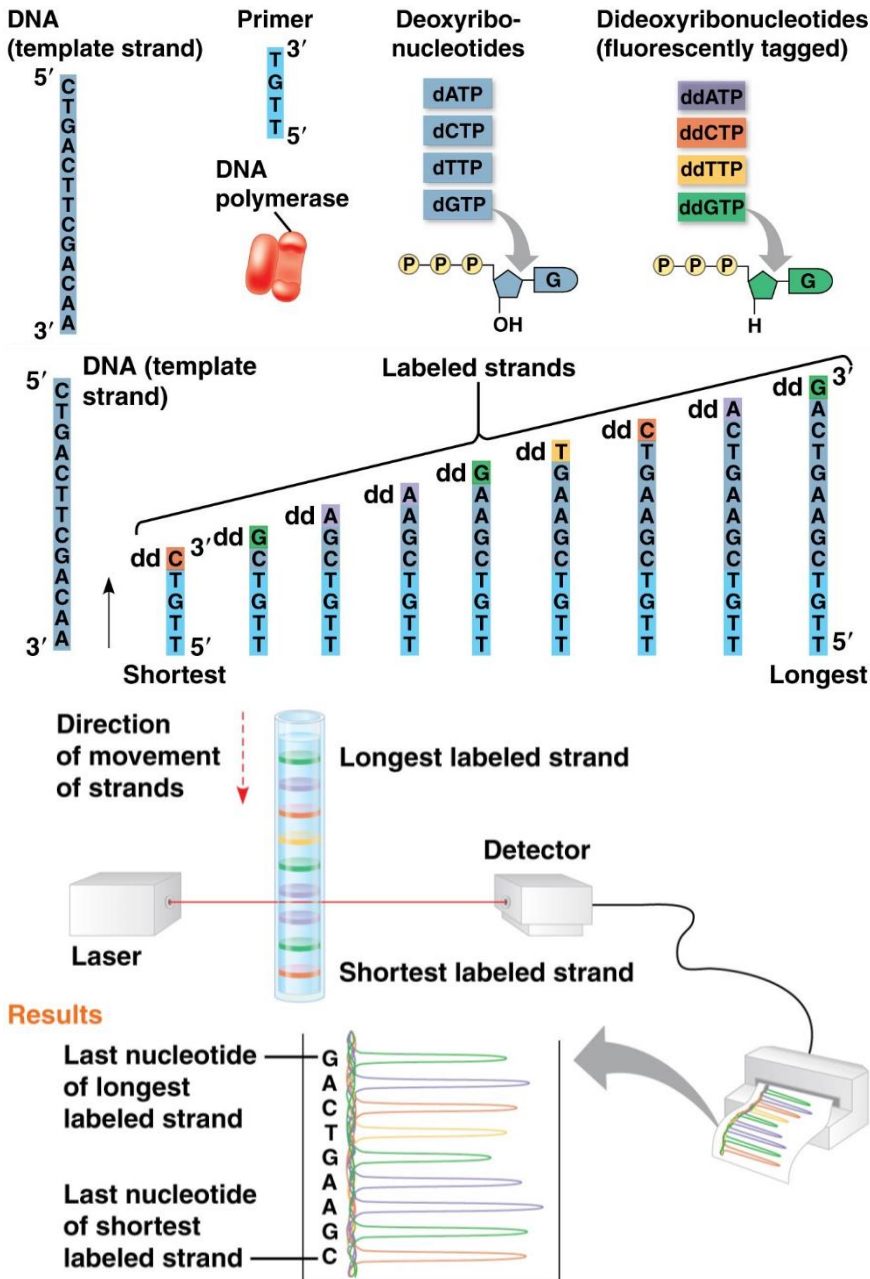


Figuur 12: Verschil dNTP met ddNTP

Elke reactietube bevat het template DNA, een korte primer van ongeveer 20 nucleotiden, een DNA-polymerase, de vier dNTP's en tenslotte ook één soort ddNTP die radioactief of fluorescent gelabeld is. Door de replicatie meermaals uit te voeren, zullen verschillende fragmenten ontstaan met elk een andere hoeveelheid aan nucleotiden. Op elke plek in de sequentie zal uiteindelijk eens een ddNTP worden ingebouwd. De verschillende verkregen fragmenten worden dan per tube geladen op een ander slotje van een polyacrylamidegel die renaturatie van de DNA-strengen voorkomt. Het negatieve DNA zal migreren naar de positieve pool volgens het principe van gelelektroforese en de kleinste DNA-moleculen zullen het verste migreren. Vermits het ddNTP radioactief of fluorescent gelabeld is, zullen na visualisatie met radioactieve straling of fluorescentie verschillende banden zichtbaar worden in de verschillende lanen. Deze banden worden bekeken van onder naar boven op de gel. De sequentie van de bijhorende ddNTP's van elke laan geeft zo de sequentie van de nucleotiden in het template DNA [45].

Een nieuwere methode die in het ZOL wordt toegepast is cycle sequencing. In figuur 13 is deze techniek, die zijn basis vindt in de methode van Sanger, weergegeven. Verschillen zijn dat er gebruik wordt gemaakt van vier verschillende fluorescente labels, waardoor er maar één reactietube nodig is. Ook kan het resultaat zowel via een polyacrylamidegel als via capillaire elektroforese (CE) bestudeerd worden. Bij zowel de polyacrylamide gelelektroforese (PAGE) als de CE zit onderaan de gel een laser die het geëmitteerde gekleurde licht van de ddNTP's meet en dit verwerkt tot een kleurenband op een gesimuleerde gel. Omdat elk type ddNTP met een ander fluorofoor gebonden is, is de fluorescentie specifiek voor het type ddNTP. Met behulp van computerprogramma's wordt deze data omgezet in een elektroferogram met gekleurde pieken die elk een nucleotide van de sequentie voorstellen. Al deze nucleotiden achter elkaar geven de volledige sequentie [45].

Technique



© 2014 Pearson Education, Inc.

Figuur 13: Principe terminatiereactie bij cycle sequencing

2.4 Massaspectrometrie

Massaspectrometrie (MS) is een nauwkeurige analytische methode die gebruikt wordt voor het detecteren van moleculen. Hierbij wordt zowel de hoeveelheid van dit materiaal gemeten; worden onbekende bestanddelen van een staal geïdentificeerd en kan de structuur met zijn chemische eigenschappen worden ontrafeld. Het staal wordt hiervoor omgezet in gasvormige ionen die dan op basis van hun verhouding massa op lading worden gescheiden. Vervolgens wordt de relatieve abundantie (voorkomen) van elk type ion bepaald [46].

Een massaspectrometer bestaat uit drie componenten. Allereerst zullen er ionen in de gasfase worden geproduceerd door elektrische ionisatie. Dit gebeurt in de ionenbron. Vervolgens worden

de ionen in de massa-analyzer gescheiden op basis van hun massa-lading verhouding en deze worden gedetecteerd in de ionendetector. Deze zet dit om in een elektrisch signaal wat door software verwerkt wordt in een massaspectrum [46].

2.5 Toestellen

Hieronder worden de toestellen besproken die gebruikt werden voor de DNA-extractie, real-time PCR en nested PCR alsook voor de identificatie van bacteriën.

2.5.1 QIASymphony

De QIASymphony is een volledig automatisch nucleïnezuurextractie toestel. Dit toestel van Qiagen wordt gebruikt om extracten te verkrijgen die bruikbaar zijn bij latere moleculaire technieken, zoals hier qPCR. Het toestel werkt volgens het principe van magnetische silica beads. Deze beads zijn aanwezig in de extractiekit. Voor de extractie van DNA uit parasieten wordt er geopteerd voor de “QIASymphony DSP Virus/Pathogen Midi Kit” [47].

Het werkingsprincipe van de QIASymphony bestaat uit vier stappen: lysis, binden, wassen en elueren. Allereerst wordt het staal gelyseerd met de lysisbuffer (ATL-buffer: Animal Tissue Lysis). Het gelyseerde staal wordt samen met de magnetische beads in een *sample prep cartridge* gebracht. De nucleïnezuren zullen dan binden aan deze magnetische beads m.b.v. een bindingsbuffer. Deze bevat het chaotropische zout guanidine thiocynaat. Het precieze werkingsprincipe achter de binding van DNA aan de magnetische beads is niet gekend. Zoals hoger vermeld is het wel geweten dat het toestel werkt met magnetische silica beads. Waarschijnlijk zijn de beads omgeven door een silicamembraan dat, met behulp van chaotropische zouten, kationbruggen vormen. Dit zijn Na^+ -ionen waaraan de negatief geladen fosfaatgroepen van DNA kunnen binden. Vervolgens wordt, zoals in figuur 14 is weergegeven, een magnetische staaf met een omhulsel in dit reagens gebracht. Door een op- en neerwaartse beweging worden alle magnetische beads verzameld. De magnetische staaf wordt vervolgens overgebracht in een tube met een wasbuffer. Hier zal het omhulsel snel op en neer bewegen. De magnetische beads laten daardoor los. Na deze wasstap herhaalt het proces zich, maar wordt het DNA van het silicamembraan geëluëerd. Hiervoor worden de magnetische beads met het DNA overgebracht in een zoutoplossing met lage concentratie (elutiebuffer). De natriumionen diffunderen naar deze buffer met het verbreken van de kationenbrug als gevolg. De binding van nucleïnezuren en magnetische beads zal hierdoor verbroken worden. De magnetische staaf wordt tenslotte nog in de laatste suspensie gestoken en enkel de magnetische beads worden verwijderd. Het eluaat wordt tenslotte overgepipetteerd in de bestemde tubes [47].

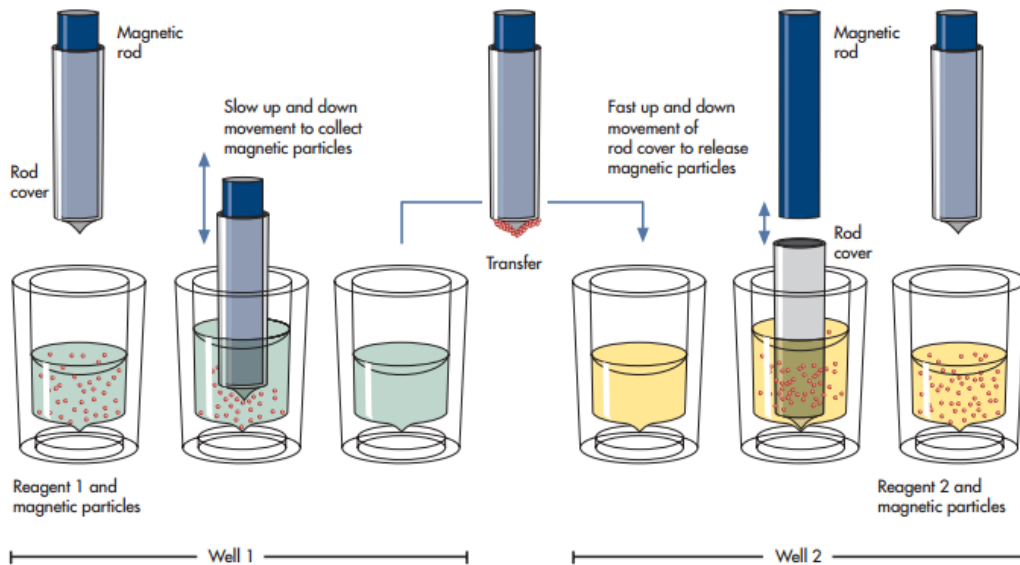


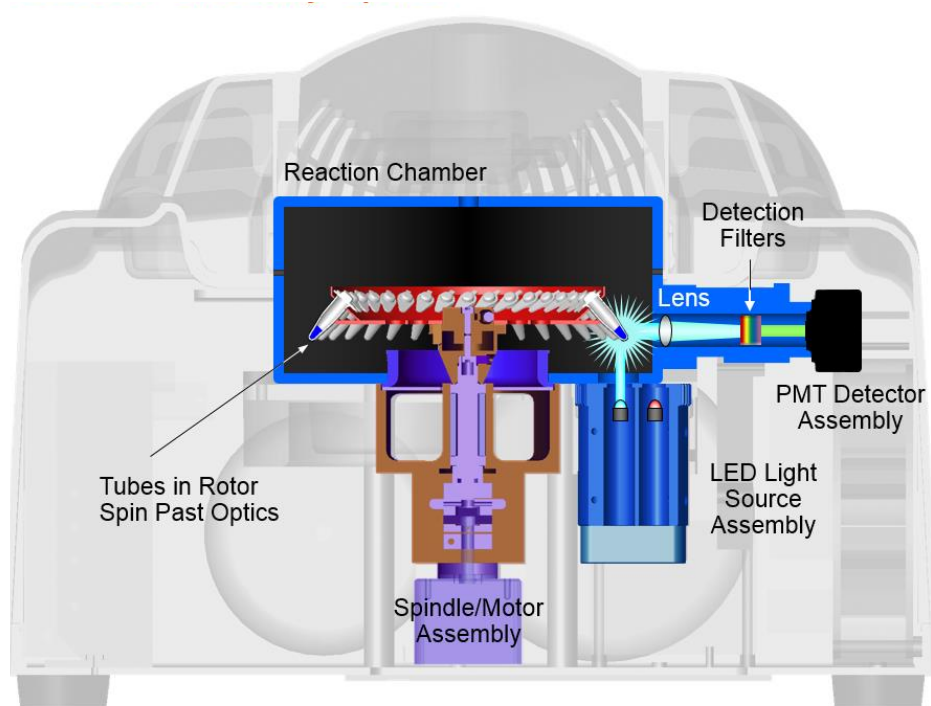
Figure 1. Schematic of the QIAasymphony SP principle. The QIAasymphony SP processes a sample containing magnetic particles as follows: A magnetic rod protected by a rod cover enters a well containing the sample and attracts the magnetic particles. The magnetic rod cover is positioned above another well and the magnetic particles are released. The QIAasymphony SP uses a magnetic head containing an array of 24 magnetic rods, and can therefore process up to 24 samples simultaneously. Steps 1 and 2 are repeated several times during sample processing.

Figuur 14: Werkingsprincipe QIAasymphony

2.5.2 Rotor-Gene

De Rotor-Gene 6000 is een real-time analyzer. Dit betekent dat het de DNA-concentratie na iedere cyclus kan bepalen. Anders dan de meeste real-time PCR-toestellen bevat het geen 96- of 384-well-plaat, maar heeft het een rotor. Hierdoor heeft iedere reactietube identiek dezelfde condities, zoals identiek dezelfde temperatuur. Op een well-plaat verschilt deze temperatuur wel tussen verschillende stalen [48].

De rotor draait tijdens de reactie continu aan 400 rotaties per minuut (RPM). Hierbij ondervinden de stalen een G-kracht van meer dan 10G. Dit zorgt ervoor dat het reagens op de bodem van de tube blijft. Daarnaast worden luchtballen en condensatie erdoor verwijderd, maar met deze snelheid zal er ook geen pellet ontstaan. Met de continue snelheid van 400 RPM zullen al de tubes de optische detector passeren in 0,15 seconden. Dit heeft als voordeel dat het sneller resultaten verkrijgt dan andere types van real-time PCR die met een carousel bij elke tube moeten pauzeren om de data te collecteren. Doordat elke tube dezelfde snelheid aanhoudt en elke tube dezelfde optische detector passeert (zie figuur 15), treden er geen variaties op tussen de verschillende tubes [48].



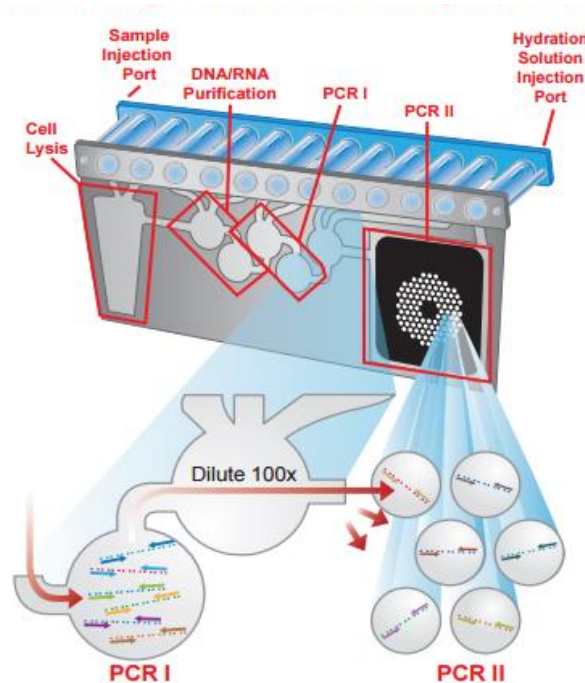
Figuur 15: Overzicht van een dwarsdoorsnede van de roterende optica in de Rotor-Gene 6000

Als eerste is er de reactiekamer. Dit gedeelte van de Rotor-Gene is, als het lid gesloten is, vrij van licht van buitenaf. Dit is essentieel vermits alleen het licht van de LED (light-emitting diodes)- bron aanwezig mag zijn. Deze kamer komt vrij wanneer het lid wordt opengeschoven. Hieronder zit de motor die de 36-well rotor doet draaien. De lichtbron is een set van verschillende LED's die kunnen ronddraaien. Er kunnen maximaal zes LED's aanwezig zijn in een Rotor-Gene, maar er zijn zeven soorten LED's. Deze zenden licht uit variërend van UV-licht tot infrarood licht. De verschillende soorten LED's zenden verschillende golflengtes aan licht uit, dit zijn: blauw, groen, geel, oranje, rood, crimson en HRM (High Resolution Melt channel). Hierdoor kunnen bij verschillende kanalen (= verschillende golflengtes) andere fluoroforen gedetecteerd worden. Op basis van deze zeven verschillende opties zijn er vijf verschillende modellen op de markt. Elk model bevat op zijn minst twee kanalen, namelijk het groene en gele kanaal. Het model dat bij het ZOL aanwezig is, is vijf-Plex wat betekent dat het groene, gele, oranje, rode en crimson kanaal erin verwerkt zitten [48].

Het LED-licht wordt door het staal weerkaatst op een lens. Deze bundelt het op een detectiefilter die het licht doorlaat tot aan de photomultiplier, die de optische signalen zal detecteren. Net als er tot zes LED's aanwezig zijn, zijn er tot zes filters. Doordat elke tube dezelfde optische pathway volgt is er bij de Rotor-Gene geen nood aan optische calibratie, zoals nodig in andere toestellen. Om het gewenste temperatuurprofiel te bekomen wordt verwarmde en gekoelde lucht tegen een hoge snelheid door de machine gestuurd. Deze lucht circuleert ook rond de tubes wanneer er fluorescente signalen gedetecteerd worden. Het mechanisme hierachter is dat tijdens de koelmodus door ventilatieopeningen gekoelde lucht wordt toegevoegd aan de onderkant van de reactiekamer. Verwarmde lucht verlaat de reactiekamer aan de bovenkant en zo blijft de reactiekamer gekoeld. Als er verwarmd moet worden, dan sluiten de ventilatieopeningen van de reactiekamer en zal een verwarmelement de temperatuur van de circulerende lucht doen verwarmen. Het grote voordeel van de LED's t.o.v. lampen en lasers is dat ze zeer lang meegaan, ongeveer 40 jaar in dit toestel. Daarnaast hebben ze een gefocuseerd licht-emitterend zone en kunnen verschillende LED's een fluorescentiekleur van infra rood tot ultra violet overspannen [48].

2.5.3 FilmArray

De FilmArray is een relatief klein toestel (40x25x16cm) dat gebruikt wordt om meerdere pathogenen in hetzelfde staal te detecteren. Dit toestel kan op een staal een nucleïnezuivering, reverse transcriptie en nested multiplex PCR uitvoeren op een volledige geautomatiseerde wijze en dit in ongeveer één uur tijd. Het toestel gebruikt hiervoor een pouche (zie figuur 16). Er zijn verschillende soorten op de markt, die elk voor andere syndroom-gerelateerde ziektes de pathogenen kunnen detecteren. Vermits in deze studie gastro-enteritis wordt onderzocht, wordt het gastro-intestinaal (GI) panel gebruikt [49]. In totaal kan het panel 22 targets detecteren, waaronder bacteriën, virussen en parasieten. Dit zijn "*Campylobacter* spp., *Clostridium difficile* (toxin A/B), *Plesiomonas shigelloides*, *Salmonella* spp., *Vibrio* spp., *Vibrio cholerae*, *Yersinia enterocolitica*, enteroaggregatieve *E. coli*, enteropathogene *E. coli*, enterotoxigene *E. coli*, Shiga-like toxin-producing *E. coli* (*stx1* and *stx2*) (including specific detection of *E. coli* O157), *Shigella* spp./enteroinvasieve *E. coli*, *Cryptosporidium* spp., *Cyclospora cayetanensis*, *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia*, adenovirus F 40/41, astrovirus, norovirus GI/GII, rotavirus A, and sapovirus" [2].

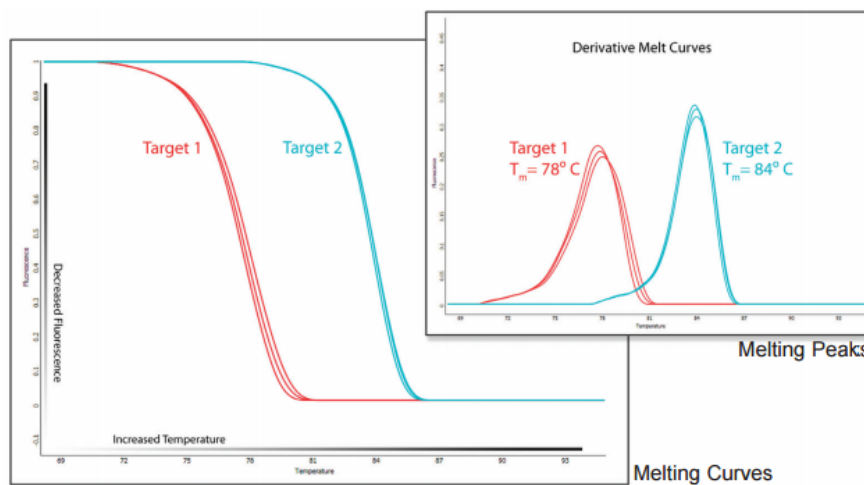


Figuur 16: De FilmArray Pouch

Als het fecesstaal geladen is, komt het in de lysiskamer terecht. Hier worden alle cellen en virussen gelyseerd door het toestel d.m.v. bead beating. Hierdoor komen de nucleïnezuren (DNA en RNA) vrij. Deze worden gebonden door magnetische beads en zullen van de lysiskamer naar de purificatiekamer gaan. Hier zal een wasbuffer alle overgebleven cellulaire en virale debris verwijderen. De FilmArray activeert hiervoor een magneet buiten de pouch die de magnetische beads op hun plaats houden. Het debris dat niet magnetisch is zal zo weggewassen kunnen worden. Vervolgens zal een elutiebuffer de gepurificeerde nucleïnezuren vrijzetten van de magnetische beads. Deze zullen opnieuw magnetisch op hun plaats gehouden worden, terwijl de nucleïnezuren worden afgevoerd naar de eerste fase PCR-kamer. Hier vindt een reverse transcriptiestap plaats om al het aanwezige target RNA om te zetten naar DNA. Dit wordt gevolgd door een high order multiplex PCR met duizenden primerparen. Tijdens deze eerste fase van PCR zullen verschillende reacties tegelijkertijd optreden. De producten van de eerste stap PCR worden dan verdund om alle overblijvende eerste stage primers te beperken [50].

Vervolgens zullen de verdunde eerste staps PCR-producten worden vermengd met een nieuwe mastermix en deze wordt hierna gealiquoteerd in elke well van het array. Aan deze zijn reeds op voorhand de tweede fase PCR-primers toegevoegd. Deze primers zijn zo ontwikkeld om sequenties in het product van de eerste fase PCR te amplificeren. Dit elimineert niet-specifieke producten die geassocieerd worden met traditionele multiplex PCR (omdat tweede fase primers enkel target DNA amplificeren) [50].

Ter detectie van de specifieke PCR-producten bevat de PCR-reactie een DNA-bindende kleurstof, namelijk LC Green Plus. Wanneer dit bindt aan dubbelstrengig DNA dan zendt deze kleurstof fluorescent licht uit, wat gedetecteerd wordt door het toestel. Wanneer de temperatuur stijgt zullen de kopieën van dubbelstrengig DNA smelten, waardoor het LC Green Plus vrijkomt en de fluorescentie daalt. Doordat alle amplicons een unieke sequentie hebben, gebaseerd op de templatestreng, zal ook de smeltemperatuur (T_m) verschillen. Bijgevolg wordt er als laatste cycli van de PCR nog een temperatuursverhoging van 60°C naar 94°C uitgevoerd. Wanneer de temperatuur de T_m -waarde van een amplicon bereikt zal deze denatureren. De fluorescentie zal wegvallen en LC Green Plus komt vrij. Zoals te zien in figuur 17 wordt uit dit proces een smeltcurve opgesteld met de snelle daling aan fluorescentie. Door de negatieve afgeleide hiervan te nemen wordt er een smeltpiek verkregen. Het toestel gebruikt de analyse van de curves om specifieke PCR-producten te identificeren, vermits zowel de sequentie als de T_m -waarde van een amplicon (van een specifiek target) gekend is. Niet specifieke PCR-producten met een andere smeltemperatuur zijn hierdoor uitgesloten. De laatste stap is dat de software de data verwerkt en voor elk organisme aangeeft of het positief of negatief is [49].

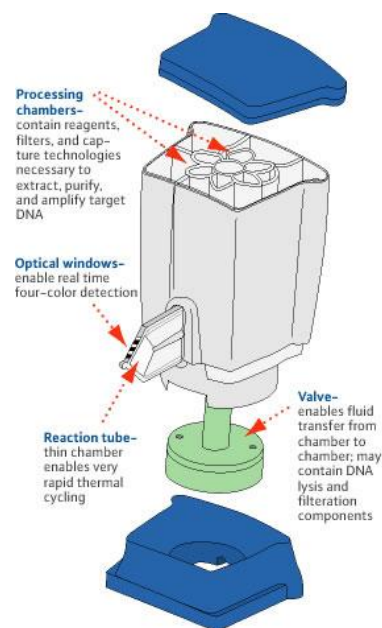


Figuur 17: Voorbeelden smeltcurves en smeltpieken

2.5.4 GeneXpert

Ook de GeneXpert is een soort van real-time PCR-toestel. Dit geautomatiseerd toestel doet zowel de staalvoorbereiding, amplificatie en de detectie van het target DNA. Het toestel aanwezig in het ZOL heeft momenteel vier modules, maar kan aangevuld worden tot 16 modules. In zo een module wordt een cartridge geplaatst met de bijhorende buffers. In figuur 18 is te zien waaruit een cartridge bestaat. Als eerste zijn er de processingkamers die de reagentia, beads, stalen en afval bevatten. Vervolgens is er een soort kleplichaam dat verschillende vloeistoffen van de ene kamer naar de andere laat vloeien. In dit lichaam zal de staalylisis en opzuivering gebeuren. Tenslotte is er nog een venstertje wat als reactietube dient. Hierin gebeurt de amplificatie en detectie van de sequentie. Hiervoor wordt het in een I-CORE module geschoven van het toestel [51].

Allereerst zal het staal opgelost worden in een buffer en worden geladen in de enige open processingkamer van de cartridge. Het staal wordt dan gewassen om eventuele inhibitoren te verwijderen. Hierna volgt een niet-chemische lyseerstep met een eventuele opzuiveringsstep. Tenslotte wordt de verkregen mix van reagentia geïnjecteerd in de reactietube, waar de PCR wordt uitgevoerd. Deze gebeurt in een I-CORE met detectie van fluorescentie voor meerdere kanalen. Hierdoor worden vier verschillende DNA-targets gemeten in dezelfde tube. In totaal zal de amplificatie en detectie van al deze targets in 25 minuten voltooid zijn [51].



Figuur 18: Samenstelling cartridge GeneXpert

2.5.5 MALDI-TOF

Het toestel gebruikt in het ZOL voor uitvoeren van massaspectrometrie is de MALDI-TOF MS. Dit staat voor Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization (MALDI) Time Off Flight (TOF) Massaspectrometer (MS). Het te onderzoeken monster (de intacte micro-organismen of een extract) zal worden gemengd met een verzadigde HCCA matrix (alfa-cyano-4-hydroxycinnamic acid). Hierdoor zal de celwand lyseren en zullen verschillende proteïnen vrijkomen. Deze zullen samen met de matrix kristalliseren. Hierna worden de alzo ontstane kristallen bestraald met een laser. Desorptie, de snelle, explosieve verdamping om de proteïnen in de gasfase te krijgen, zal plaatsvinden. Tegelijk zal de ionisatie van de proteïnen plaatsvinden. Hiervoor wordt een zure matrix gebruikt die op het moment van de bestraling positieve ladingen afgeeft [52]. Doordat de gebruikte matrix een sterke absorptie heeft voor de gebruikte lasergolflengte vermijdt dit een ongewenste fragmentatie van de proteïne. Als de proteïne geïoniseerd is, komt deze in de massa-analysator terecht. Bij de MALDI-TOF krijgen alle ionen dezelfde kinetische energie. Hierdoor zullen ze niet afgebogen worden en raken ze allemaal tot aan de detector. Deze eiwitten hebben verschillende massa/lading verhoudingen waardoor ze niet allemaal op hetzelfde moment de detector bereiken. Kleinere proteïnen met de grootste lading worden het meest aangetrokken, waardoor deze het eerst worden gemeten. De tijd wordt gemeten dat een ion nodig heeft om tot aan de detector te geraken. Op deze manier wordt er een compleet spectrum verkregen van een bepaald micro-organisme. Dit wordt vergeleken met referentiespectra in de databanken en zo kan men met een grote waarschijnlijkheid de identiteit van dit micro-organisme achterhalen [53].

2.5.6 Genetic analyzer

De ABI3500 Genetic Analyzer is een toestel dat voor meerdere post-PCR analyses zoals sequencing, fragment analyse en HID (Human identification) wordt gebruikt. In het ziekenhuis wordt het toestel enkel aangewend voor sequencing. Het dient ter ondersteuning van andere identificaties bv. MALDI, microbiologie [54].

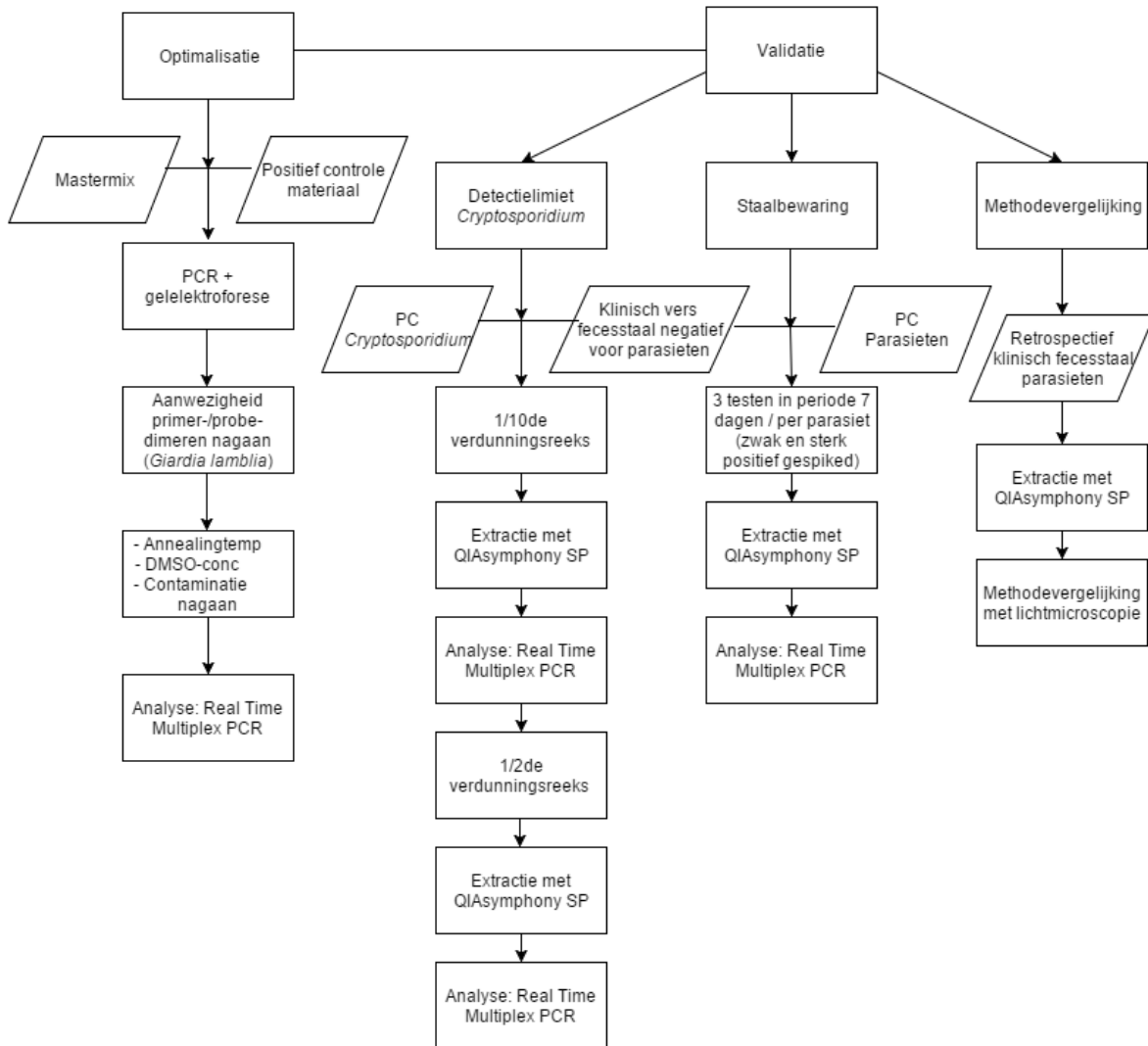
Als voorbereidende stap wordt elke base van het DNA met een andere fluorescente kleurstof gelabeld. Vervolgens worden de stalen op een elektrokinetische wijze in de capillairen geïnjecteerd. In de volgende stap ontstaat er door de toenemende lading een elektrisch veld. Dit veld strekt zich uit van het ene uiteinde van de anodebuffer tot aan de negatieve lading van het andere uiteinde. Het DNA, dat negatief geladen is, migreert door de polymeer in de capillair. Deze migratie valt te vergelijken met de gelelektroforese, want kortere fragmenten zullen sneller migreren en worden daardoor het eerst gedetecteerd. Aan de detector worden de fluorescente labels bestraald met een laser. De labels zullen een klein deel hiervan absorberen en vervolgens weer in alle richtingen uitzenden. Het uitgezonden licht, dat nu een langere golflengte heeft, zal opgevangen worden door een optisch gedeelte van de genetic analyzer. De lichtspreading doorheen een transmissierooster wordt uiteindelijk waargenomen op het array. Doordat elke capillair 20 zones op het array heeft ontstaat er data van 20 kleuren die vervolgens verwerkt en geïnterpreteerd worden [54].

3. Materialen en methoden

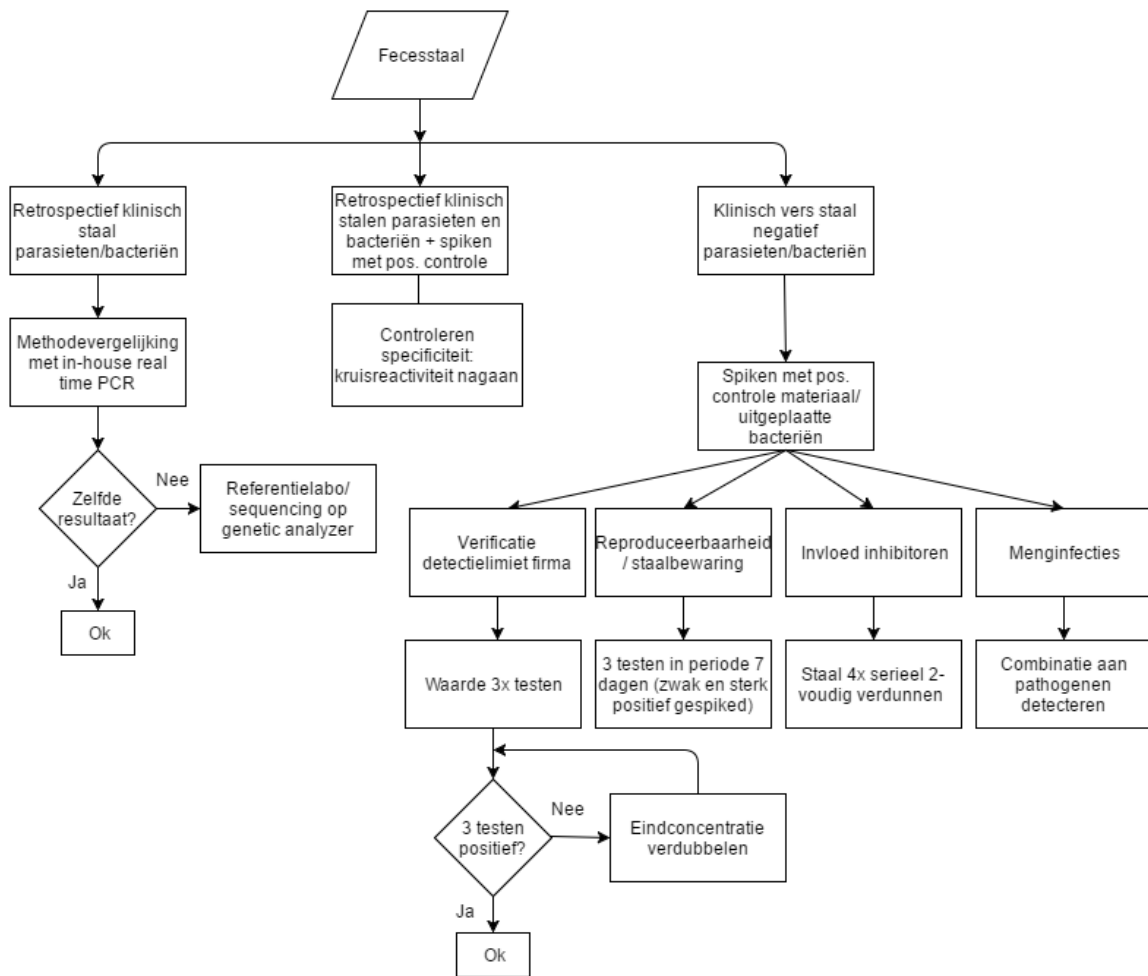
In dit onderdeel worden alle gebruikte materialen en protocollen weergegeven.

3.1 Proefopzet

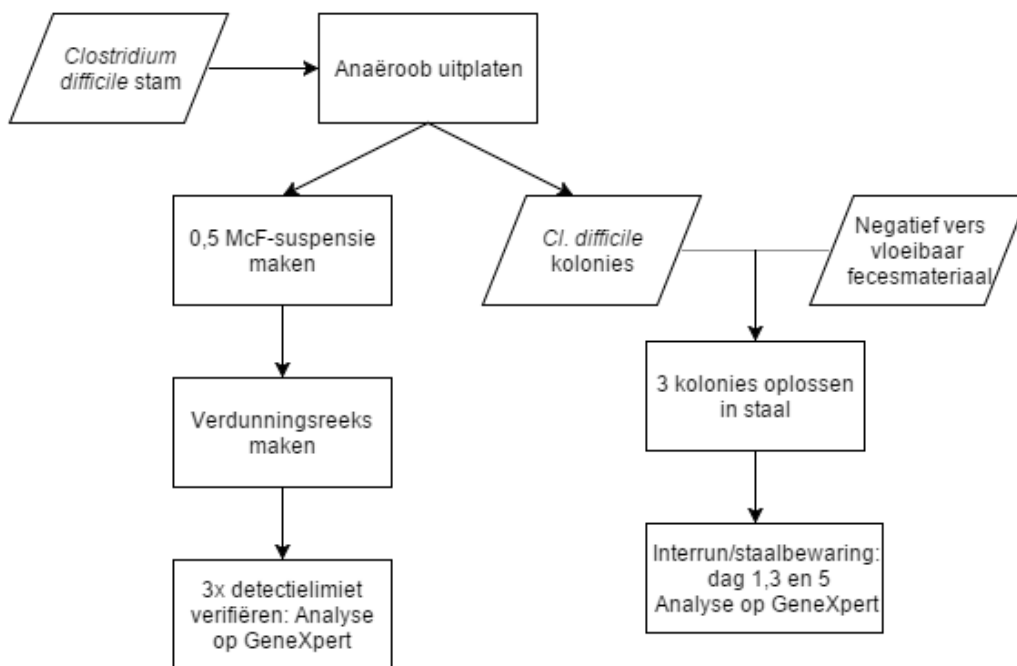
Hieronder is de proefopzet van de verschillende onderdelen van de studie gegeven.



Figuur 19: Proefopzet van de optimalisatie en validatie van de in-house real-time PCR



Figuur 20: Proefopzet validatie van commerciële nested PCR



Figuur 21: Proefopzet validatie commerciële real-time PCR

3.2 Materialen en methoden DNA-extractie

In dit onderdeel zullen alle gebruikte stoffen, apparatuur, etc. en alle protocollen voor de extractie van DNA uit fecesstalen met behulp van de Qiasymphony SP worden opgesomd. In tabel 5 worden alle stalen opgesomd die geëxtraheerd werden op de QIASymphony.

3.2.1 Materialen DNA-extractie

Tabel 2: Overzicht gebruikte apparatuur

Hardware	Merk en Type	Doel
Micropipetten	Finnpipette	Kleine volumes nauwkeurig pipetteren
Laminaire Air Flow (LAF) kast	Telstar BioVanguard, green line	Asceptische werkomgeving creëren
Vortex	VWR, international	Mengen van stoffen
Centrifuge	VWR, Eppendorf	Afdraaien van stoffen, vorming vermijden
Koelkast	Kirsch	Opslag van stalen/reagentia voor kortere tijd
Diepvriezer	Sanyo -20°C	Opslag van stalen/reagentia voor langere tijd
Stalenrekjes	/	Stalen ordenen en vasthouden
QIASymphony SP	Qiagen	Uitvoeren geautomatiseerde DNA-extractie

Tabel 3: Overzicht gebruikt glaswerk en disposables

Hardware	Merk en Type	Doel
Pipettips	Finntip, Filter	Kleine volumes nauwkeurig opzuigen
Kleenex	Igefa	Ontsmetten van werkruimtes/apparatuur
eSwab met Copan collection tube	Copan	Staalvoorbereiding
Afvalzak	Scienceware, Autoclavable bag	Afvalverzameling
Zwarte 2ml tubes	Sarstedt, skirted	Verzameltube voor staal en IC
Rode 2 ml tubes	Sarstedt, screw	Opvangen eluaat
Sample Prep Cartridges	Qiagen	Elueren van het staal
8-Rod Covers	Qiagen	Beschermen van magnetische staven
Handschoenen	Kimtech, Purple nitril-XTRA	Bescherming en contaminatie met eigen DNA vermijden
Filter-Tips 200 µl/1500 µl	Qiagen	Extractie in de QIASymphony

Tabel 4: Overzicht gebruikte stoffen

Stofnaam of naam oplossing (merk)	Batch nr.	Vast of vloeibaar	MW stof of samenstelling oplossing (stoffen en conc.)	H-zinnen	P-zinnen	Doel	Afvalverwijdering
ATL-buffer (Qiagen)	15104 4280	VI.				Lysis-buffer	Gele container
AVE-buffer (Qiagen)	15104 7805	VI.				Elutie-buffer	Gele container
Carrier RNA (Qiagen)	15103 0005	VI.					Gele container
Interne controle PhHv1-plasmide		VI.	10 ¹¹ kopieën/ml			Interne controle	Gele container
Molecular grade water (S Prime)	14803 1780	VI.		/	/	Verdunningen en volumes aanlengen	Gele container
QIA-symphony DSP Virus/Pathogen Midi Kit (Qiagen)	15401 6836	VI.				Extractiekit	Gele container
PBS	10030 55400	VI.				Aanlengen van stalen, negatieve controle	Gele container
Ethanol (Certa)	16B22-C01-16981	VI.	70%	H225, H319	P210, P241, P280, P303+P361+P353, P305+P351+P338, P501	Ontsmetten van werkoppervlakken en apparatuur	Gele container

Tabel 5: Overzicht stalen met oorsprong en identificatie

Staalcode	Parasiet	Oorsprong	Risico's en veiligheidsvoorschriften	Afvalverwijdering
31102020	<i>G. lamblia</i> pos.	Feces		Gele container
40428081	<i>G. lamblia</i> pos.	Feces		Gele container
60315103	<i>G. lamblia</i> pos.	Feces		Gele container
20203045	<i>G. lamblia</i> pos.	Feces		Gele container
51225046	<i>G. lamblia</i> pos.	Feces		Gele container
30830105	<i>G. lamblia</i> pos.	Feces		Gele container
60321149	<i>G. lamblia</i> pos. ¹	Feces		Gele container
Giardia Jessa	<i>G. lamblia</i> pos.	Feces		Gele container
SLG 2: <i>Giardia</i>	<i>G. lamblia</i> pos.	Feces		Gele container
51009138	<i>G. lamblia</i> pos.	Feces		Gele container
51017043	<i>Crypto</i> pos.	Feces		Gele container
50820102	<i>Crypto</i> pos.	Feces		Gele container
30725100	<i>Crypto</i> pos.	Feces		Gele container
SLG (Sint-Lucas Gent) 1: <i>Crypto</i>	<i>Crypto</i> pos.	Feces		Gele container
50914020	<i>Crypto</i> pos.	Feces		Gele container
50901067	<i>Crypto</i> pos.	Feces		Gele container
50918071	<i>Crypto</i> pos.	Feces		Gele container
50918126	<i>Crypto</i> pos.	Feces		Gele container
Van Lint: 44950717	<i>E. histolytica</i> pos.	Feces		Gele container
SLG 4: <i>E. histolytica</i>	<i>E. histolytica</i> pos. ²	Feces		Gele container
SLG 6: <i>E. histolytica</i>	<i>E. histolytica</i> pos.	Feces		Gele container
16010334	<i>E. histolytica</i> pos.	Feces		Gele container
16010791	<i>E. histolytica</i> pos.	Feces		Gele container
15032523	<i>E. histolytica</i> pos.	Feces		Gele container
50728038	<i>Ent. coli</i> pos.	Feces		Gele container
40331098	<i>Ent. coli</i> pos.	Feces		Gele container
40219071	<i>Ent. coli</i> pos.	Feces		Gele container
40219070	<i>Ent. coli</i> pos.	Feces		Gele container
60303113	<i>Ent. coli</i> pos ³	Feces		Gele container
51030067	<i>E. dispar</i> pos.	Feces		Gele container
SLG 3: <i>E. dispar</i>	<i>E. dispar</i> pos.	Feces		Gele container
SLG 5: <i>E. dispar</i>	<i>E. dispar</i> pos.	Feces		Gele container

¹ Discordant staal

² Staal was negatief volgens alle testen aanwezig op het ZOL

³ Aanwezigheid *Ent. coli* kan momenteel niet worden bevestigd door de aanwezigheid in-house real-time PCR

3.2.2 Methoden DNA-extractie

Protocol staalvoorbereiding

- Neem een eSwab met Copan collection tube
- Ontsmet het werkoppervlak van de LAF-kast
- Plaats de swab en het fecesstaal onder de LAF-kast
- Roer de eSwab grondig door het staal
- Veeg het overtollige materiaal af tegen de kant van de tube
- Plaats de swab in de Copan collection tube met vloeibaar Amies Transportmedium, breek het stokje af en identificeer de tube
- Vortex kort
- Bevries het staal gedurende 30 minuten bij -80°C

Vorbereiding opstarten QiaSymphony SP

- Start de QiaSymphony SP op
- Controleer de “waste lade”
 - Druk op waste
 - Open de lade
 - Vul benodigdheden bij
- Zet de elutieblokken klaar
 - Klik op elutie
 - Open de lade
 - Kies voor 2 ml tubes, zonder skirt
 - Zet de elutieblok met rode proefbuisjes klaar
- Laad reagentia en consumables
 - Klik op R&C
 - Open de lade
 - Vul benodigdheden bij
 - Vortex de magnetische beads en doe overal lipjes af
 - Plaats de enzym-bevattende buizen op de reagens cartridge (RC)
 - Scan de code van de buffer (ATL)
 - Plaats de buffer in het toestel
 - Voer een inventory scan uit van alles

Verdere staalvoorbereiding

- Ontdooi het staal

Vorbereiden van de interne controle (IC)

In onderstaande tabel wordt de samenstelling van de interne controle weergegeven.

Tabel 6: Samenstelling interne controle per staal

Elutie volume	Stockopl. CARRIER RNA	Interne controle van 10 ⁵ cellen/ml (pHV1-plasmide)	Buffer AVE	Totaal volume IC-mix
60 µl	3 µl	10 µl	107 µl	120 µl

- De werkoplossing van 10^5 cellen/ml kan gemaakt worden uit een stockoplossing van 10^7 . Deze wordt verdund tot een tussenoplossing van 10^6
 - 900 μ l fish sperm 1/100 TE-buffer + 100 μ l IC- 10^7
 - Maak hieruit de werkoplossing
 - 900 μ l fish sperm 1/100 TE-buffer + 10 μ l IC- 10^6
- Maak een IC-mix (120 μ l/staal) voor elk staal + vier extra
 - Bv: Eén staal \rightarrow vijf stalen = 600 μ l IC-mix
 - Maak dit in de zwarte draaidoptube

Laatste stap staalvoorbereiding

- Nadat het staal ontdooid is opnieuw vortexen
- Druk het medium uit de wattenstaaf door dit tegen de zijkant van de buis te duwen
- Gooi het staafje weg
- Breng de vloeistof (+- 900 μ l) over in een nieuwe skirted Sarstedt tube (zwarte draaidoptube)
- Leng dit aan tot 1 ml met molecular grade water

Verdere opstarting QiaSymphony SP

- Laad de stalen
 - Geef het staal ID in
 - Kies voor parasieten – HBV complex
- Zet de testprotocols op
- Laad interne controle/carrier RNA
- Toewijzen interne controle/carrier RNA
 - Ook HBV-complex
- Opstarten

3.3 Materialen en methoden in-house real-time PCR

Eerst zullen alle benodigde materialen voor het uitvoeren van de in-house real-time PCR worden opgesomd. Vervolgens wordt een standaardprotocol weergegeven dat gebruikt werd voor de optimalisatie en de validatie van deze methode. In tabel 10 zullen ook alle gebruikte primers en probes worden weergegeven.

3.3.1 Materialen in-house real-time PCR

Tabel 7: Overzicht gebruikte apparatuur

Hardware	Merk en Type	Doel
Micropipetten	Thermo Scientific	Kleine volumes nauwkeurig pipetteren
Rotor-Gene 6000	Qiagen	Uitvoeren real-time PCR
Stalenrekjes	/	Houden van stalen en reagentia
Pincet	/	Stalen laden op Rotor-Gene
Vortex	VWR, International	Mixen van stoffen
Centrifuge	VWR, Eppendorf	Afdraaien van stoffen, aërosolvorming vermijden
LAF-kast	Heraeus, Herasafe	Asceptisch werkomgeving creëren
PCR-kabinet	VWR, PCR-workstation	Aseptische werkomgeving creëren voor DNA-vrije stoffen

Tabel 8: Overzicht gebruikt glaswerk en disposables

Hardware	Merk en Type	Doel
Pipettips	Finntip, filter	Kleine volumes nauwkeurig pipetteren
PCR-microtubes	Thermo scientific; 0,2 ml Flat cap tubes	PCR-reactiemix houden
1,5 ml microtubes	Eppendorf	Vloeistof container
eSwab met Copan collection tube	Copan	Staalvoorbereiding
50 ml tube	Fisher Scientific	Staalbewaring

Tabel 9: Overzicht gebruikte stoffen

Stofnaam of naam oplossing (merk)	Batch nr.	Vast of vloeibaar	MW stof of samenstelling oplossing (stoffen en conc.)	H-zinnen	P-zinnen	Doel	Afvalverwijdering
Quanti-Tect multiplex PCR NoROX mastermix (Qiagen)	151053041	VI.				Buffer om amplificatie mogelijk te maken	Gele container
DNA-extract		VI.		/	/		Gele container
Ethanol (Certa)	16B22-C01-16981	VI.	70%	H225, H319	P210, P241, P280, P303+P361+P353, P305+P351+P338, P501	Ontsmetten van werkoppervlakken en apparatuur	Gele container
<i>Entamoeba histolytica</i> Synthetic DNA (Microbiologics)	HE0006S-100	VI.	2,0.10 ⁸ kopieën/ml			Controle-materiaal voor <i>E. histolytica</i>	Gele container
<i>Cryptosporidium parvum</i> oocysts Inactivate (Creative Science Company)	CO2/15/05	VI.	1.10 ⁷ oocysten/ml			Controle-materiaal voor <i>Cryptosporidium</i>	Gele container
AmpliRun <i>Giardia Intestinalis</i>	1411B C119001	VI.	1,05.10 ⁷ kopieën/ml			Controle-materiaal	Gele container

DNA-control (Viracell)						voor <i>G. lamblia</i>	
------------------------	--	--	--	--	--	------------------------	--

Tabel 10: Overzicht primer en probes

Naam	Sequentie (5' → 3')	Mod 3'	Mod 5'	Batch	Scale	Basen	Volume voor 100 μM
<i>Giardia lamblia</i> probe	CCC-GCG-GCG-GTC-CCT-GCT-AG	BHQ-2®	ROX™	6003879	40 nmol	20	85 μl
PhHv probe Cy5	TTT-TTA-TGT-GTC-CGC-CAC-CAT-CTG-GAT-C	BHQ-3®	Cy 5®	6003880	40 nmol	28	90 μl
<i>Giardia lamblia</i> Rev.	TTG-CCA-GCG-GTG-TCC-G	/	/	6003881	40 nmol	16	2,62 ml
<i>Giardia lamblia</i> Fwd.	GAC-GGC-TCA-GGA-CAA-CGG-TT	/	/	6013263	40 nmol	20	964 μl
<i>Cryptosporidium</i> Fwd.	CAA-ATT-GAT-ACC-GTT-TGT-CCT-TCT-G	/	/	6003882	40 nmol	25	3,00 ml
<i>Cryptosporidium</i> Rev.	GGC-ATG-TCG-ATT-CTA-ATT-CAG-CT	/	/	6003883	40 nmol	23	2,85 ml
<i>E. histolytica</i> Rev.	GCG-GAC-GGC-TCA-TTA-TAA-CA	/	/	6003884	40 nmol	20	2,96 ml
<i>E. histolytica</i> Fwd.	ATT-GTC-GTG-GCA-TCC-TAA-CTC-A	/	/	6003885	40 nmol	22	2,87 ml
PhHv Rev. Cy5	GCG-GTT-CCA-AAC-GTA-CCA-A	/	/	6003886	40 nmol	19	1,72 ml
PhHv Fwd. Cy5	GGG-CGA-ATC-ACA-GAT-TGA-ATC	/	/	6003887	40 nmol	21	3,03 ml

<i>Cryptosporidium</i> probe	TGC-CAT-ACA-TTG-TTG-TCC	FAM	MGB	6084777-10-1.1	/	18	/ ⁴
<i>E. histolytica</i> probe	TCA-TTG-AAT-GAA-TTG-GCC-ATT-T	JOE	MGB	6084777-20-2.1	/	22	/ ⁴

Zie tabel 5 voor het overzicht van de gebruikte stalen.

3.3.2 Methoden in-house real-time PCR

Hieronder wordt een beschrijving gegeven van hoe de optimalisatie en validatie van de real-time PCR werd uitgevoerd, evenals de standaardmethode die gevolgd wordt bij een real-time PCR nadat deze geoptimaliseerd was.

3.3.2.1 Algemene methode in-house real-time PCR

Maken mastermix

- Kijk op voorhand na of alle benodigde reagentia in voldoende mate aanwezig zijn, indien niet:
 - Verdun uit een werkoplossing met hogere concentratie
 - Haal de tube met stockconcentratie van het reagentia uit -80°C diepvriezer
- Haal alle reagentia uit de diepvries en koelkast
 - QuantiTect multiplex PCR NoROX master mix, probes, primers en RNase-vrij water
- Ontsmet het werkkoppervlak van de PCR-kabinet en de te gebruiken micropipetten
- Laat ze ontdooien op kamertemperatuur
- Vortex en shortspin de primers, probes en de mastermix
- Zet de componenten onder de PCR-kabinet
- Maak de mastermixen op een isofreeze volgens tabel 11 (dit is de geoptimaliseerde mastermix)
 - Begin met buffer en molecular grade water te pipetteren
 - Voeg alle primers en probes toe
- Verdeel de mastermix uit over 100 PCR-microtubes met elk 20 µl, bewaar deze in de -20°C diepvriezer.

⁴ De twee laatste probes (*Cryptosporidium* en *E. histolytica*) werden besteld bij Life Technologies. Deze waren zodanig opgelost dat de eindconcentratie 100 µM bedroeg. De andere oligonucleotiden werden besteld bij Eurogentec.

Tabel 11: Geoptimaliseerde mastermix

Reagentia	Methode bereiding geoptimaliseerde mastermix		
	Volume per staal	Volume voor 100 stalen	Eindconcentratie
QuantiTect multiplex PCR NoROX master mix	12,5 µl	1250 µl	/
PhHv Fwd. (10 µM)	0,125 µl	12,5 µl	0,05 µM
PhHv Rev. (10 µM)	0,125 µl	12,5 µl	0,05 µM
PhHv probe (2 µM)	0,625 µl	62,5 µl	0,05 µM
<i>Giardia lamblia</i> Fwd. (10 µM)	0,0625 µl	6,25 µl	0,025 µM
<i>Giardia lamblia</i> Rev. (10 µM)	0,0625 µl	6,25 µl	0,025 µM
<i>Giardia lamblia</i> Probe (2 µM)	0,625 µl	62,5 µl	0,05 µM
<i>Cryptosporidium</i> Fwd. (10 µM)	0,125 µl	12,5 µl	0,05 µM
<i>Cryptosporidium</i> Rev. (10 µM)	0,125 µl	12,5 µl	0,05 µM
<i>Cryptosporidium</i> probe (2 µM)	1,25 µl	125 µl	0,1 µM
<i>E. histolytica</i> Fwd. (10µM)	0,75 µl	75 µl	0,3 µM
<i>E. histolytica</i> Rev. (10 µM)	1,25 µl	125 µl	0,5 µM
<i>E. histolytica</i> probe (2 µM)	0,625 µl	62,5 µl	0,05 µM
Molecular grade water	1,75 µl	175 µl	/
Tussen totaal	20 µl	2000 µl	
DNA	5 µl		
Totaal	25 µl		

Toevoegen van DNA

- Ontsmet het werkoppervlak van de LAF-kast en de te gebruiken micropipetten
- Neem vier PCR-microtubes met de mastermix + voor het aantal stalen dat er zijn
 - Vier= De drie positieve controles voor parasieten + één negatieve controle
 - Bv.: Indien zes stalen, dan 10 PCR-microtubes met mastermix
- Neem een tube met positief controlemateriaal van *Cryptosporidium*, van *Entamoeba histolytica* en van *Giardia lamblia* uit de diepvriezer
- Laat alles ontdooien op kamertemperatuur
- Merk ondertussen alle microtubes op het dekseltje
- Maak op een kladblad een legende van de microtubes
- Voeg 5 µl van het geëxtraheerde DNA, 5 µl van de positieve controle of 5 µl van de negatieve controle toe per PCR-tube

- Vortex de tubes en breng ze naar het post-amplificatielokaal
- Laad de tubes op de Rotor-Gene
- Stel het juiste PCR-programma in (zie tabel 12)

Tabel 12: Geoptimaliseerd temperatuursprofiel

Stap	Tijd	Temperatuur	Aantal cycli
PCR initial activation step	15 min	95°C	1x
Denaturatie	15 sec	95°C	45x
Annealing/elongatie	1 min	60°C	

3.3.2.2 Werkwijze optimalisatie in-house real-time PCR

Om te beginnen werd door middel van agarosegelelektroforese de aanwezigheid van primerdimeren nagegaan. Vervolgens werden de oligonucleotidenconcentraties van mastermix geoptimaliseerd door drie verschillende mastermixen tegelijk te testen. Tot slot werd ook de specifieke amplificatie onderzocht bij verschillende annealingtemperaturen, variërend van 60°C tot 64°C, en na het toevoegen van additieven (DMSO, variërend van 3-7%).

Hieronder zijn in tabel 13 de nucleotide eindconcentraties van de verschillende mastermixen gegeven.

Tabel 13: Eindconcentraties van verschillende soorten mastermixen

Reagentia	Verschillende soorten mastermixen: eindconcentraties oligonucleotiden		
	Originele mastermix	Gehalveerde eindeconcentratie t.o.v. originele	Methode van de kit (vier primer/probe mixen)
PhHv F (10µM)	0,05 µM	0,025 µM	0,2 µM
PhHv R (10µM)	0,05 µM	0,025 µM	
PhHv probe (2µM)	0,05 µM	0,025 µM	
<i>Giardia lamblia</i> F (10µM)	0,05 µM	0,025 µM	0,2 µM
<i>Giardia lamblia</i> R (10µM)	0,05 µM	0,025 µM	
<i>Giardia lamblia</i> probe (2 µM)	0,1 µM	0,05 µM	
<i>Cryptosporidium</i> F (10µM)	0,05 µM	0,025 µM	0,2 µM
<i>Cryptosporidium</i> R (10µM)	0,05 µM	0,025 µM	
<i>Cryptosporidium</i> probe (2µM)	0,1 µM	0,05 µM	
<i>E. histolytica</i> F (10µM)	0,3 µM	0,15 µM	0,2 µM
<i>E. histolytica</i> R (10µM)	0,5 µM	0,25 µM	
<i>E. histolytica</i> probe (2µM)	0,05 µM	0,025 µM	

3.3.2.3 Werkwijze bepaling detectielimiet op matrix van *Cryptosporidium*

Eerst wordt er een 1/10^{de} verdunningsreeks getest. Hiermee kan de detectielimiet reeds worden geschat. Om deze schatting meer te kunnen verfijnen zal van het laagste positieve staal een 1/2^{de} verdunningsreeks worden getest. Vermits de detectielimiet in minstens 95% van de gevallen gedetecteerd moet worden, zullen er 10 stalen per verdunning worden getest. De grootste verdunning (met de kleinste hoeveelheid aan DNA) waarvan al de 10 stalen gedetecteerd kunnen worden is dan de detectielimiet.

Voor de extractie is er steeds 1 ml aan staal nodig, maar omdat er een verdunningsreeks wordt gemaakt, zal er telkens 2 ml worden gemaakt.

- Er is 10⁷ cellen/ml positieve controle van *Cryptosporidium* aanwezig
- Er moet voor negatief vloeibaar feces (matrix) gezorgd worden, ongeveer 15 ml (10 ml voor de 1/10 verdunning en 5 ml voor de ½ verdunning)
 - Giet de inhoud van 15 Copan collection tubes (Amies transport medium) over in een 50 ml tube
 - Neem een eSwab en roer deze in het negatief fecesstaal
 - Veeg overtollig materiaal af tegen de kant van de tube
 - Plaats de swab in de 50 ml tube en vortex
 - Haal de swab uit de 50 ml tube en neem een tweede eSwab
 - Roer ook deze door het fecesstaal, veeg overtollig materiaal af en plaats ze in de 50 ml tube en vortex
 - Dit herhalen voor 15 eSwabs
 - In de 50 ml tube zit dan ongeveer 15 ml
- Verdun de 10⁷/ml positieve controle 100x → 10⁵/ml
 - Doe 1980 µl vloeibaar feces in een tube (feces in AT-medium)
 - Voeg hierbij 20 µl van 10⁷/ml positieve controle
 - Goed vortexen
- Maak van de 10⁵/ml positieve controle een 1/10 verdunningsreeks
 - Neem vier tubes en merk deze
 - 10⁴/ml
 - 10³/ml
 - 10²/ml
 - 10¹/ml
 - Voeg in elke tube 1800 µl vloeibaar feces
 - Voeg 200 µl van de 10⁵/ml aan de eerste tube (10⁵4/ml)
 - Vortex deze
 - Voeg 200 µl van de 10⁴/ml toe aan de tube 10⁵3/ml met 1800 µl vloeibaar feces
 - Vortex deze
 - Herhaal dit tot voor de 10¹/ml tube
- Zet de vijf tubes voor 30 min in de -80°C diepvries

Volg punt 3.2.2 'Methoden DNA-extractie' vanaf het deelpunt 'Vorbereiding opstarten QIASymphony SP'.

Het staal met de laagste concentratie waarbij er nog amplificatie is wordt gebruikt voor een ½ verdunningsreeks.

Bv. als dit 10³/ml is:

- Maak vanuit de 10³/ml positieve controle een ½ verdunningsreeks
 - Neem vijf microtubes en merk deze
 - 1/2
 - 1/4
 - 1/8
 - 1/16
 - Voeg in elke tube 1000 µl vloeibaar feces
 - Voeg 1000 µl van de 10³/ml aan de eerste tube (1/2)
 - Vortex deze
 - Voeg 1000 µl van de 1/2 toe aan de tube 1/4 met 1000 µl vloeibaar feces
 - Vortex deze
 - Herhaal dit tot voor de 1/32 tube

Volg punt 3.2.2 'Methoden DNA-extractie' vanaf het deelpunt 'Voorbereiding opstarten QIASymphony SP'.

3.3.2.4 Werkwijze staalbewaring

Voor deze bepaling moet volgens het kwaliteitssysteem van het ziekenhuis op drie verschillende tijdstippen een positief staal worden geëxtraheerd en geanalyseerd. Dit gebeurt op dag één, drie en zeven. Zowel stalen bewaard bij 2-8°C als bij -20°C worden hiervoor onderzocht. De standaarddeviatie van de verschillende Ct-waarden moet kleiner zijn dan één.

Als er positieve stalen aanwezig zijn voor of *Cryptosporidium* of *Giardia lamblia* of *Entamoeba histolytica*, dan kan de staalbewaring gevalideerd worden. Anders kan ook negatief staal gespiked worden. In tabel 14 wordt opgesomd hoe een staal met elke parasiet zwak en sterk positief gespiked kan worden.

- Het binnengekomen positieve fecesstaal verdelen over vier potjes (indien genoeg uitverdelen over zes potjes). Dit is dag nul!
- Merk het eerste potje met 'frigo' (indien genoeg staal: drie potjes merken met 'frigo')
- Merk de andere drie potjes met de gegevens van het staal + 'diepvries' + dag één/drie/zeven
- Voer op dag nul een extractie (zie 3.2.2) + real-time PCR (zie 3.3.2.1) uit. Dit is de referentie.
- Herhaal de extractie op dag één, drie, zeven
 - Indien het staal negatief is en gespiked moet worden:
 - Neem drie eSwabs en giet de inhoud hiervan samen in een Copan collection tube
 - Roer de eSwab door het staal van de frigo en veeg overtollig materiaal af
 - Vortex
 - Herhaal dit voor de resterende twee swabs
 - Herhaal de vorige drie stappen voor het diepvriesstaal
 - Spike met controlemateriaal: Zowel sterk als zwak positief voor beide bewaarmethoden (vier microtubes per type controlemateriaal)

Tabel 14: Spiken van sterk en zwak positieve controles

Parasiet	Sterk/zwak	Aantal cellen/ml (eindconcentratie)	Hoe te maken
<i>Cryptosporidium parvum</i>	Sterk positief	10 ⁵	1188 µl + 12 µl 10 ⁷ cellen/ml
	Zwak positief	10 ³	1188 µl + 12 µl 10 ⁵ cellen/ml
<i>Entamoeba histolytica</i>	Sterk positief	10 ⁶	1080 µl + 120 µl 10 ⁷ cellen/ml
	Zwak positief	10 ⁴	1188 µl + 12 µl 10 ⁶ cellen/ml
<i>Giardia lamblia</i>	Sterk positief	10 ⁴	1080 µl + 120 µl 10 ⁵ cellen/ml
	Zwak positief	10 ³	1080 µl + 120 µl 10 ⁴ cellen/ml

- Bevries de stalen gedurende 30 minuten bij -80°C
- Voer de extractie (zie 3.2.2) + real-time PCR (zie 3.3.2.1) uit

3.4 Materialen en methoden commerciële nested PCR

In dit onderdeel zullen de verschillende gebruikte materialen en methoden worden opgesomd die nodig waren voor de validatie van het GI panel op de FilmArray (BioFire). In tabel 18 worden ook de gebruikte bacteriestammen voor de kweek opgesomd.

3.4.1 Materialen commerciële nested PCR

Tabel 15: Overzicht gebruikte apparatuur

Hardware	Merk en Type	Doel
Micropipetten	Thermo Scientific	Kleine volumes nauwkeurig pipetteren
Stalenrekjes	/	Houden van tubes
Vortex	VWR, international	Mixen van stoffen
Centrifuge	VWR, Eppendorf	Afdraaien van stoffen, aërosolvorming vermijden
LAF-kast	Heraeus, Herasafe	Aseptische werkomgeving creëren
Nefelometer	/	McFarland suspensie bepalen
MALDI-TOF Biotyper	Burker, Microflex	Identificatie van bacteriën
Bunsenbrander	Usbeck	Aseptische werkomgeving creëren
CO ₂ -incubator	Binder	Opkweken aërobe bacteriën
Broedstoof	Memmert	Opkweken anaërobe bacteriën
FilmArray	Biofire	Nested multiplex PCR uitvoeren
Pouch	Biofire	Gesloten systeem dat reagentia bevat voor PCR

Tabel 16: Overzicht gebruikt glaswerk en disposables

Hardware	Merk en Type	Doel
Pipettips	Finntip, filter	Kleine volumes nauwkeurig pipetteren
2,0 ml tubes	Sarstedt, Skirt	Vloeistof container
Kleenex	Igefa	Ontsmetten werktabelt en materialen
FecalSwab met Copan collection tube	Copan	Staalvoorbereiding
Entnaalden	Sarstedt, blauw oog	Enten van bacteriën
Transferpipetten	FilmArray	Laden staal op pouch
Rode injectietube - GI	FilmArray	Mengen staal met staalbuffer
Blaauwe injectietube - GI	FilmArray	Hydrateren van pouch

Tabel 17: Overzicht gebruikte oplossingen

Stofnaam of naam oplossing (merk)	Batch nr.	Vast of vloeibaar	MW stof of samenstelling oplossing (stoffen en conc.)	H-zinnen	P-zinnen	Doel	Afvalverwijdering
Ethanol (Certa)	16B2 2-C01-16981	VI.	70%	H225, H319	P210, P241, P280, P303+P361+P353, P305+P351+P338, P501	Ontsmetten van werkoppervlakken en apparatuur	Gele container
Sample buffer-GI (FilmArray)	FAIV-GEN-0003	VI.				Staal oplossen	Gele container
<i>Entamoeba histolytica</i> Synthetic DNA (Microbiologics)	HE00 06S-100	VI.	2,0.10 ⁸ kopieën /ml			Controle-materiaal voor <i>E. histolytica</i>	Gele container
<i>Cryptosporidium parvum</i> oocysts inactivated (Creative Science Company)	CO2/15/05	VI.	1.10 ⁷ oocysten/ml			Controle-materiaal voor <i>Cryptosporidium</i>	Gele container

AmpliRun <i>Giardia</i> <i>Intestinalis</i> DNA- control (Viracell)	1411 BC11 9001	VI.	1,05.10 ⁷ kopieën/ ml			Controle- materiaal voor <i>G. lamblia</i>	Gele container
<i>Cyclospora</i> <i>cayetanensis</i> is Synthetic DNA (ATCC)	63559 090	VI.	3,0.10 ⁵ genoom kopieën/ ml			Controle- materiaal voor <i>C.</i> <i>cayetanensis</i>	Gele container

Tabel 18: Gebruikte bacteriestammen voor kweek

Kiem	Staalnummer	Bewaring	Rij/Kolom	Invoerdatum
<i>Yersinia</i> <i>enterocolitica</i>	60312078	-80°C/1078	7/5	29/03/2016
<i>Campylobacter</i> <i>jejuni</i>	10914096	-80°C/1059	4/6	16/05/2014
<i>Salmonella</i> spp.	60208003	-80°C/1078	6/9	29/03/2016
<i>Shigella</i> spp.	50902081	-80°C/1067	5/2	28/04/2015
<i>Clostridium</i> <i>difficile</i>	51128040	-80°C/5005	3/6	
<i>Vibrio</i> spp.	30822043	-80°C/1032	7/3	
EHEC	40929031	-80°C/1065	3/3	

Voor het overzicht van de gebruikte klinische stalen, zie de resultaten van de validatie (punt 4.2).

3.4.2 Methoden commerciële nested PCR

Hieronder zijn de gebruikte methoden ter validatie van de nested multiplex PCR opgesomd.

3.4.2.1 Algemene werkwijze van de nested PCR

Algemene staal voorbereiden

- Neem een FecalSwab en een fecesstaal
- Ontsmet het werkoppervlak van de LAF-kast en de te gebruiken materialen
- Neem een swab van het staal en veeg overtollige resten af
- Plaats de swab in de Copan collectietube en sluit deze
- Vortex
- Verwijder de swab
- Indien er bij de validatie gewerkt wordt met een fecesstaal negatief is voor parasieten volgens de routine
 - Spike het staal met positief controlemateriaal/gekweekte bacteriën
- Vortex goed

Pouch voorbereiden

- Duw de pouch in het pouch laadstation
- Neem de tube met de blauwe dop (hydratie injectie tube) en zet deze in het laadstation
- Draai hem los, zodat de blauwe dop in het laadstation overblijft

- Duw de naald in de pouch vlak onder de blauwe pijl totdat je het seal hoort breken
- Ga na of de pouch gehydrateerd is
- Hou de sample buffer omgekeerd (met de tip naar boven)
- Duw lichtjes zodat het seal aan de tip breekt
- Breng de sample buffer over in de rode doptube
- Mix het patiënt staal nog eens
- Pipetteer 200 µl over in de rode tube van de pouch (met transfer pipet tot tweede streep)
- Sluit de tube en draai hem driemaal om
- Plaats hem terug in het pouch laadstation en wacht vijf seconden
- Draai hem los, zodat de rode dop achterblijft
- Duw de naald in de pouch onder de rode pijl totdat het seal breekt
- Gooi de beide tubes weg
- Plaats de pouch in het toestel tot je een klik hoort
- Scan de barcode van de pouch
- Geef het staal ID in
- Sluit het toestel
- Klik op run

3.4.2.2 Werkwijze verificatie detectielimiet

Deze detectielimiet wordt geverifieerd door negatieve stalen te spiken met het aanwezige positieve controlemateriaal of de gekweekte kolonies. Hiervoor wordt eerst het vloeibare negatieve staal gemaakt door een swab die goed doordrenkt is met feces op te lossen in het Cary-Blair medium. Indien er gewerkt wordt met bacteriën wordt er een verdunning gemaakt uit een 0,5 McF-suspensie. Voor parasieten gebruikt men positief controlemateriaal. Deze verdunning van bacteriën/positief controlemateriaal wordt toegevoegd aan het medium zodat het eindvolume 2 ml is. De eindconcentratie van deze oplossing is gelijk aan de beschreven detectielimiet. Per pathogeen worden er drie stalen getest. Indien de detectielimiet niet driemaal gedetecteerd wordt, wordt de eindconcentratie in het staal verdubbeld. De zo bepaalde detectielimiet wordt tenslotte vergeleken met de detectielimiet van de in-house real-time PCR.

3.4.2.3 Werkwijze nagaan reproduceerbaarheid/staalbewaring

Er worden twee pools gemaakt van de vier bacteriën en de vier parasieten, waarvan één met een hoge en één met een lage eindconcentratie die steeds hoger is dan de detectielimiet. Voor de bacteriën wordt de pool gemaakt met kolonies van gekweekt controlemateriaal en voor de parasieten met positief materiaal afkomstig van controlemateriaal (Oöcyten *Cryptosporidium* van Creative, kopieën *Giardia lamblia* van Vircell en genoom kopieën *Cyclospora cayetanensis* van ATCC) en met positief materiaal afkomstig van een staal positief voor *Entamoeba histolytica*. Van een negatief vers fecesstaal wordt twee keer een swab genomen die elk worden opgelost in een tube Cary Blair medium. Aan beide tubes wordt één pool toegevoegd en deze wordt bewaard bij 2-8°C. Deze zullen dan op dag één, drie en vijf geanalyseerd worden. In tabel 19 en 20 worden de samenstellingen van de pools weergegeven.

Tabel 19: Samenstelling sterk positieve pool

	Aanwezige stockconcentratie	Gebruikte werkoplossing	Volume van werkoplossing voor 1 staal	Eindconcentratie sterk positief (volgens bijsluiter)
<i>Cryptosporidium</i>	1.10 ⁷ oöcyten/ml	1.10 ⁵ oöcyten/ml	300 µl	1,5.10 ⁴ oöcyten/ml
<i>G. lamblia</i>	1,05.10 ⁷ kopieën/ml	1,05.10 ⁴ kopieën/ml	28,6 µl	150 cellen/ml
<i>E. histolytica</i> (Van Lint 44950717)	2,5.10 ⁶ cellen/ml	2,5.10 ⁵ cellen/ml (=1/10 stock)	120 µl	1,5.10 ⁴ cellen/ml
<i>Campylobacter</i>	1,5.10 ⁸ CFU/ml	1,5.10 ⁶ CFU/ml	160 µl	1,2.10 ⁵ CFU/ml
<i>Salmonella</i>	1,5.10 ⁸ CFU/ml	1,5.10 ⁶ CFU/ml	40 µl	3.10 ⁴ CFU/ml
<i>Yersinia enterocolitica</i>	1,5.10 ⁸ CFU/ml	1,5.10 ⁶ CFU/ml	200 µl	1,5.10 ⁵ CFU/ml
<i>Shigella</i>	1,5.10 ⁸ CFU/ml	1,5.10 ⁴ CFU/ml	40 µl	300 CFU/ml

Tabel 20: Samenstelling zwak positieve pool

	Aanwezige stockconcentratie	Gebruikte werkoplossing	Volume van werkoplossing voor 1 staal	Eindconcentratie zwak positief
<i>Cryptosporidium</i>	1.10 ⁷ oöcyten/ml	1.10 ⁵ oöcyten/ml	140 µl	7.10 ³ oöcyten/ml
<i>G. lamblia</i>	1,05.10 ⁷ kopieën/ml	1,05.10 ⁴ kopieën/ml	13,3 µl	70 cellen/ml
<i>E. histolytica</i> (Van Lint 44950717)	2,5.10 ⁶ cellen/ml	2,5.10 ⁵ cellen/ml (=1/10 stock)	56 µl	7.10 ³ cellen/ml
<i>Campylobacter</i>	1,5.10 ⁸ CFU/ml	1,5.10 ⁶ CFU/ml	80 µl	6.10 ⁴ CFU/ml
<i>Salmonella</i>	1,5.10 ⁸ CFU/ml	1,5.10 ⁶ CFU/ml	20 µl	1,5.10 ⁴ CFU/ml
<i>Yersinia enterocolitica</i>	1,5.10 ⁸ CFU/ml	1,5.10 ⁶ CFU/ml	100 µl	7,5.10 ⁴ CFU/ml
<i>Shigella</i>	1,5.10 ⁸ CFU/ml	1,5.10 ⁴ CFU/ml	20 µl	150 CFU/ml

3.4.2.4 Werkwijze nagaan invloed van "inhibitoren"

Een staal met veel fecesmateriaal zal viermaal serieel tweevoudig verdund worden (tot en met een 1/16^{de} verdunding). Elk staal wordt aangelengd met moleculair grade water zodat het eindvolume 1565 µl bedraagt. Aan deze vijf stalen (ook het onverdunde staal) wordt vervolgens dezelfde hoeveelheid (435 µl) aan positief controlemateriaal in de vorm van de pathogenenpool toegevoegd.

3.4.2.5 Werkwijze methodevergelijking met de real-time in-house PCR

Alle aanwezige klinische stalen positief voor parasieten (zowel de retrospectieve als prospectieve) worden geanalyseerd. Bepaalde stalen, zoals deze positief voor *Entamoeba histolytica*, worden opgevraagd bij andere ziekenhuizen. Deze methodevergelijking is beperkt tot slechts drie parasieten, omdat *Cyclospora cayetanensis* niet gedetecteerd kan worden met de in-house multiplex PCR. Ook een vijftal stalen negatief voor parasieten volgens de qPCR zullen worden onderzocht. Voor de bacteriën worden er retrospectieve stalen getest voor *Salmonella*,

Campylobacter en *Yersinia enterocolitica*. Wegens de kleine hoeveelheid aan beschikbare stalen kunnen er slechts twee voor *Shigella* worden getest. De gebruikte stalen worden opgesomd in tabel 35, 37, 39 en 43. Indien er een discordant resultaat is tussen de in-house PCR en de commerciële nested PCR zullen er extra onderzoeken worden uitgevoerd op basis van onderstaande tabel. Indien het mogelijk is zijn antigeentesten en PCR-testen geprefereerd boven de microscopie (up-to-date). Indien het resultaat van de stalen na uitvoeren van een antigeensneltest, tweede microscopische analyse of herconcentratie nog steeds onduidelijk is, kan het staal opgestuurd worden naar het referentielaboratorium (Instituut voor Tropische Geneeskunde (ITG)) te Antwerpen of wordt er DNA-sequencing uitgevoerd. In dit referentielaboratorium zal er eveneens op basis van een in-house real-time PCR een detectie worden uitgevoerd. De targetgenen waarop hun primers zijn ontworpen is het SSU rRNA gen voor *Entamoeba histolytica* en *Giardia lamblia* en voor *Cryptosporidium* is dit het lib13 gen. De in-house PCR van het ZOL heeft enkel voor *Cryptosporidium* een ander targetgen namelijk het COWP gen [55] [56] [57].

Tabel 21: Werkwijze bij discordante stalen

Lichtmicroscopie	Real-Time PCR	Nested PCR	Antigeensneltest	2 ^{de} lichtmicroscopie	Herconcentratie	Resultaat
Positief	Positief	Positief				Positief
		Negatief	Positief	Positief		Positief
				Negatief	Positief	Positief
					Negatief	Ref. labo/ sequencing
			Negatief	Positief		Positief
				Negatief		Ref. labo/ sequencing
	Negatief	Negatief				Negatief
		Positief	Positief	Positief		Positief
			Positief	Negatief	Positief	Positief
					Negatief	Ref. labo/ sequencing
			Negatief	Positief		Positief
				Negatief		Ref. labo/ sequencing

3.4.2.6 Werkwijze controleren specificiteit

Volgens de bijsluiters werd voor *Giardia lamblia* op het GI panel een kleine hoeveelheid aan kruisreactiviteit met commensalen micro-organismen (meer bepaald *Bifidobacterium* en *Ruminococcus*) waargenomen in klinische stalen. Stalen waaraan het controlemateriaal werd toegevoegd met een eindconcentratie van $1,5 \cdot 10^9$ cellen/ml vertoonden deze kruisreactiviteit echter niet. Deze bacteriën worden uitgeplaat en gekweekt. Met behulp van een 4,0 McFarland suspensie wordt een suspensie gemaakt om deze concentratie te testen. Eventueel zullen bepaalde kolonies eerst geïdentificeerd moeten worden op de MALDI-TOF MS. Ook zou DNA van *Entamoeba dispar* kruisreactiviteit kunnen veroorzaken met de primers van *Entamoeba histolytica* indien de concentratie ongeveer 10^5 oöcyten/ml bedraagt. Hiervoor worden ook enkele stalen opgevraagd bij andere ziekenhuizen en vervolgens getest.

3.4.2.7 Werkwijze onderzoeken menginfecties

Omdat patiënten soms geïnfecteerd zijn met meerdere pathogenen is het noodzakelijk om deze allemaal te kunnen detecteren. Er worden derhalve twee mixen gemaakt van pathogenen met minstens één parasiet die volgens de literatuur vaker voorkwamen. Een mix bestaat uit *Campylobacter*, *E. coli O157 (EHEC)* en *Cryptosporidium*. Van *Campylobacter* zijn er drie soorten aanwezig die elk zullen worden toegevoegd. De tweede mix bestond uit *Giardia lamblia*, *Salmonella* en *Y. enterocolitica*. Tenslotte wordt er één grote pool gemaakt van alle, door het GI panel, detecteerbare pathogenen, die aanwezig zijn in het ZOL. Bij de drie testen moeten steeds alle pathogenen gedetecteerd worden [58].

3.5 Materialen en methoden commerciële real-time PCR

In dit onderdeel zullen de verschillende gebruikte materialen en methoden worden opgesomd die nodig waren voor de validatie van *Clostridium difficile* op de GeneXpert (Cepheid).

3.5.1 Materialen commerciële real-time PCR

Tabel 22: Overzicht gebruikte apparatuur

Hardware	Merk en Type	Doel
Micropipetten	Thermo Scientific	Kleine volumes nauwkeurig pipetteren
Stalenrekjes	/	Houden van tubes
Vortex	VWR, international	Mixen van stoffen
Centrifuge	VWR, Eppendorf	Afdraaien van stoffen, aërosolvorming vermijden
LAF-kast	Heraeus, Herasafe	Aseptische werkomgeving creëren
Nefelometer	/	McFarland suspensie bepalen
MALDI-TOF Biotyper	Burker, Microflex	Identificatie van bacteriën
Bunsenbrander	Usbeck	Aseptische werkomgeving creëren
Broedstoof	Memmert	Opkweken anaërobe bacteriën
Cartridge	Cepheid	Gesloten systeem dat reagentia bevat voor PCR
GeneXpert	Cepheid	Uitvoeren van real-time PCR
TSS bloedplaat	Biomérieux	Kweken van bacteriën

Tabel 23: Overzicht gebruikt glaswerk en disposables

Hardware	Merk en Type	Doel
Pipettips	Finntip, filter	Kleine volumes nauwkeurig pipetteren
2,0 ml tubes	Sarstedt, Skirt	Vloeistof container
Kleenex	Igefa	Ontsmetten werktabelt en materialen
Entnaalden	Sarstedt, blauw oog	Enten van bacteriën

Tabel 24: Overzicht gebruikte oplossingen

Stofnaam of naam oplossing (merk)	Batch nr.	Vast of vloeibaar	MW stof of samenstelling oplossing (stoffen en conc.)	H-zinnen	P-zinnen	Doel	Afvalverwijdering
Ethanol (Certa)	16B22 -C01- 16981	VI.	70%	H225, H319	P210, P241, P280, P303+ P361+ P353, P305+ P351+ P338, P501	Ontsmetten van werkoppervlakken en apparatuur	Gele container
Xpert C. <i>difficile</i> Sample Rgt. 2.0 ml (Cepheid)	0784C 184	VI.				Staalbuffer	Gele container

Zie tabel 18 voor de gebruikte *Clostridium difficile* stam.

3.5.2 Methoden commerciële real-time PCR

Hieronder zijn de gebruikte methoden ter validatie van de nested multiplex PCR opgesomd.

3.5.2.1 Validatie interrunc precisie/staalbewaring

Een vloeibaar fecesstaal dat negatief is voor pathogenen wordt gespiked met een toxigene *C. difficile* stam. Het staal wordt vloeibaar gemaakt door het te verdunnen in de staalbuffer. De bacterie is anaëroob gekweekt op één tot twee dagen. Een klein aantal kolonies (bv. drie) worden met een entoog toegevoegd aan het staal. Dit staal wordt gehomogeniseerd en verdeeld over drie tubes die op koelkasttemperatuur (2-8°C) bewaard worden. Op dag één, drie en vijf wordt het staal bestudeerd door het in de cartridge te pipetteren en zal de standaarddeviatie op de Ct-waarden bestudeerd worden.

3.5.2.2 Detectielimiet op matrix

Van de gekweekten *C. difficile* kolonies wordt een 0,5 McF-suspensie gemaakt. Deze wordt vervolgens verdund zodat wanneer dit wordt opgelost in de 2 ml staalbuffer-oplossing, er evenveel kolonies aanwezig zijn zoals de detectielimiet beschrijft. Voordat deze kolonies werden toegevoegd, werd een vloeibaar fecesstaal dat negatief was voor pathogenen opgelost in de staalbuffer. Het staal wordt getest door het te laden op een cartridge en de laagste hoeveelheid aan kolonies, waarbij drie stalen achtereenvolgens als positief worden gezien, is de detectielimiet.

4. Resultaten

In dit onderdeel zullen alle resultaten verkregen met de in-house real-time PCR evenals de nested PCR worden beschreven.

4.1 In-house real-time PCR

Hiervan werd zowel de optimalisatie als de validatie vervolledigd. Voor de validatie werd de detectielimiet op matrix, de staalbewaring en de methodevergelijking met de lichtmicroscopie afgewerkt.

4.1.1 Optimalisatie

De in-house multiplex real-time PCR op de Rotor-Gene moet voor de detectie van drie parasieten (*Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica* en *Cryptosporidium*) geoptimaliseerd worden. Een standaard mastermix met de benodigde primers en probes was aanwezig. Aspecifieke amplificatiecurves waren aanwezig in het oranje kanaal, waar *Giardia lamblia* gedetecteerd wordt. Positieve en negatieve controles werden gemaakt. Deze werden onderzocht m.b.v. real-time PCR en de stalen waarvoor er aspecifieke curves waren in het oranje kanaal werden op gel gezet. Het resultaat hiervan was dat alle zichtbare bandjes onder de 100 bp-ladder lagen. Vermits ook deze van het *Giardia lamblia* controlemateriaal hier lagen, was het niet duidelijk of het ging om primerdimeren. Na analyse van de aanwezige primers van deze parasiet bleek dat het amplicon slechts een lengte heeft van 62 bp. Hierdoor lagen de bandjes die een amplicon moesten voorstellen op dezelfde hoogte als eventuele primerdimeren. De mogelijke aanwezigheid van primerdimeren kon niet worden bevestigd.

Vervolgens werden de oligonucleotidenconcentraties geoptimaliseerd. Zoals te zien in tabel 25 was er geen groot verschil in Ct-waarde tussen de eindconcentratie *Giardia lamblia* in de standaard mastermix en de mix met de gehalveerde eindconcentratie. De geoptimaliseerde mastermix heeft dezelfde eindconcentraties aan oligonucleotiden als de standaard mastermix op *Giardia lamblia* na. Hiervan moeten de primers en probe de gehalveerde eindconcentratie hebben t.o.v. de standaard mastermix.

Tabel 25: Optimalisatie eindconcentratie *Giardia lamblia* in mastermix

Legende	Oranje (Ct-waarde)
1. <i>Giardia lamblia</i> conc. standaardmastermix	25,33
2. <i>Giardia lamblia</i> conc. Standaard mastermix gehalveerd	25,45

Welk kanaal= welke parasiet?

Oranje= *Giardia lamblia*

Groen= *Cryptosporidium*

Geel= *Entamoeba histolytica*

Rood= Interne controle (bij de eerste proeven nog niet meegenomen)

De optimale annealingtemperatuur is 60°C en de reactie gaat het best op zonder toevoeging van DMSO. De threshold-waarde werd voor het oranje kanaal verlaagd van 0,03 naar 0,01.

Tot slot werden nieuwe primers en probes besteld om te kijken of er een contaminatie aanwezig was. Sindsdien zijn er geen aspecifieke signalen meer opgetreden in het oranje kanaal, wat betekent dat de aanwezige stock- en werkoplossingen van de oligonucleotiden gecontamineerd waren. Deze zijn ondertussen verwijderd.

4.1.2 Detectielimiet op matrix

Voor zowel *Giardia lamblia* als *Entamoeba histolytica* was de detectielimiet vanuit matrix van de Rotor-Gene reeds bepaald. Deze bedroeg respectievelijk 0,105 kopieën DNA/ μ l reactiemix en 5 kopieën DNA/ μ l reactiemix [59].

Vermits bij positieve stalen voor parasieten in feces niet geweten is hoeveel DNA van een bepaalde pathogeen aanwezig is, zal voor deze bepaling een vers fecesstaal negatief voor parasieten gespiked worden met een positieve controle. Om de detectielimiet op matrix van *Cryptosporidium* te valideren, werd er een swab genomen van dit fecesstaal. Het staal werd gespiked met positief controle materiaal. Hieruit werd een viermaal seriële 10-voudige verdunningsreeks aangemaakt. De vijf verdunningen werden geëxtraheerd en van de laagste verdunning waarvoor er nog amplificatie was, werd vervolgens een 1/2^{de} verdunningsreeks aangemaakt. Hiervan werden per extract tien stalen bestudeerd, zodat er met 95% betrouwbaarheid gezegd kon worden wat de detectielimiet was. Dit was de verdunning van het meest verdunde staal waarvoor er bij alle tien de stalen amplificatie was. In de onderstaande tabel is het resultaat van de detectielimiet op matrix weergegeven.

Tabel 26: Resultaat real-time PCR: Detectielimiet op matrix

Legende	Groen (Ct-waarde)
1. 10 ⁵ kolonies/ml <i>Crypto</i> .	27,17
2. 10 ⁴ " "	29,49
3. 10 ³ " "	33,26
4. 10 ² " "	/
5. 10 ¹ " "	/
6. NC (= Negatieve controle)	/

De interne controle bestaat uit DNA van Phocine herpesvirus 1 (PhHV-1). Alle stalen worden gedurende de DNA-extractie hiermee gespiked. Met deze interne controle kan de efficiëntie van de extractie en de PCR-inhibitie gecontroleerd worden. Uit de resultaten van tabel 26 blijkt dat de geschatte detectielimiet 10³ kolonies/ml is. Om deze schatting te specificeren wordt van dit staal een 1/2 verdunningsreeks gemaakt. Het resultaat hiervan wordt in tabel 27 weergegeven.

Tabel 27: Resultaat real-time PCR: Detectielimiet 1/2 verdunningsreeks

Legende	Groen (Ct-waarde)	Legende	Groen (Ct-waarde)	Legende	Groen (Ct-waarde)
1. 1/2-1	/	11. 1/4-1	35,49	21. 1/8-1	/
2. 1/2-2	34,76	12. 1/4-2	36,16	22. 1/8-2	/
3. 1/2-3	35,76	13. 1/4-3	34,99	23. 1/8-3	/
4. 1/2-4	34,87	14. 1/4-4	34,39	24. 1/8-4	/
5. 1/2-5	35,97	15. 1/4-5	35,36	25. 1/8-5	/
6. 1/2-6	36,08	16. 1/4-6	34,90	26. 1/8-6	37,01
7. 1/2-7	36,03	17. 1/4-7	35,39	27. 1/8-7	37,59
8. 1/2-8	34,99	18. 1/4-8	36,67	28. 1/8-8	/
9. 1/2-9	/	19. 1/4-9	37,12	29. 1/8-9	37,35
10. 1/2-10	33,84	20. 1/4-10	/	30. 1/8-10	/
NC	/				

In tabel 27 kan worden waargenomen dat er geen enkele verdunning is waarvoor al de 10 stalen amplificeren. Als volgende stap zullen er daarom 10 stalen met 10^3 kolonies/ml en nogmaals 10 stalen van de $1/2^{\text{de}}$ verdunning worden geanalyseerd. De resultaten hiervan zijn terug te vinden in tabel 28.

Tabel 28: Resultaat real-time PCR: Detectielimiet 10^3 en $1/2$ verdunning

Legende	Groen (Ct-waarde)	Legende	Groen (Ct-waarde)
1. 10^3 -1	33,25	11. $1/2$ -1	34,00
2. 10^3 -2	33,77	12. $1/2$ -2	33,73
3. 10^3 -3	33,39	13. $1/2$ -3	33,78
4. 10^3 -4	34,26	14. $1/2$ -4	32,34
5. 10^3 -5	33,81	15. $1/2$ -5	33,88
6. 10^3 -6	34,42	16. $1/2$ -6	36,04
7. 10^3 -7	33,33	17. $1/2$ -7	34,46
8. 10^3 -8	33,84	18. $1/2$ -8	33,35
9. 10^3 -9	34,73	19. $1/2$ -9	33,13
10. 10^3 -10	34,32	20. $1/2$ -10	32,41
NC	/		

Volgens tabel 28 worden bij beide concentraties alle 10 de stalen gedetecteerd. Er werd daarom nog een $1/4$ en $1/8^{\text{ste}}$ verdunning onderzocht. Bij de $1/4$ verdunning trad er echter maar in negen van de 10 stalen amplificatie op. Dit betekent dat de $1/2$ verdunning van 10^3 kopieën/ml de detectielimiet is van de Rotor-Gene voor *Cryptosporidium*. Met andere woorden kunnen tot minimaal 500 kolonies/ml worden gedetecteerd. De bijhorende Ct-waarde is dan gemiddeld 33,7. Omdat er in een reactiemix van 25 μ l standaard vijf μ l DNA zit, komt deze detectielimiet overeen met 0,1 kolonie/ μ l reactiemix.

4.1.3 Staalbewaring

Hieronder zijn de Ct-waardes weergegeven voor de drie parasieten. Dit zijn het aantal cycli die nodig waren voordat het signaal een bepaalde threshold-waarde bereikt. Deze threshold werd ingesteld op 0,03 voor *Cryptosporidium* en *Entamoeba histolytica* en op 0,01 voor *Giardia lamblia*.

Alleen voor *Giardia lamblia* was er een vers positief staal aanwezig. *Cryptosporidium* en *Entamoeba histolytica* werden daarom gespiked. De staalbewaring voor *Cryptosporidium* kon op dag drie niet bepaald worden. Voor *Entamoeba histolytica* was er geen amplificatie voor het staal met 10^4 kolonies/ml. Kwalitatief moet er eenzelfde resultaat zijn over de verschillende metingen vanaf dag één t.e.m. dag zeven. De standaarddeviatie (SD) hiervan moet daarom kleiner zijn dan één. De resultaten van de staalbewaring zijn terug te vinden in tabel 29, 30 en 31.

Tabel 29: Ct-waardes staalbewaring *Cryptosporidium*

<i>Cryptosporidium</i> (Ct-waarde)		Kolonies/ml	Dag 0	Dag 1	Dag 7	Standaarddeviatie (SD)
Frigo	Sterk +	10E 5	27,17	27,04	28,43	0,767746
	Zwak +	10E 3	33,26	34,27	34,67	0,726659
Diepvries	Sterk +	10E 5	27,17	27,73	27,63	0,298664
	Zwak +	10E 3	33,26	34	34,95	0,847172

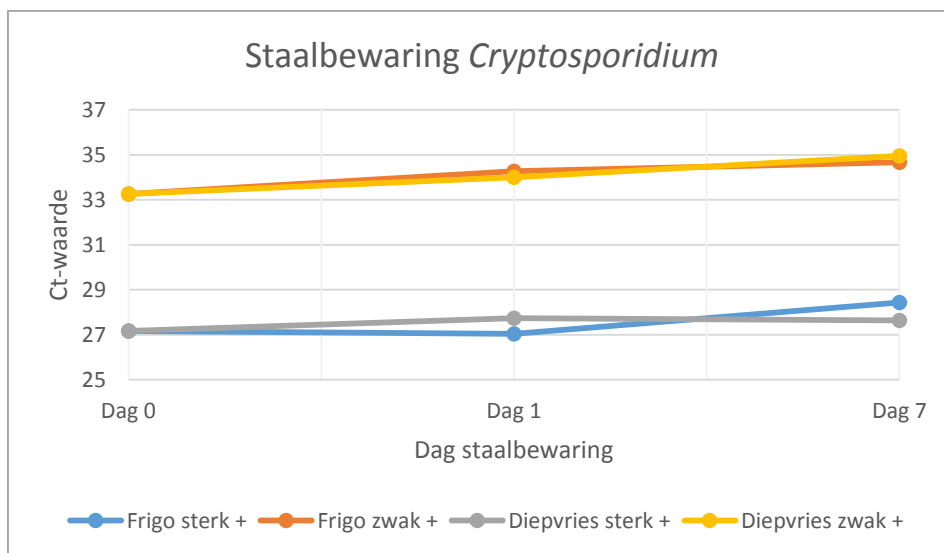
Tabel 30: Ct-waardes staalbewaring *Entamoeba histolytica*

<i>Entamoeba histolytica</i> (Ct-waarde)		Kolonies/ml	Dag 0	Dag 1	Dag 3	Dag 7	SD
Frigo	Zwak +	10E 6	33,74	33,80	34,64	35,11	0,663652
Diepvries	Zwak +	10E 6	33,74	34,02	35,24	35,3	0,722311

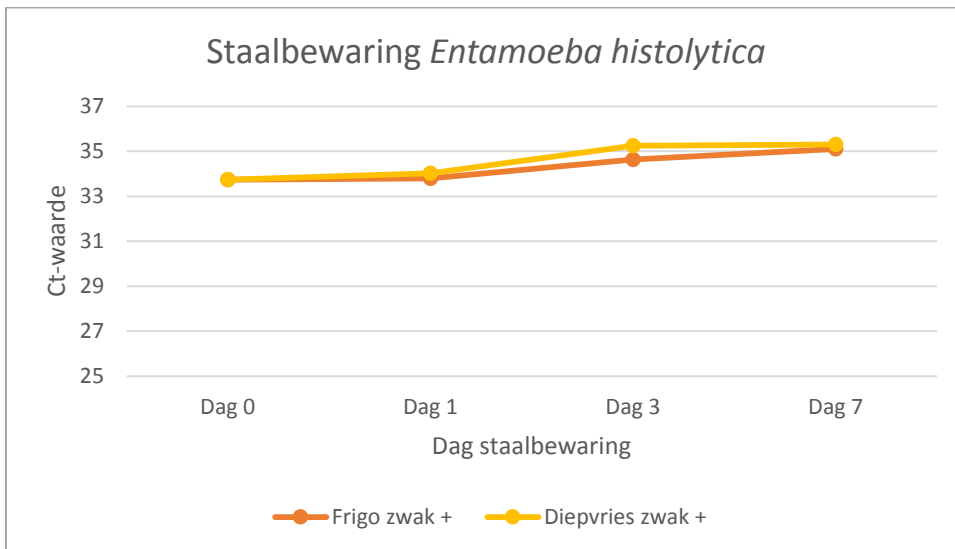
Tabel 31: Ct-waardes staalbewaring *Giardia lamblia*

<i>Giardia lamblia</i> (Ct-waarde)		Dag 0	Dag 1	Dag3	Dag 7	SD
Frigo	Klinisch Staal	24,21	21,61	22,17	22,04	0,293087
Diepvries	Klinisch Staal	24,21	21,09	22,92	22,42	0,945851

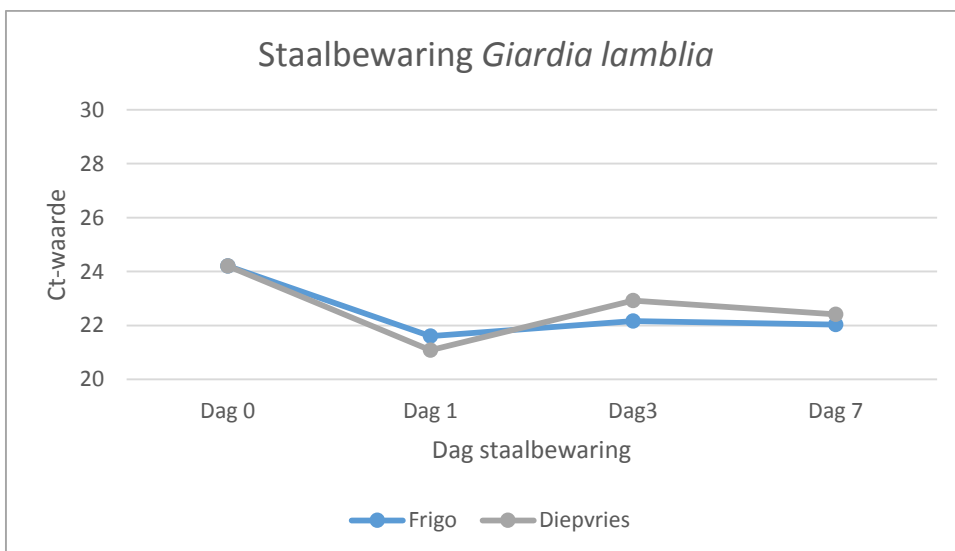
De standaarddeviatie is steeds kleiner dan één. De verschillende metingen hebben dus kwalitatief hetzelfde resultaat. In figuur 22 is te zien dat er een duidelijk verschil is in Ct-waarde tussen een zwak en sterk positief staal, maar dat er geen groot verschil is op vlak van type staalbewaring tussen eenzelfde staal. Dit laatste lijkt ook te kloppen volgens figuur 23 en 24. Over het algemeen neemt de Ct-waarde iets toe gedurende de periode. Enkel de Ct-waardes van *Giardia lamblia* op dag nul komen hier niet mee overeen. Mogelijk zaten er teveel onzuiverheden op de swab van het staal die dag, waardoor het extract minder DNA bevatte. Over het algemeen lijkt de staalbewaring met de frigo lagere Ct-waardes op te leveren en dus meer DNA te bevatten. Hoewel het met het kleine aantal aan resultaten niet bewezen kan worden, is het logisch vermits invriezen een grote fysische invloed heeft op het DNA. Deze bewaring zou echter over lange termijn beter moeten zijn. Doordat de geteste periode slechts zeven dagen bedroeg kan dit uit de bekomen gegevens niet worden afgeleid.



Figuur 22: Grafiek staalbewaring *Cryptosporidium*



Figuur 23: Grafiek staalbewaring *Entamoeba histolytica*



Figuur 24: Grafiek staalbewaring *Giardia lamblia*

4.1.4 Methodevergelijking met lichtmicroscopie

Zie punt 4.2.1.4 'Methodevergelijking met de in-house real-time PCR'.

In dit onderdeel worden stalen die positief waren voor bepaalde parasieten volgens de lichtmicroscopie geanalyseerd met de in-house real-time PCR. Meer bepaald worden een tiental stalen positief voor *Cryptosporidium spp.* en *Giardia lamblia* en een vijftal stalen positief voor *Entamoeba histolytica* getest. Ook enkele stalen negatief voor parasieten volgens de lichtmicroscopie worden bestudeerd. Er zal gekeken worden of een bepaalde methode gevoeliger is.

4.2 Commerciële nested PCR

Hieronder zullen de resultaten van de validatie van het GI panel op de FilmArray worden weergegeven. Deze resultaten worden opgedeeld in deze voor de validatie van de parasieten en deze voor de validatie van de bacteriën.

4.2.1 Validatie parasieten

In dit onderdeel wordt het GI panel gevalideerd voor de detectie van *Cryptosporidium spp.*, *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica* en *Cyclospora cayetanensis*.

4.2.1.1 Verificatie detectielimiet

Voor de verificatie van de detectielimiet werd gebruik gemaakt van synthetisch *Entamoeba histolytica* DNA (Microbiologics). Hiervoor werden enkele stalen gespiked met deze positieve controle. De resultaten zijn weergegeven in tabel 32. Het GI panel kon deze parasiet niet detecteren bij een concentratie gelijk aan 10x de detectielimiet ($2 \cdot 10^4$ cellen/ml). Vermits het gaat om synthetisch DNA dat bestaat uit alleen het 16S rRNA gen van *E. histolytica* zal dit niet gelijk zijn aan het targetgen van het panel. Dit kon echter niet door BioFire worden bevestigd wegens geheimhouding van de targets.

Ter bepaling van de detectielimiet werd een staal positief voor *E. histolytica* met gekende concentratie (Van Lint 44950717) gebruikt. De concentratie bedroeg $2,5 \cdot 10^6$ cellen/ml. Dit staal werd standaard gebruikt als het positief controlemateriaal voor het GI panel.

Tabel 32: Verificatie detectielimiet parasieten

Staal-nummer	Gespiked met	Hoe gespiked	Eindconcentratie in medium	Gedetecteerd
60327038	<i>Cryptosporidium</i>	100 µl $1 \cdot 10^5$ oöcyten/ml PC (deze verdund uit $1 \cdot 10^7$)	$5 \cdot 10^3$ oöcyten/ml	Ja Ook Rotavirus A (zie methodevergelijking)
60327038 (2)	<i>Cryptosporidium</i>	100 µl $1 \cdot 10^5$ oöcyten/ml PC (deze verdund uit $1 \cdot 10^7$)	$5 \cdot 10^3$ oöcyten/ml	Ja Ook Rotavirus A (zie methodevergelijking)
60327038 (3)	<i>Cryptosporidium</i>	100 µl $1 \cdot 10^5$ oöcyten/ml PC (deze verdund uit $1 \cdot 10^7$)	$5 \cdot 10^3$ oöcyten/ml	Ja Ook Rotavirus A (zie methodevergelijking)
60329104	<i>Giardia lamblia</i>	95 µl $1,05 \cdot 10^3$ kopieën/ml PC (deze verdund uit $1,05 \cdot 10^7$)	50 kopieën/ml	Ja
60329104 (2)	<i>Giardia lamblia</i>	95 µl $1,05 \cdot 10^3$ kopieën/ml PC (deze verdund uit $1,05 \cdot 10^7$)	50 kopieën/ml	Ja Ook Norovirus GI/GII
60329104 (3)	<i>Giardia lamblia</i>	95 µl $1,05 \cdot 10^3$ kopieën/ml PC (deze verdund uit $1,05 \cdot 10^7$)	50 kopieën/ml	Ja

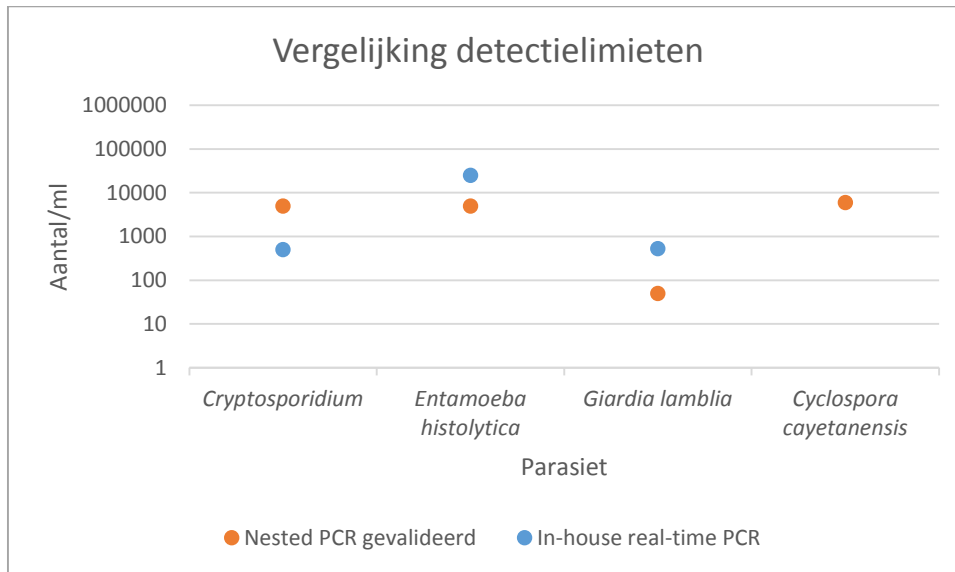
Van Lint 44950717	<i>E. histolytica</i>	400 µl 2,5.10 ⁴ cellen/ml van staal Van Lint 44950717	5.10 ³ cellen/ml	<i>E. histolytica</i> EPEC
Van Lint 44950717 (2)	<i>E. histolytica</i>	400 µl 2,5.10 ⁴ cellen/ml van staal Van Lint 44950717	5.10 ³ cellen/ml	<i>E. histolytica</i> EPEC
Van Lint 44950717 (3)	<i>E. histolytica</i>	400 µl 2,5.10 ⁴ cellen/ml van staal Van Lint 44950717	5.10 ³ cellen/ml	<i>E. histolytica</i> EPEC
60522026	<i>Cyclospora cayetanensis</i>	40 µl 3.10 ³ genoom kopieën/ml PC (deze verdund uit 3.10 ⁸ genoom kopieën/ml)	6000 genoom kopieën/ml	<i>Cyclospora cayetanensis</i>
60522026 (2)	<i>Cyclospora cayetanensis</i>	40 µl 3.10 ³ genoom kopieën/ml PC (deze verdund uit 3.10 ⁸ genoom kopieën/ml)	6000 genoom kopieën/ml	<i>Cyclospora cayetanensis</i>
60522026 (3)	<i>Cyclospora cayetanensis</i>	40 µl 3.10 ³ genoom kopieën/ml PC (deze verdund uit 3.10 ⁸ genoom kopieën/ml)	6000 genoom kopieën/ml	<i>Cyclospora cayetanensis</i>

In tabel 33 wordt een vergelijking gegeven tussen de bepaalde detectielimiet van de in-house real-time PCR, de detectielimiet van het GI panel volgens de bijsluiter en de in deze studie geverifieerde waarde hiervoor. De detectielimiet van de FilmArray van Biomérieux werd bevestigd voor *Cryptosporidium* (5000 oöcyten/ml) en voor *Giardia lamblia* (50 cellen/ml). De detectielimiet van de in-house real-time PCR is voor *Cryptosporidium* 500 oöcyten/ml. Voor *Giardia lamblia* komt dit neer op een detectielimiet van 525 kopieën/ml op de Rotor-Gene. Tenslotte bedraagt de vastgestelde detectielimiet voor *E. histolytica* op de Rotor-Gene 25000 cellen/ml en de gevalideerde detectielimiet op het GI panel 5000 cellen/ml. Voor *Cyclospora cayetanensis* komt de gevalideerde detectielimiet niet overeen met de waarde van de bijsluiter. De kit waarmee deze waarde bepaald werd, had wel enkele dagen fout gestockeerd gestaan (bij 2-8°C i.p.v. 15°C). Verder onderzoek moet uitmaken of dit de reden was, of het aan het panel of aan het positief controlemateriaal ligt.

Tabel 33: Vergelijking detectielimiet parasieten

Detectielimiet	<i>Cryptosporidium</i> spp.	<i>Entamoeba histolytica</i>	<i>Giardia lamblia</i>	<i>Cyclospora cayetanensis</i>
In-house real-time PCR	500 oöcyten/ml	25000 cellen/ml	525 kopieën/ml	/
Nested PCR gevalideerd	5000 oöcyten/ml	5000 cellen/ml	50 kopieën/ml	6000 Genome equivalents/ml
Nested PCR volgens bijsluiter	5000 oöcyten/ml	2000 cellen/ml	50 cellen/ml	180 Genome equivalents/ml

Voor *Cryptosporidium* en *Giardia lamblia* werd de detectielimiet volgens de bijsluiters behaald. De detectielimiet van *Entamoeba histolytica* lag lager dan de verwachte waarde, maar nog steeds in dezelfde range. Op onderstaande vergelijkende figuur is het verschil in de detectielimiet van de twee methodes gegeven. De detectielimiet van de in-house PCR en van de commerciële nested PCR worden afgelezen op de Y-as. Dit is een logaritmische as. Tussen de twee technieken is er voor de detectie van *Giardia lamblia* en *Cryptosporidium* dus één log-waarde verschil. Het verschil voor *Entamoeba histolytica* is nog net niet één log-waarde. *Cyclospora cayetanensis* wordt niet met de in-house PCR bepaald. De detectielimiet ligt voor alle parasieten in dezelfde range. Opvallend is wel dat *Giardia lamblia* voor beide detectiemethoden een lagere detectielimiet heeft dan *Entamoeba histolytica*.



Figuur 25: Vergelijking detectielimieten parasieten

4.2.1.2 Reproduceerbaarheid/staalbewaring

Twee types stalen zullen met elkaar worden vergeleken, namelijk één met een lage en één met een hoge eindconcentratie. De stalen worden gespiked met controlemateriaal. De twee gespikte stalen (volgens tabel 19,20) worden op dag één, drie en vijf geanalyseerd. In tussentijd blijven ze bewaard bij de vooropgestelde bewaringstemperatuur. Volgens de bijsluiters kan het staal tot vier dagen bij koelkasttemperatuur worden bewaard. Kwalitatief moet er voor beide stalen en voor alle dagen hetzelfde resultaat zijn. Bij het maken van het zwak positieve staal op dag één werd vergeten *G. lamblia* toe te voegen. Zowel de zwak als sterk positieve stalen bevatten geen *Cyclospora cayetanensis* doordat het controlemateriaal hiervan nog niet was toegekomen bij het uitvoeren van deze test. In tabel 34 zijn de resultaten van de reproduceerbaarheid/staalbewaring terug te vinden.

Tabel 34: Reproduceerbaarheid/staalbewaring bacteriën en parasieten

Staal	Nested PCR	Conclusie
Staalbewaring zwak pos. dag 1	<i>Campylobacter</i> spp. <i>Salmonella</i> spp. <i>Yersinia enterocolitica</i> EPEC <i>Shigella</i> spp. /EIEC <i>Cryptosporidium</i> spp. <i>Entamoeba histolytica</i>	<i>Giardia</i> niet toegevoegd Voor de rest worden alle pathogenen gedetecteerd
Staalbewaring sterk pos. dag 1	<i>Campylobacter</i> spp. <i>Salmonella</i> spp. <i>Yersinia enterocolitica</i> EPEC <i>Shigella</i> spp. /EIEC <i>Cryptosporidium</i> spp. <i>Entamoeba histolytica</i> <i>Giardia lamblia</i>	Alle pathogenen worden gedetecteerd
Staalbewaring zwak pos. dag 3	<i>Campylobacter</i> spp. <i>Salmonella</i> spp. <i>Yersinia enterocolitica</i> EPEC <i>Shigella</i> spp. /EIEC <i>Cryptosporidium</i> spp. <i>Entamoeba histolytica</i> <i>Giardia lamblia</i>	Alle pathogenen worden gedetecteerd
Staalbewaring sterk pos. dag 3	<i>Campylobacter</i> spp. <i>Salmonella</i> spp. <i>Yersinia enterocolitica</i> EPEC <i>Shigella</i> spp. /EIEC <i>Cryptosporidium</i> spp. <i>Entamoeba histolytica</i> <i>Giardia lamblia</i>	Alle pathogenen worden gedetecteerd
Staalbewaring zwak pos. dag 5	<i>Campylobacter</i> spp. <i>Salmonella</i> spp. <i>Yersinia enterocolitica</i> EPEC <i>Shigella</i> spp. /EIEC <i>Cryptosporidium</i> spp. <i>Entamoeba histolytica</i> <i>Giardia lamblia</i>	Alle pathogenen worden gedetecteerd
Staalbewaring sterk pos. dag 5	<i>Campylobacter</i> spp. <i>Salmonella</i> spp. <i>Yersinia enterocolitica</i> EPEC <i>Shigella</i> spp. /EIEC <i>Cryptosporidium</i> spp. <i>Giardia lamblia</i>	<i>Entamoeba histolytica</i> niet gedetecteerd Voor de rest worden alle pathogenen gedetecteerd

4.2.1.3 Invloed van “inhibitoren”

Kwalitatief moet er hetzelfde resultaat worden bekomen en mogen de inhibitoren geen invloed hebben op de detectie van pathogenen. De resultaten zijn terug te vinden in tabel 35.

Tabel 35: Invloed van inhibitoren

Staal (60519022)	Nested PCR	Conclusie
Onverdund staal	<i>Campylobacter</i> spp. <i>Salmonella</i> spp. <i>Vibrio</i> spp. <i>Vibrio cholerae</i> <i>Yersinia enterocolitica</i> EPEC <i>Shigella</i> spp. /EIEC <i>Cryptosporidium</i> spp. <i>Giardia lamblia</i>	<i>Entamoeba histolytica</i> niet gedetecteerd <i>Vibrio</i> spp. en <i>Vibrio cholerae</i> zijn vals positief Voor de rest worden alle pathogenen gedetecteerd
1/2 verdund staal	<i>Campylobacter</i> spp. <i>Salmonella</i> spp. <i>Yersinia enterocolitica</i> EPEC <i>Shigella</i> spp. /EIEC <i>Cryptosporidium</i> spp. <i>Giardia lamblia</i>	<i>Entamoeba histolytica</i> niet gedetecteerd Alle pathogenen worden gedetecteerd
1/4 verdund staal	<i>Campylobacter</i> spp. <i>Salmonella</i> spp. <i>Yersinia enterocolitica</i> EPEC <i>Shigella</i> spp. /EIEC <i>Cryptosporidium</i> spp. <i>Entamoeba histolytica</i> <i>Giardia lamblia</i>	Alle pathogenen worden gedetecteerd
1/8 verdund staal	<i>Campylobacter</i> spp. <i>Salmonella</i> spp. <i>Yersinia enterocolitica</i> EPEC <i>Shigella</i> spp. /EIEC <i>Cryptosporidium</i> spp. <i>Entamoeba histolytica</i> <i>Giardia lamblia</i>	Alle pathogenen worden gedetecteerd
1/16^{de} verdund staal	<i>Campylobacter</i> spp. <i>Salmonella</i> spp. <i>Yersinia enterocolitica</i> EPEC <i>Shigella</i> spp. /EIEC <i>Cryptosporidium</i> spp. <i>Entamoeba histolytica</i>	<i>Giardia lamblia</i> niet gedetecteerd Voor de rest worden alle pathogenen gedetecteerd

4.2.1.4 Methodevergelijking met de in-house real-time PCR

Voor deze methodevergelijking werden geen *Cyclospora cayetanensis* stalen getest, vermits ze niet vergeleken kunnen worden met de in-house real-time PCR. Voor de andere parasieten werd er gestreefd om zeven tot tien retrospectieve klinische stalen te testen. Voor *Entamoeba histolytica* moesten er stalen aangevraagd worden aan andere ziekenhuizen. In totaal werden er voor deze parasiet uiteindelijk zes stalen getest. Indien er een discordant resultaat is tussen de real-time PCR en de nested PCR dan kan het staal getest worden met een antigeentest en/of nieuwe lichtmicroscopie en/of via sequencing. Het resultaat is weergegeven in tabel 36. Ook werden er enkele negatieve stalen volgens de microscopie getest. Dit resultaat is terug te vinden in tabel 38.

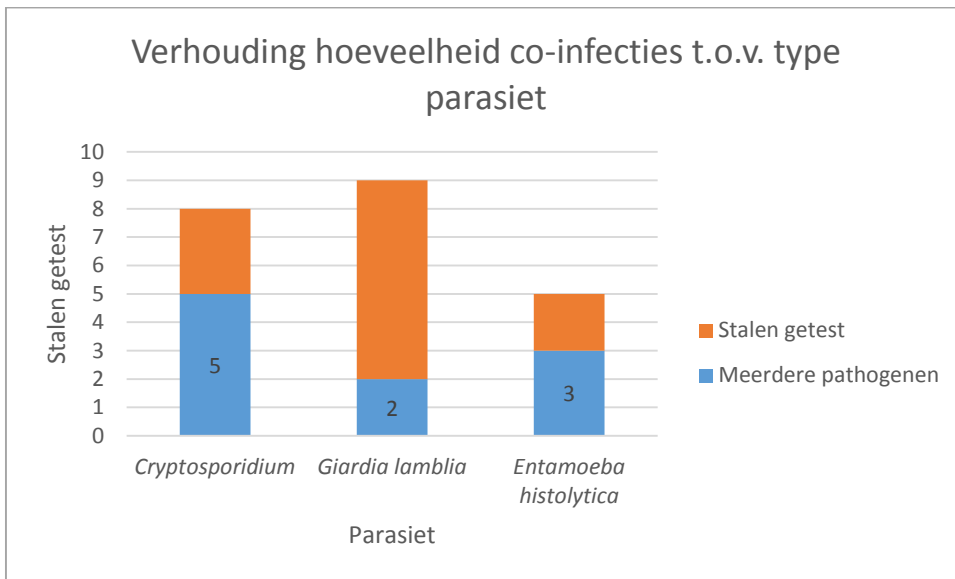
Tabel 36: Methodevergelijking van positieve parasieten stalen via microscopie

Staal	Microscopie	Real-Time PCR	Nested PCR	Antigeentest	Resultaat referentielabo/sequencing	Conclusie
SLG 2: Giardia	<i>G. lamblia</i>	<i>G. lamblia</i> (Ct= 28,51)	<i>G. lamblia</i>			Concordant
51009138	<i>G. lamblia</i>	<i>G. lamblia</i> (Ct= 34,79)	<i>G. lamblia</i>			Concordant
31102020	<i>G. lamblia</i>	<i>G. lamblia</i> (Ct= 32,88)	<i>G. lamblia</i> EAEC	Positief		Concordant
40428081	<i>G. lamblia</i>	<i>G. lamblia</i> (Ct= 28,41)	<i>G. lamblia</i>			Concordant
60315103	<i>G. lamblia</i>	<i>G. lamblia</i> (Ct= 18,85)	<i>G. lamblia</i>			Concordant
20203045	<i>G. lamblia</i>	<i>G. lamblia</i> . (Ct= 14,98)	<i>G. lamblia</i>			Concordant
51225046	<i>G. lamblia</i>	<i>G. lamblia</i> (Ct= 17,99)	<i>G. lamblia</i>			Concordant
30830105	<i>G. lamblia</i>	<i>G. lamblia</i> (Ct= 30,35)	<i>G. lamblia</i>			Concordant
Giardia Jessa 31/3/16	<i>G. lamblia</i>	<i>G. lamblia</i> (Ct= 25,05)	<i>G. lamblia</i> EAEC EPEC			Concordant
50901067	<i>Crypto</i>	<i>Crypto</i> (Ct= 27,96)	<i>Crypto</i> <i>Campylobacter</i> EAEC EPEC			Concordant
50918126	<i>Crypto</i>	<i>Crypto</i> (Ct= 23,93)	<i>Crypto</i> EAEC			Concordant
50820102	<i>Crypto</i>	<i>Crypto</i> (Ct= 23,04)	<i>Crypto</i> EAEC EPEC			Concordant
30725100	<i>Crypto</i>	<i>Crypto</i> (Ct= 22,15)	<i>Crypto</i> STEC		Negatief voor STEC	Concordant
50914020	<i>Crypto</i>	<i>Crypto</i> (Ct= 20,58)	<i>Crypto</i>			Concordant
51017043	<i>Crypto</i>	<i>Crypto</i> (Ct= 26,15)	<i>Crypto</i>			Concordant

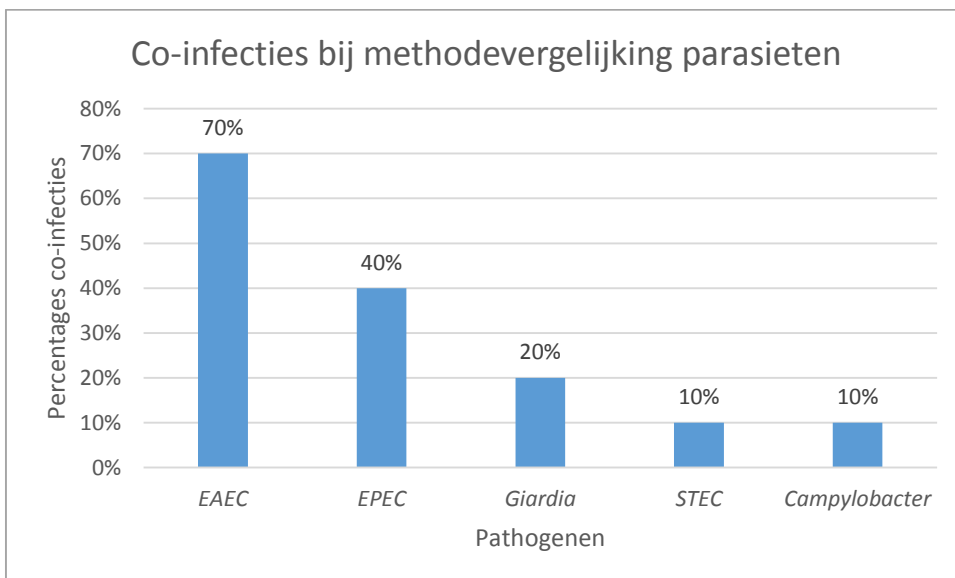
50918071	<i>Crypto</i>	<i>Crypto</i> (Ct 21,13)	<i>Crypto</i> EAEC			Concordant
SLG 1: Crypto	<i>Crypto</i>	<i>Crypto</i> (Ct= 25,11)	<i>Crypto</i>			Concordant
SLG 6: Ent. histolytica	<i>Enta- moeba histolytica</i>	<i>E. histolytica</i> (Ct= 35,36) 2 ^{de} keer: <i>E. histolytica</i> (Ct= 35,04) en <i>Giardia</i> (Ct= 39,37)	<i>E. histolytica</i> <i>G. lamblia</i>	<i>G. lamblia</i> negatief		Concordant
16010334 Ent. histolytica	<i>Enta- moeba histolytica</i>	<i>E. histolytica.</i> (Ct= 29,34)	<i>E. histolytica</i>			Concordant
16010791 Ent. histolytica	<i>Enta- moeba histolytica</i>	<i>E. histolytica</i> (Ct= 23,96)	<i>E. histolytica</i> EAEC			Concordant
15032523	<i>Enta- moeba histolytica</i>	<i>E. histolytica</i> (Ct= 27,90)	<i>E. histolytica</i>			Concordant
Van Lint 44950717	<i>Enta- moeba histolytica</i>	<i>E. histolytica</i> (Ct= 29,64) <i>G. lamblia</i> (Ct= 38,67)	<i>E. histolytica</i> <i>G. lamblia</i> EPEC			Concordant

Vertrokken vanuit stalen positief voor parasieten zijn alle resultaten concordant tussen de microscopie, in-house real-time PCR en de nested PCR. In figuur 26 is te zien dat er in totaal acht stalen voor *Cryptosporidium*, negen voor *Giardia lamblia* en zes voor *Entamoeba histolytica* zijn getest. Eén staal van deze laatste parasiet (SLG 4: *E. histolytica*) dat afkomstig was van het Sint-Lucas te Gent werd negatief bevonden voor *Entamoeba histolytica* door al de aanwezige technieken op het ZOL. Deze werd daarom niet meegenomen in de verwerking van de resultaten op onderstaande figuur. In *Cryptosporidium* en *Entamoeba histolytica* positieve stalen waren er opvallend vaak meerdere pathogenen aanwezig. In respectievelijk 62,5% en 60% van de stalen. Voor *Giardia lamblia* lag dit percentage met 22,2% opvallend lager.

Figuur 27 geeft weer welke deze pathogenen waren bij de co-infecties. Doordat er bij meerdere stalen meerdere co-infecterende pathogenen waren, is de som van deze percentages niet gelijk aan 100%. Van de 15 co-infecterende pathogenen waren er 11 pathogene *E. coli*'s (73,3%). Dit komt overeen met in zeven van de tien stalen een co-infectie met EAEC en in vier van de tien stalen met EPEC. Verder werden ook *Giardia*, STEC en *Campylobacter* gedetecteerd in een co-infectie.



Figuur 26: Verhouding hoeveelheid co-infecties t.o.v. type parasiet



Figuur 27: Co-infecties bij methodevergelijking parasieten

Staal 30725100 werd door het laboratorium microbiologie van het UZ Brussel bestudeerd op de aanwezigheid van STEC. Uit hun in-house PCR bleek dat het staal hiervoor negatief was. Dit betekende echter niet dat het resultaat verkregen met het GI panel bij deze studie vals positief was. Het referentielabo had ook het GI panel gevalideerd en hieruit bleek dat slechts 74% van de stalen die daarop positief waren geconfirmeerd konden worden als STEC-positief met hun in-house PCR. Zoals hoger vermeld was staal 'SLG 4: *E. histolytica*' een staal dat positief was voor *Entamoeba histolytica* volgens het Sint-Lucas te Gent. Dit staal werd zowel via de in-house als de commerciële PCR getest en was met beide technieken negatief voor deze protozoa. Vervolgens werd het staal bestudeerd met lichtmicroscopie, maar ook hier werd geen *Entamoeba histolytica* waargenomen, enkel gisten. Er werden vervolgens gedegenereerde primers ontwikkeld met als target het small subunit ribosomaal RNA-gen (zie tabel 37). Deze primers werden zo ontwikkeld om een onderscheid te maken tussen *Entamoeba dispar*, *histolytica* en *coli*. Bij het sequencen had staal 30725100 als beste resultaat *Kluyveromyces lactis* met een Query cover van 94%.

Tabel 37: Sequencing primers *Entamoeba*

<i>Entamoeba</i>	Fwd Primer (5'-3')	Rev Primer (5'-3')	Tm		Amplicon
			Fwd	Rev	
<i>dispar</i>	TCAGATACCGTCGTAGTCCT	AGTCTCGTTTCGTTACCGGAAT	57.0	59.2	380 bp
<i>histolytica</i>	TCAGATACCGTCGTAGTCCT	AGTCTCGTTTCGTTACCGGAAT	57.0	59.2	379 bp
<i>coli</i>	TTAGATACCGTCGTAGTCCT	AGTCTCGTTTCGTTATCGGAAT	54.5	57.5	389 bp
Gedegeneerde primer	TYAGATACCGTCGTAGTCCT	AGTCTCGTTTCGTTAYCGGAAT			

Tabel 38: Methodevergelijking van negatieve stalen via microscopie

Staal	Microscopie	Real-Time PCR	Nested PCR	Antigeen-sneltest	Resultaat nieuwe lichtmicroscopie	Conclusie
60321149	Negatief voor parasieten	Niet gedetecteerd	<i>G. lamblia</i>	Negatief voor <i>G. lamblia</i>		Discordantie
60327038	Negatief voor parasieten	/	Rotavirus A	Positief voor Rotavirus		Positief voor Rotavirus
60329093	Negatief voor parasieten	/	Norovirus GI/GII	Positief voor Norovirus		Positief voor Norovirus
60329104 (2)	Negatief voor parasieten	/	Norovirus GI/GII	Positief voor Norovirus		Positief voor Norovirus
60411030	Negatief voor parasieten	<i>G. lamblia</i>	<i>G. lamblia</i>	Negatief voor <i>G. lamblia</i>	<i>G. lamblia</i>	Positief voor <i>Giardia</i>
60330055	Negatief voor parasieten	/	Sapovirus	/		

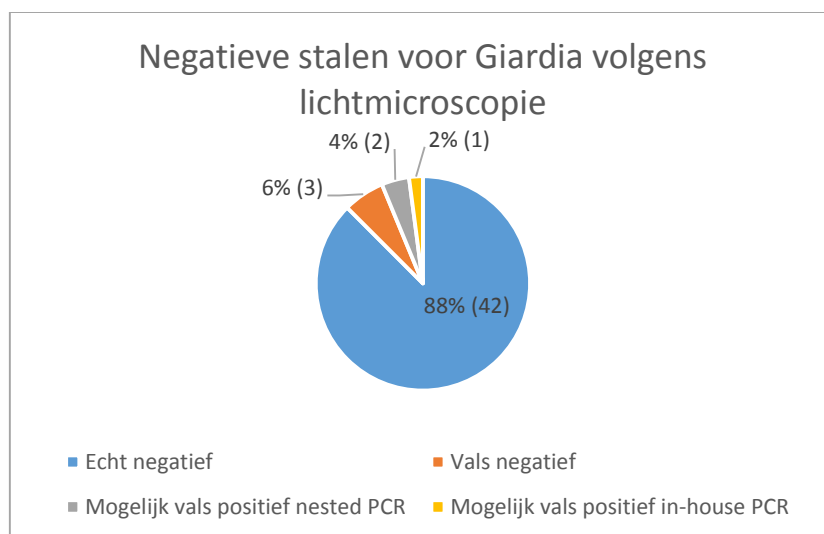
Er was één staal bij de methodevergelijking van de microscopisch negatieve stalen die een discordantie voor *Giardia lamblia* opleverde. Voor *Giardia lamblia* werden sequencing primers (zie tabel 39) ontworpen die ook als target het small subunit ribosomaal RNA-gen hebben.

Tabel 39: Sequencing primers *Giardia lamblia*

<i>G. lamblia</i> primer	Sequence (5'->3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	GACGGCTCAGGACGACGGTT	20	64.57	65.00	3.00	1.00
Reverse primer	AGGCCAACTACGGCGTTTT	20	62.69	55.00	4.00	2.00

Er werden echter nooit sequenties verkregen en ook bij het opzetten van het PCR-product op gel werden er geen amplicons bekomen. Omdat de primers geen te hoge complementariteit (zelf en met elkaar) hebben, werd er een touchdown-PCR uitgevoerd, waarvan de annealingtemperatuur varieerde van 65,5°C tot 50,5°C. Ook de magnesium-concentratie werd stapsgewijs verhoogd van 1,5 mM tot 5,0 mM. Omdat er ook nu geen amplicons te zien waren, werden er vier mastermixen gemaakt. Eén bevatte de in-house forward primer en reverse primer, een andere bevatte de in-house forward, maar sequencing reverse primer. De derde mix bevatte de sequencing forward en in-house reverse primer en de laatste mix bevatte beide sequencing primers. Deze mixen werden vervolgens met de in-house real-time PCR geanalyseerd. Overal trad er amplificatie op in het oranje kanaal, op de mixen met de sequencing reverse primer na. Er zal dus een nieuwe reverse primer besteld/ontworpen moeten worden.

Enkel voor *Giardia lamblia* waren er stalen die vals negatief waren volgens de lichtmicroscopie. Van de 102 uitgevoerde testen op de FilmArray waren er 58 verschillende patiëntenstalen gebruikt (bij detectielimiet is meermaal hetzelfde staal gebruikt). 48 hiervan waren negatief volgens de lichtmicroscopie. In figuur 28 is een onderverdeling tussen de echt negatieve en de vals negatieve stalen te zien voor *G. lamblia* volgens de lichtmicroscopie. Eén staal werd met zekerheid vals negatief genoemd als het zowel via de in-house real-time PCR als via de commerciële nested PCR positief was. Dit was voor 6% van de stalen het geval. Twee stalen waren alleen positief via de nested PCR en één enkel via de in-house PCR. Ook bij deze stalen kon de sequentie niet worden bepaald. Vermits de detectielimiet van het GI panel ongeveer één log-waarde lager ligt dan deze van de Rotor-Gene zouden de twee mogelijk vals positieve stalen volgens nested PCR ook positief kunnen zijn. Ongeveer 88% van de stalen positief voor *Giardia lamblia* kunnen geconfirmeerd worden met behulp van de lichtmicroscopie.



Figuur 28: Negatieve stalen voor *G. lamblia* volgens lichtmicroscopie

Alle stalen die volgens de microscopie positief waren voor *Cryptosporidium* of *Entamoeba histolytica*, waren dit ook volgens beide PCR-technieken. Er waren ook geen stalen die vals negatief waren voor deze parasieten volgens de lichtmicroscopie net als dat er geen mogelijke vals positieve stalen hiervoor waren.

4.2.1.5 Specificiteit

In de bijsluiters is er een lijst beschikbaar van verschillende pathogenen die getest werden op mogelijke kruisreactiviteit. Volgens deze bijsluiters is er voor *Giardia lamblia* met het GI panel op de Filmarray kruisreactiviteit met commensalen micro-organismen (namelijk *Bifidobacterium* en *Ruminococcus*) waargenomen in klinische stalen. Als stalen gespiked werden met controlemateriaal tot een eindconcentratie van $1,5 \cdot 10^9$ cellen/ml dan vertoonden deze geen kruisreactiviteit. Er werd een 4,0 McF-suspensie gemaakt van *Bifidobacterium* (hoger kon de Nefelometer niet meten), wat overeenkomt met $1,2 \cdot 10^9$ cellen/ml. Wegens een gebrek aan een *Ruminococcus* stam kon deze kruisreactiviteit niet worden nagegaan. Een drietal retrospectieve klinische *Entamoeba dispar* stalen werden getest. Deze zouden, vanaf concentraties van 10^5 oöcyten/ml, kruisreactiviteit met de primers van *Entamoeba histolytica* kunnen veroorzaken. Ook werden een vijftal *Ent. coli* stalen getest. In tabel 40 zijn de resultaten van de controle van de specificiteit weergegeven.

Tabel 40: Specificiteit

Staal	Microscopie	Real-Time PCR	Nested PCR	Antigeentest	Sequencing	Conclusie
50728038	<i>Ent. coli</i>	Niet gedetecteerd	Niet gedetecteerd			Er is geen kruisreactiviteit met <i>Entamoeba coli</i>
40331098	<i>Ent. coli</i>	Niet gedetecteerd	EAEC EPEC ETEC			Er is geen kruisreactiviteit met <i>Entamoeba coli</i>
60303113	<i>Ent. coli</i>	Niet gedetecteerd	Niet gedetecteerd			Er is geen kruisreactiviteit met <i>Entamoeba coli</i>
40219071	<i>Ent. coli</i>	/	Niet gedetecteerd			Er is geen kruisreactiviteit met <i>Entamoeba coli</i>
40219070	<i>Ent. coli</i>	/	Niet gedetecteerd			Er is geen kruisreactiviteit met <i>Entamoeba coli</i>
SLG 3: En. dispar	<i>E. dispar</i>	<i>G. lamblia</i> pos (Ct= 41,01) 2 ^{de} keer: <i>G. lamblia</i> niet gedetecteerd	Sapovirus	<i>G. lamblia</i> negatief	/	Er is geen kruisreactiviteit met <i>Entamoeba dispar</i> Discordantie <i>Giardia lamblia</i>
SLG 5: En. dispar	<i>E. dispar</i>	/ 2 ^{de} keer: /	<i>G. lamblia</i> EPEC	<i>G. lamblia</i> negatief	/	Er is geen kruisreactiviteit met <i>Entamoeba dispar</i> Discordantie <i>Giardia lamblia</i>
51030067	<i>E. dispar</i>	<i>G. lamblia</i> pos (Ct 34,79)	<i>G. lamblia</i>			Er is geen kruisreactiviteit

						met <i>Entamoeba dispar</i> <i>Giardia lamblia</i> pos
4,5 McF Bifido	/	/	Niet gedetecteerd			Er is geen kruisreactiviteit met <i>Giardia lamblia</i>

4.2.1.6 Menginfecties

Een negatief vers fecesstaal werd gespiked met de parasieten en gekweekte bacteriën. Voor de grote pool werd een negatief vers fecesstaal gespiked met alle mogelijke pathogenen. De eindconcentratie aan *Entamoeba histolytica* in de grote pool bedroeg 7.10^3 cellen/ml wat hoger is als de gevalideerde detectielimiet. De resultaten van de menginfecties zijn terug te vinden in tabel 41.

Tabel 41: Menginfecties van bacteriën en parasieten

Staal	Nested PCR	Conclusie
Menginfectie Crypto, EHEC, Campylo	<i>Campylobacter spp.</i> <i>STEC</i> <i>-EHEC</i> <i>Cryptosporidium spp.</i>	Alle pathogenen worden gedetecteerd
Menginfectie Giardia lamblia, Salmonella en Y. enterocolitica	<i>Giardia lamblia</i> <i>Salmonella spp.</i> <i>Yersinia enterocolitica</i>	Alle pathogenen worden gedetecteerd
Grote pool	<i>Campylobacter spp.</i> <i>Clostridium difficile toxin A/B</i> <i>Salmonella spp.</i> <i>Vibrio spp.</i> <i>Vibrio cholera</i> <i>Yersinia enterocolitica</i> <i>STEC</i> <i>E. coli O157</i> <i>Shigella spp. /EIEC</i> <i>Cryptosporidium spp.</i> <i>Cyclospora cayetanensis</i> <i>Giardia lamblia</i>	<i>Entamoeba histolytica</i> niet gedetecteerd

4.2.2 Validatie bacteriën

In dit onderdeel wordt het GI panel gevalideerd voor de detectie van de enterobacteriën *Campylobacter jejuni*, *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella bongori* en *Shigella spp.* .

4.2.2.1 Validatie detectielimiet

De stammen werden opgekweekt en de kolonies konden gedurende overnacht groeien in een aërobe omgeving alvorens deze gebruikt werden. In tabel 18 zijn de stammen weergegeven die gebruikt werden voor de kweek van de bacteriën. Al deze stammen werden op microbank bewaard bij -80°C. In tabel 42 wordt de detectielimiet volgens de bijsluiter weergegeven en in tabel 43 zijn de resultaten van de verificatie hiervan te vinden.

Tabel 42: Detectielimiet van de bacteriën volgens bijsluiter

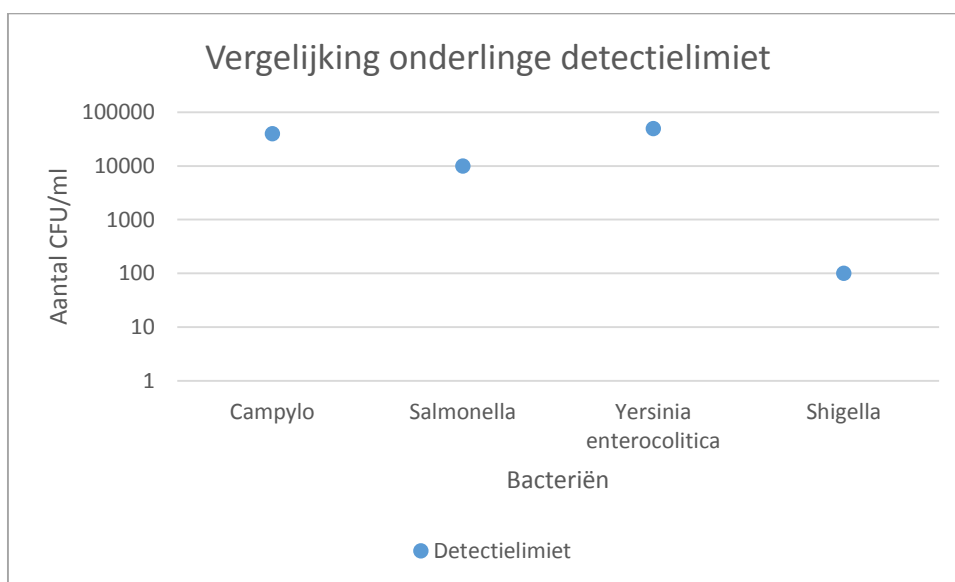
Bacterie		Detectielimiet volgens bijsluiter
<i>Campylobacter</i>		4.10 ⁴ cellen/ml
<i>Salmonella</i>	<i>bongori</i> <i>enterica spp.</i>	1.10 ⁴ CFU (Colony forming units) /ml 5.10 ³ CFU/ml
<i>Yersinia enterocolitica</i>		5.10 ⁴ CFU/ml
<i>Shigella (EIEC)</i>		100 CFU/ml

Tabel 43: Verificatie detectielimiet enterobacteriën

Staal-nummer	Gespiked met	Hoe gespiked	Eindconcentratie in medium	Gedetecteerd
60512137 (1)	<i>Campylobacter jejuni</i>	53,3 µl 1,5.10 ⁶ CFU/ml PC (deze verdund uit 0,5 McF)	4.10 ⁴ CFU/ml	Ja
60512137 (2)	<i>Campylobacter jejuni</i>	53,3 µl 1,5.10 ⁶ CFU/ml PC (deze verdund uit 0,5 McF)	4.10 ⁴ CFU/ml	Ja
60512137 (3)	<i>Campylobacter jejuni</i>	53,3 µl 1,5.10 ⁶ CFU/ml PC (deze verdund uit 0,5 McF)	4.10 ⁴ CFU/ml	Ja
60512137 (4)	<i>Salmonella bongori</i>	13,3 µl 1,5.10 ⁶ CFU/ml PC (deze verdund uit 0,5 McF)	1.10 ⁴ CFU/ml	Ja
60512137 (5)	<i>Salmonella bongori</i>	13,3 µl 1,5.10 ⁶ CFU/ml PC (deze verdund uit 0,5 McF)	1.10 ⁴ CFU/ml	Ja
60512137 (6)	<i>Salmonella bongori</i>	13,3 µl 1,5.10 ⁶ CFU/ml PC (deze verdund uit 0,5 McF)	1.10 ⁴ CFU/ml	Ja
60512137 (7)	<i>Yersinia enterocolitica</i>	66,7 µl 1,5.10 ⁶ CFU/ml PC (deze verdund uit 0,5 McF)	5.10 ⁴ CFU/ml	Ja
60512137 (8)	<i>Yersinia enterocolitica</i>	66,7 µl 1,5.10 ⁶ CFU/ml PC (deze verdund uit 0,5 McF)	5.10 ⁴ CFU/ml	Ja

60512137 (9)	<i>Yersinia enterocolitica</i>	66,7 µl 1,5.10 ⁶ CFU/ml PC (deze verdund uit 0,5 McF)	5.10 ⁴ CFU/ml	Ja
60512137 (10)	<i>Shigella spp.</i>	13,3 µl 1,5.10 ⁴ CFU/ml PC (deze verdund uit 0,5 McF)	100 CFU/ml	Ja
60512137 (11)	<i>Shigella spp.</i>	13,3 µl 1,5.10 ⁴ CFU/ml PC (deze verdund uit 0,5 McF)	100 CFU/ml	Ja
60512137 (12)	<i>Shigella spp.</i>	13,3 µl 1,5.10 ⁴ CFU/ml PC (deze verdund uit 0,5 McF)	100 CFU/ml	Ja

De geverifieerde detectielimiet komt voor de vier bacteriën overeen met de detectielimiet in de bijsluiter. Op basis van figuur 29 kan er gezegd worden dat deze voor *Shigella*, met twee log-waardes, beduidend lager ligt dan de andere enterobacteriën.



Figuur 29: Vergelijking infectieuze dosis met detectielimiet bacteriën

4.2.2.2 Reproduceerbaarheid/staalbewaring

Zie 4.2.1.2

4.2.2.3 Invloed van "inhibitoren"

Zie 4.2.1.3

4.2.2.4 Methodevergelijking met de gekweekte bacteriën

Voor deze methodevergelijking werden enkel retrospectieve klinische fecesstalen (2010-2016) van het ZOL gebruikt. Per enterobacterie werden vijf stalen geanalyseerd. Enkel voor *Shigella* was het aantal stalen beperkt tot twee. Kwalitatief moet er met de commerciële nested PCR hetzelfde resultaat worden behaald als met de kweek van de bacteriën. Indien er discordante resultaten waren, werden deze opgestuurd naar het referentielaboratorium (WIV: Wetenschappelijk Instituut Volksgezondheid) te Brussel. In tabel 44 is het resultaat van deze methodevergelijking te vinden.

Tabel 44: Methodevergelijking met de gekweekte kweek van bacteriën

Staal	Gekweekte kweek	Nested PCR	Antigeen-sneltest	Resultaat referentielabo /sequencing	Conclusie
20430024	<i>Campylobacter coli</i>	<i>Campylobacter</i> spp. <i>Clostridium difficile</i>			Concordant
20507016	<i>Campylobacter jejuni</i>	<i>Campylobacter</i> spp.			Concordant
20706120	<i>Campylobacter jejuni</i>	<i>Campylobacter</i> EPEC			Concordant
20712009	<i>Campylobacter jejuni</i>	<i>Campylobacter</i> spp.			Concordant
20713100	<i>Campylobacter jejuni</i>	<i>Campylobacter</i> spp. EPEC			Concordant
30329066	<i>Yersinia ent.</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i> <i>Clostridium difficile</i>			Concordant
41224111	<i>Yersinia ent.</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i>			Concordant
50417149	<i>Yersinia ent.</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i> EPEC			Concordant
20706090	<i>Yersinia ent.</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i> EPEC			Concordant
21005068	<i>Yersinia ent.</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i> EPEC			Concordant
20508106	<i>Salmonella</i> spp.	<i>Salmonella</i> spp.			Concordant
20627012	<i>Salmonella</i> spp.	<i>Salmonella</i> spp.			Concordant
20703016	<i>Salmonella</i> spp.	<i>Salmonella</i> spp. <i>Rotavirus A</i> <i>Norovirus GI/GII</i>	Rotavirus en Norovirus negatief		Concordant
20724086	<i>Salmonella</i> spp.	EPEC ETEC		Nog te versturen	Discordant
30502110	<i>Salmonella</i> spp.	<i>Salmonella</i> spp. <i>Rotavirus A</i>	Rotavirus negatief		Concordant
50113038	<i>Shigella</i> spp.	<i>Shigella</i> spp. /EIEC			Concordant
50903102	<i>Shigella</i> spp.	<i>Shigella</i> spp. /EIEC			Concordant

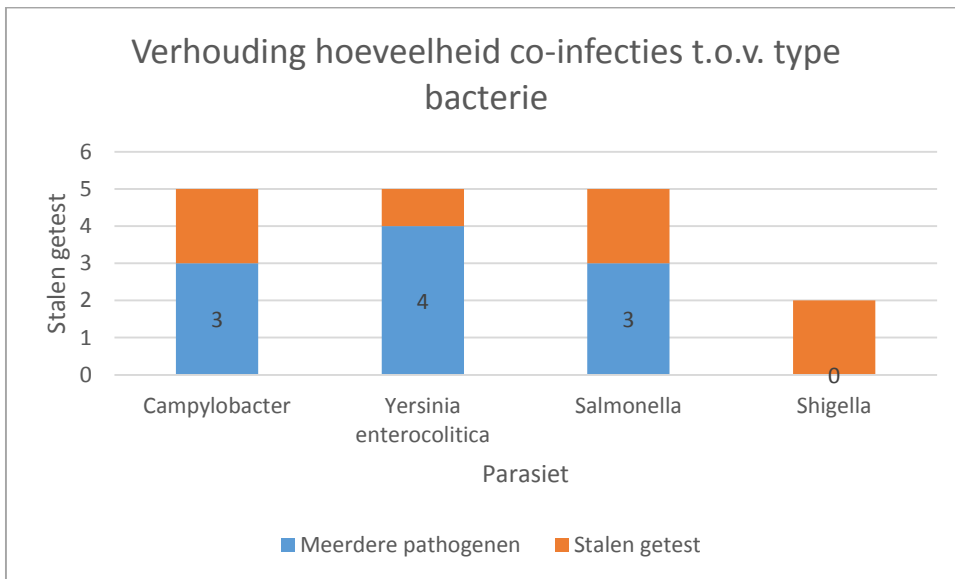
Er werden geen discordanties vastgesteld met uitzondering van staal 20724086. Dit staal was positief voor *Salmonella* volgens de kweek, maar negatief volgens de PCR. Er werd aangevraagd om het staal te kunnen opsturen naar het referentielabo, maar er is nooit een respons geweest. Mogelijk is er dus één staal vals negatief op het GI panel voor de bacteriën.

De resultaten van de methodevergelijking van de bacteriën en parasieten werden in tabel 45 weergegeven. Hierin zijn de sensitiviteit (de echt positieve resultaten) en de specificiteit (echte negatieve resultaten) bepaald. Voor het GI panel werden meer dan 95% positieve stalen juist geanalyseerd. De specificiteit bedraagt hiervoor echter maar 85,7% wat wijst op meer vals positieve resultaten. De specificiteit van de in-house PCR is 96,7%; maar de sensitiviteit ligt lager dan het panel. Rekening moet gehouden met de vier discordante resultaten. Afhankelijk van deze effectieve waarde variëren deze percentages.

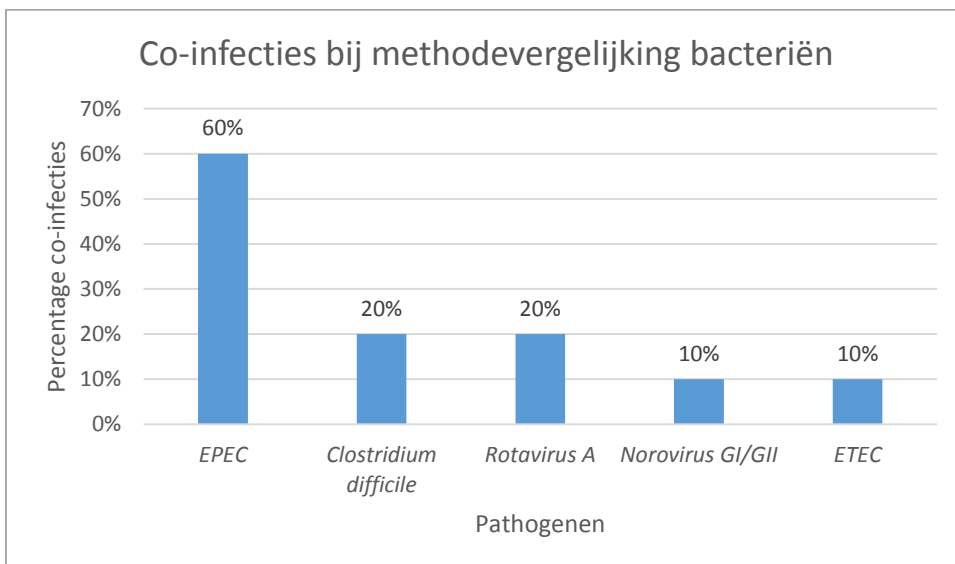
Tabel 45: Vergelijking sensitiviteit en specificiteit van GI panel en In-house PCR

		Test positief	Test negatief		
GI panel	Pathogeen aanwezig	40	2	Sensitiviteit	95,2%
	Pathogeen afwezig	2	12	Specificiteit	85,7%
In-house PCR	Pathogeen aanwezig	24	2	Sensitiviteit	92,3%
	Pathogeen afwezig	1	29	Specificiteit	96,7%

In figuur 30 zijn het aantal co-infecties weergegeven. Deze traden bij de bacteriën opvallend veel op met 60% van de stalen positief voor *Campylobacter* en *Salmonella* en zelfs 80% van de stalen positief voor *Yersinia Enterocolitica*. Voor *Shigella* waren er maar twee stalen bestudeerd en deze hadden beide geen co-infecties. Van alle stalen bestudeerd tijdens de methodevergelijking (39) waren er 20 stalen met een co-infectie. Dit komt overeen met 51,3%. Figuur 31 geeft weer uit welke pathogenen deze co-infecties bestaan. Van de 12 co-infecterende pathogenen waren er zeven pathogene *E. coli*'s (58,3%). Dit komt overeen met in zes van de tien stalen een co-infectie met EPEC en in één van de tien stalen met ETEC. Verder werden ook Rotavirus A, *Clostridium difficile* en Norovirus GI/GII gedetecteerd in een co-infectie.

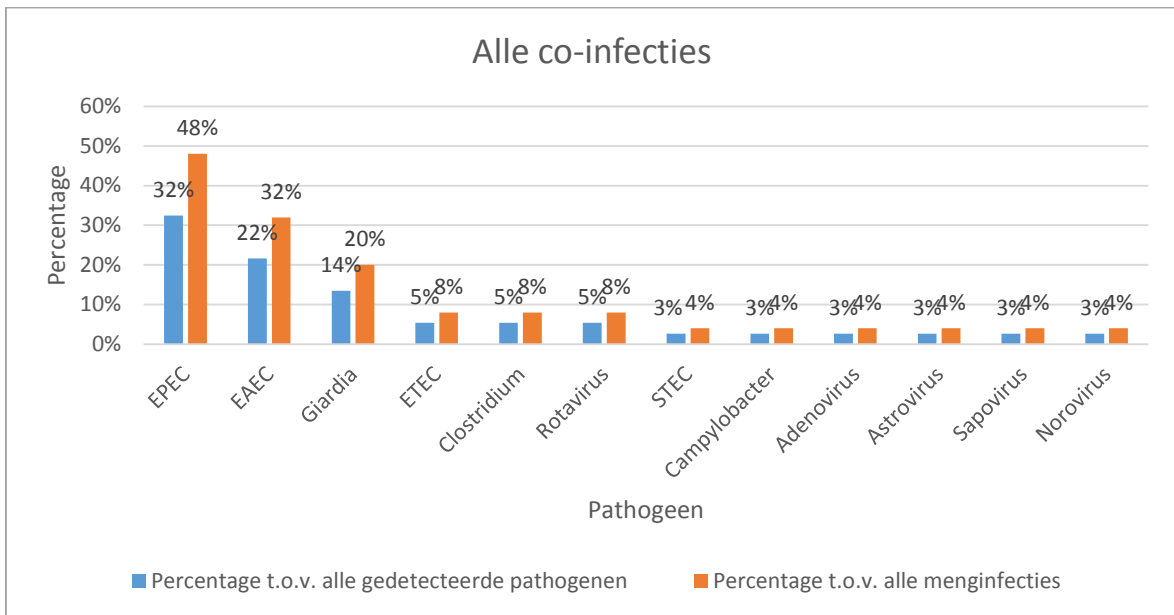


Figuur 30: Co-infecties per type bacterie



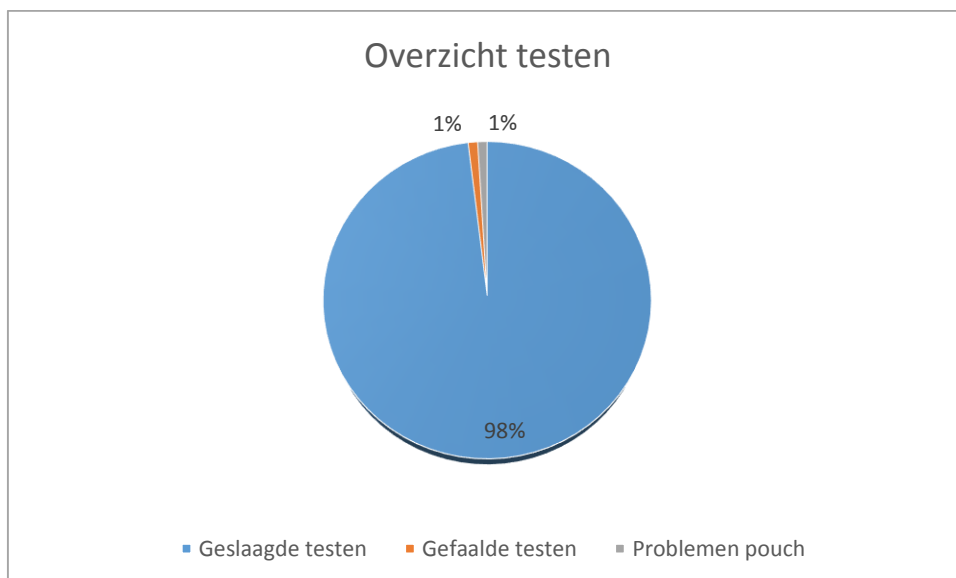
Figuur 31: Co-infecties bij methodevergelijking bacteriën

Als alle testen op het GI panel in beschouwing worden genomen zijn ook hier de meest voorkomende pathogenen bij menginfecties de pathogene *E. coli*'s. Maar liefst 1/3 (32%) van al de gedetecteerde co-infecterende pathogenen was EPEC. Vervolgens was EAEC met 22% het tweede meest voorkomend pathogeen onder de menginfecties. De derde meest voorkomende co-pathogeen was *Giardia lamblia* met 14% van menginfecties. In figuur 32 wordt dit weergegeven.



Figuur 32: Percentage alle co-infecties

Op onderstaande figuur zijn alle testen weergegeven. Er werden 102 testen uitgevoerd. Hiervan gaf één test een foutmelding door een invalid (1%). Bij de voorbereiding van de testen, waren er soms kleine problemen. Eénmalig bleef een naald hangen in de pouch, waardoor deze niet gebruikt kon worden. Ook was er een probleem met een naald die vastzat in de injectietube. Omdat er in elke doos van 30 testen steeds twee extra injectietubes, bufferoplossingen en pasteurpipetten zaten, had dit uiteindelijk geen gevolg op het aantal pouches die getest konden worden. Gelijkaardig was er een probleem met een verpakking zonder pasteurpipet en was bij één kit het voorraadzakje met bufferoplossingen gescheurd. Al deze problemen hadden geen invloed op de hoeveelheid stalen die getest konden worden.



Figuur 33: Overzicht verhouding geslaagde/gefaalde testen

4.3 Validatie Clostridium difficile op GeneXpert

4.3.1 Interrun

De *Clostridium difficile* stam uit tabel 18 werd uitgeplaat en anaëroob gekweekt. Na één dag werden kolonies met een entoog toegevoegd aan een fecesstaal dat vloeibaar is gemaakt. Dit gespikte staal werd over drie tubes verdeeld en de stalen werden bewaard op koelkasttemperatuur (2-8°C). Op dag één, drie en vijf werd via de commerciële real-time PCR de Ct-waarde van Toxine B bepaald. Voor kwalitatieve testen wordt een standaarddeviatie gehanteerd die kleiner is dan één over deze periode als het staal bij 2-8°C bewaard wordt. Het resultaat hiervan is in tabel 46 weergegeven.

Tabel 46: Ct-waardes interrunc/staalbewaring *C. difficile*

Dag	Resultaat	Ct-waarde (Toxin B)
1	<i>Clostridium difficile</i> Toxin B positief	23,1
3	<i>Clostridium difficile</i> Toxin B positief	23,7
5	<i>Clostridium difficile</i> Toxin B positief	23,8
Standaarddeviatie		0,379

De standaarddeviatie over de drie dagen heen bedroeg ongeveer 0,38 wat kleiner is dan één. Dit betekent dat er gedurende één werkweek kwalitatief hetzelfde resultaat wordt verkregen.

4.3.2 Detectielimiet op matrix

Voor de verificatie van de detectielimiet werd er vanuit anaëroob opgekweekte bacteriën een 0,5 McF-suspensie gemaakt. Deze werd verdund en opgelost in de buffer. Het eindvolume hiervan was 2ml en de concentratie kwam overeen met de detectielimiet. De LoD voor toxigene *C. difficile* is 1657 CFU/staal (= 1657 CFU/2ml) met een 95% betrouwbaarheidsinterval variërende van 1157 CFU/staal tot 3561 CFU/staal. Beide geanalyseerde stalen hebben een concentratie die in de range van het betrouwbaarheidsinterval ligt. Het resultaat hiervan is terug te vinden in tabel 47.

Tabel 47: Eerste Ct-waardes bij bepaling detectielimiet

CFU/staal	Resultaat	Ct-waarde (Toxin B)
2058	<i>Clostridium difficile</i> Toxin B negatief	37,4
3000	<i>Clostridium difficile</i> Toxin B negatief	38,0

Volgens de bijsluiters ligt de cutoff-waarde op een Ct-waarde van 37,0 [60]. Hierdoor zijn beide stalen negatief voor Toxin B ondanks dat er hiervoor een Ct-waarde bekomen is. Omdat de bovenstaande concentraties niet gedetecteerd werden, werd daarom de hoogste waarde van het 95% betrouwbaarheidsinterval, namelijk 3561 CFU/staal, getest. Dit wordt in tabel 48 weergegeven.

Tabel 48: Ct-waarde detectielimiet *C. difficile*

CFU/staal	Resultaat	Ct-waarde (Toxin B)
3561 (1)	<i>Clostridium difficile</i> Toxin B positief	34,5
3561 (3)	<i>Clostridium difficile</i> Toxin B positief	33,8
3561 (4)	<i>Clostridium difficile</i> Toxin B positief	34,6
Standaarddeviatie		0,43589

Staal nummer twee van *Clostridium difficile* met een eindconcentratie van 3561 CFU/buffer was negatief met een Ct-waarde van 39,1. Dit staal stond reeds een dag in de koele kamer. Mogelijk was het DNA reeds afgebroken door aanwezige DNases. Voor bovenstaand staalnummer drie en vier werd derhalve een nieuwe verdunningsreeks gemaakt vanuit nieuwe kolonies. De detectielimiet van de GeneXpert voor *Clostridium difficile* bedraagt 3561 CFU/staal, wat de bovengrens is van het 95% betrouwbaarheidsinterval.

4.4 Kostenberekening

In de bijlage kan de volledige kostenberekening worden gevonden. Hierin worden de commerciële nested PCR en de routine-analyse met elkaar vergeleken. Op basis van verschillende algoritmen zal bepaald worden wanneer het voordeliger is om het panel te gebruiken. Onderstaande tabel is een samenvattende tabel van de kostprijs per test.

Tabel 49: Kostprijs één test verschillende algoritmen

Samenvatting	Prijs één test
Enteropathogenen	€ 25,745
Parasieten	€ 22,671
Op aanvraag	€ 14,415
FilmArray	€ 109,70

Zoals te verwachten zijn de testen ter bepaling van de enteropathogenen, parasieten en ook de testen op aanvraag (*Clostridium difficile*, Rota-adenovirus en Benzydine) goedkoper dan één test op de FilmArray. Echter blijkt uit meerdere studies dat er gemiddeld drie microbiologische testen worden aangevraagd door de arts [1] [61]. Doordat de FilmArray meerdere targets detecteert per test kan het panel vanaf een aanvraag van vijf tot zes verschillende pathogenen voordeliger zijn.

5. Discussie

Optimalisatie in-house PCR

In dit onderzoek wordt er een vergelijkende studie gemaakt tussen de in-house PCR en een nieuwe commerciële PCR. Vooraleer hieraan kon worden begonnen, moest de in-house PCR verder geoptimaliseerd en gevalideerd worden wegens een contaminatieprobleem. Voor alle componenten van de reactiemix: de QuantiTect multiplex PCR NoRox mastermix en de oligonucleotiden, werd een nieuwe batch besteld. Ook zijn de oligonucleotidenconcentraties in de mastermix geoptimaliseerd. Enkel de concentraties voor de primers en probe van *Giardia lamblia* werden na optimalisatie veranderd. Deze werden gehalveerd t.o.v. de vroegere standaard mastermix. De annealingtemperatuur werd tijdens de optimalisatie ook afgewisseld van 60°C tot 64°C. Hieruit bleek dat deze optimaal was bij de reeds gebruikte annealingtemperatuur van 60°C. Het toevoegen van een additief (DMSO) aan de mastermix bleek geen positief effect te hebben. Ten slotte werd tijdens de analyse van de resultaten de threshold-waarde standaard verlaagd van 0,03 naar 0,01 voor het oranje kanaal ter detectie van *Giardia lamblia*. Sinds het gebruik van de nieuwe oligonucleotiden is er geen contaminatie meer geweest.

Validatie in-house PCR

De detectielimiet op matrix van *Cryptosporidium* bedraagt 500 oöcyten/ml oftewel 0,1 oöcyt/ μ l reactiemix. Dit ligt in dezelfde range als de reeds bepaalde detectielimiet van *Giardia lamblia* die 0,105 kopieën DNA/ μ l reactiemix bedroeg. Voor *Entamoeba histolytica* lag deze waarde relatief hoog met 5 kopieën DNA/ μ l reactiemix [59].

Op vlak van staalbewaring kan geconcludeerd worden dat de stalen gedurende minimum een week bewaard kunnen worden op zowel koelkast- als diepvriestemperatuur zonder een merkbaar verschil in Ct-waarde te ondergaan. Over het algemeen is er niet direct een groot verschil tussen staalbewaring in de koelkast en in de diepvries, maar de koelkast heeft vaker een iets lagere Ct-waarde. Dit kan verklaard worden uit het feit dat het diepvriesstaal een vries- en ontdooistap ondergaat die een fysieke invloed hebben op het DNA. Met andere woorden: het DNA zal hierdoor deels gedegradieerd worden.

Validatie commerciële nested PCR

Traditioneel worden meerdere testen uitgevoerd voor de detectie van enteropathogenen, waaronder kweek en microscopie. Dit maakt het etiologisch onderzoek tijdrovend. Daarnaast hebben deze testen vaak een lagere gevoeligheid. Nieuwere technieken met een korte doorlooptijd worden steeds populairder. In dit onderzoek wordt een commerciële nested PCR (GI panel op de FilmArray) gevalideerd. 58 stalen werden retrospectief geanalyseerd. De stalen werden geselecteerd op basis van de uitslag van de klassieke kweek. Buss et al. (2015) hebben een prospectieve studie uitgevoerd op de validatie van het GI panel op de FilmArray.

Tijdens de studie van het ZOL werd het GI panel vergeleken met de in-house PCR. De sensitiviteit en specificiteit werden voor beide methodes bepaald. Het panel had een sensitiviteit van 95,2% en specificiteit van 85,7%. De twee stalen die vals positief waren op het panel werden met een referentiemethode (sequencing) onderzocht. Het resultaat hiervan was niet doorslaggevend. De in-house PCR was minder gevoelig met een sensitiviteit van 92,3%. De specificiteit lag met 96,7% wel hoger. In het onderzoek van Buss et al. waren er van de 1556 geanalyseerde stalen 5 (0,3%) die vals negatief en 5 (0,3%) die vals positief waren op het GI panel t.o.v. de vergelijkende methodes. Er waren 42 (2,7%) stalen die na de referentiemethode niet doorslaggevend waren. In de studie van Buss et al. had het panel een specificiteit van 97,1%. De sensitiviteit bedroeg 94,5% op drie targets na. Deze hadden een te lage prevalentie gedurende de studie voor het bepalen van de sensitiviteit. Zoals hoger vermeld is de studie van het ZOL een retrospectieve studie en deze van Buss et al. een

prospectieve. De resultaten hiervan mogen daarom niet vergeleken worden. Hieruit blijkt wel dat ondanks hogere gevoeligheid van de FilmArray, er in rekening moet worden gebracht dat het GI panel werkt volgens de principes van PCR en daardoor geen onderscheid kan maken tussen levende en dode organismen.

In de methodevergelijking was meer dan 93% van de stalen concordant met de klassieke kweek en lichtmicroscopie. Dit is vermoedelijk te wijten aan een verschil in gevoeligheid. In de studie van het ZOL waren er bij de parasieten drie discordante resultaten voor *Giardia lamblia*. De sequencing hiervan met de nieuw ontworpen primers had geen output. Dit is waarschijnlijk toe te schrijven aan een niet werkende reverse primer. Van de drie discordante resultaten waren er twee op het GI panel en één op de in-house PCR. Bij de bacteriën was er één discordant resultaat, namelijk voor *Salmonella*. Eveneens is dit resultaat niet gekend. Kruisreactiviteit van commensale micro-organismen werd niet waargenomen. In de grote studie van Buss et al. waren er bij de discordante resultaten onder de parasieten vals negatieve stalen aanwezig voor *Giardia lamblia*, maar ook voor *Cryptosporidium*. Van de zeven discordanties voor *Giardia lamblia* waren er vier positief volgens de referentiemethode. Volgens de studie van Buss et al. blijft één staal onzeker. De laatste twee stalen vertoonden wel kruisreactiviteit tussen het FilmArray *Giardia lamblia* assay en commensalen organismen (namelijk *B. longum* en *R. callidus*). Deze kruisreactiviteit komt overeen met 7,4% van alle *Giardia lamblia* detecties. In de studie van het ZOL kwam deze kruisreactiviteit niet voor.

Verder blijkt uit de studie van het ZOL dat inhibitoren in het staal een invloed hebben op de detectielimiet. In een meer verdund staal werden meerdere pathogenen gedetecteerd. Het staal met zeven pathogenen kon *Entamoeba histolytica* pas detecteren vanaf een 1/4^{de} verdunding. Mogelijk bevatte het onverdunde en 1/2^{de} verdunde staal te veel inhibitoren, waardoor het DNA afgebroken werd. De laatste verdunding kon geen *Giardia lamblia* meer waarnemen. Verder onderzoek is hier vereist.

Uit het onderzoek naar de staalbewaring op Cary Blair medium blijkt dat tot drie dagen eenzelfde resultaat wordt verkregen. Vanaf dag vijf kan alleen *Entamoeba histolytica* niet worden herkend door het panel en dit bij het sterk positieve staal. Het sterk positieve staal van dag vijf werd niet opnieuw getest. Een mogelijke verklaring voor het uitblijven van amplificatie van *Entamoeba histolytica* is dat er bij het sterk positieve staal veel meer DNA aanwezig is van de andere pathogenen. Hierdoor was er mogelijk een selectieve voorkeur van het panel ter identificatie van andere pathogenen.

Verder werden ook alle mogelijke pathogenen in de menginfecties gedetecteerd, met uitzondering van de grote pool. Hier werd *E. histolytica* niet gedetecteerd. Dit kan mogelijk verklaard worden als het pooleffect waardoor er een selectieve voorkeur ontstaat. Zo een grote menginfectie zal echter ook nooit in een reële situatie voorkomen. Bij de studie uitgevoerd door het ZOL waren zes stalen die een co-infectie hadden ook geïnfecteerd met virussen. Het laboratorium heeft als enige testen hiervoor de antigeen sneltesten. Er was één staal positief voor sapovirus, waarvoor geen test aanwezig is. Drie stalen werden positief geconfirmeerd (twee voor norovirus, één voor rotavirus) m.b.v. de antigeentest. Bij de geteste stalen van de methodevergelijking van enterobacteriën zaten ook twee stalen positief voor deze virussen, maar deze waren niet te detecteren met de antigeentest. Vermits de antigeen detectiemethodes consistent minder gevoelig zijn voor de detectie van rotavirus A [62], adenovirus F [63] en norovirus GI/GII [2], werden bij het onderzoek van Buss et al. moleculaire testen gebruikt als de vergelijkende methode. Ten opzichte van deze vergelijkende methodes waren er voor de virussen vijf vals negatieve en 14 vals positieve resultaten. Het sapovirus was met een voorkomen van 3,8% het vijfde meest voorkomende pathogeen. Bij kinderen jonger dan één jaar kwam het zelfs in 10% van alle stalen voor.

De waarde van co-infecties moet onderzocht worden, maar een interpretatie hiervan is niet gemakkelijk. Vele GI pathogenen kunnen voor langere tijd asymptomatisch (symptoomloos) worden uitgescheiden. De interpretatie van positieve resultaten is hierdoor moeilijker. Uit het feit dat er een hoge specificiteit is en het systeem gesloten is, blijkt dat het FilmArray GI panel niet gevoelig is voor contaminatie. Desondanks is het niet simpel om de betekenis van gedetecteerde pathogenen te begrijpen, vermits de klinische implicaties van bepaalde pathogeencombinaties niet gekend zijn.

De detectielimiet opgegeven door de firma kon voor alle bacteriën geverifieerd worden. Enkel voor de parasieten was er een verschil tussen de LoD-waarde voor *Entamoeba histolytica* en *Cyclospora cayetanensis* en de geverifieerde detectielimiet. Voor zowel de detectie van *Entamoeba histolytica* als *Giardia lamblia* is het GI panel het gevoeligst t.o.v. de in-house PCR. De in-house real-time PCR is echter gevoeliger voor de detectie van *Cryptosporidium*. Uitgaande van deze detectielimiet krijgt de in-house PCR de voorkeur voor het testen van *Cryptosporidium* en het panel voor *Giardia lamblia*. Door het uitblijven van amplificatie van het *Entamoeba histolytica* targetgen bij de staalbewaring, de invloed van inhibitoren en de grote pool (menginfectie) gaat de voorkeur voor het detecteren van deze parasiet uit naar de in-house real-time PCR. Dit is tegenstrijdig met de detectielimiet. Een herevaluatie van de staalbewaring en pool is aangeraden. Voor al de pathogenen had de nested PCR een gevoelige detectielimiet. Enkel voor *Cyclospora cayetanensis* is dit niet het geval. Verder onderzoek hiervan is aangewezen.

Het panel heeft een goede invloed op de detectie van pathogenen in het geval van uitbraken. Tijdens een eerdere studie van Buss et al. (2013) was er een uitbraak aan cyclosporiasis in Noord-Amerika. Doordat dit een organisme is dat moeilijk detecteerbaar blijkt via de gebruikelijke methodes was er een duidelijke impact van het GI panel. Tijdens een studie van Prakash et al. (2014) was er een uitbraak van *Shigella* spp. in Noord-Amerika. Dit is een bacterie die goed te identificeren valt via cultuur en relatief vaak voorkomt in Noord-Amerika. Desondanks bleek dat het GI panel meer stalen positief identificeerde dan de cultuur. Ook hieruit blijkt dat bij een uitbraak het GI panel een positieve impact heeft op de detectie van dit pathoogeen.

De test blijkt zeer robuust te zijn in de studie van het ZOL en de studie van Buss et al. De laatstgenoemde had in 99,2% van de testen een resultaat verkregen na één run. In negen gevallen (0,58%) faalde een interne controle en slechts 0,19% van de runs had een software error. Tot slot was er één run die vervroegd door de laborant werd beëindigd. In totaal waren er 13 stalen die oorspronkelijk geen resultaat gaven, maar waarvan 12 stalen na een nieuwe run wel een geldig resultaat hadden. Eén staal kon niet opnieuw getest worden, wat resulteert in 1556 stalen met een geldig resultaat. Toegepast op de studie van het ZOL zijn deze cijfers gelijkaardig. Namelijk in 98% van de testen werd resultaat verkregen na één run. Bij slechts één staal (0,98%) was er een software error en één pouch (0,97%) kon niet gebruikt worden. De interne controles hebben nooit gefaald.

Aan de studie van het ZOL en die van Buss et al. zaten ook enkele minpunten. Zo waren er enkele targets van het GI panel waarvoor er zeer weinig positieve stalen geanalyseerd konden worden. Voor de studie van het ZOL waren dit alle virussen, de pathogene *E. coli*'s, *Plesiomonas shigelloides*, *Clostridium difficile* toxin A/B en *Vibrio/Vibrio cholerae*. Bij de studie van Buss et al. werden er zeer weinig positieve stalen voor *E. histolytica*, *Vibrio* spp. *V. cholerae* en *Y. enterocolitica* bestudeerd. Ook werden de patiëntenstalen enkel verzameld in de lente- en zomermaanden. Hierdoor kan het voorkomen van seizoensgebonden pathogenen fout weergegeven worden.

In de IUO (Investigational Use Only) versie van het GI panel was er ook een target aanwezig voor *Aeromonas* spp. . Volgens de studie van Buss et al. werden er meer positieve *Aeromonas* species

gedetecteerd via het panel dan via cultuur, met een sensitiviteit van 80%. Uit een andere retrospectieve studie van Khare et al. (2014) bleek echter dat de sensitiviteit van het panel voor deze bacterie maar 23,8% bedroeg in vergelijking met de cultuur. Buss et al. werkten met prospectieve stalen die binnen vier dagen na ontvangst werden geanalyseerd. Echter door de lage sensitiviteit t.o.v. de cultuur werd de target voor *Aeromonas* niet meegenomen naar de FDA gelabelde test.

Concreet heeft het GI panel enkele voordelen t.o.v. de in-house PCR. De commerciële techniek is een gevoelige, specifieke techniek die meerdere pathogenen tegelijk kan detecteren. De algoritmen gebruikt voor de etiologische diagnose van gastro-enteritis worden hierdoor vereenvoudigd. Ook is zowel de duur van de staalvoorbereiding als de analysetijd verminderd. Met de in-house methode kunnen tevens dagelijks meerdere stalen geanalyseerd worden. Op vlak van kosten scoort de in-house PCR beter. Een voorstel van deze studie is het GI panel te gebruiken voor klinisch relevante stalen met negatieve cultuur/kweek bij immuungecompromitteerde patiënten, kritisch zieke patiënten en deze die reeds na een behandeling nog ernstige klachten en/of symptomen hebben. Uit de kostenberekening blijkt dat vanaf ongeveer zes aangevraagde testen, het GI panel voordeliger is. In deze gevallen kan er standaard voor het panel gekozen worden.

Validatie commerciële real-time PCR

Voor de detectie van *C. difficile* wordt in het Ziekenhuis Oost-Limburg gebruik gemaakt van de GeneXpert *C. difficile* test. De technische validatie van deze test moest nog vervolledigd worden. Hieruit kon enerzijds besloten worden dat een staal bewaard kan worden gedurende één week op koelkasttemperatuur zonder dat er kwalitatief een ander resultaat wordt verkregen. Anderzijds is de bovengrens van het 95% betrouwbaarheidsinterval van de detectielimiet, namelijk 3561 CFU/ml, geverifieerd als de detectielimiet van *Clostridium difficile* op de GeneXpert.

6. Besluit

Een gastro-enteritis infectie kan geassocieerd worden met verschillende pathogenen, waaronder parasieten, bacteriën en virussen. In het verleden werden meerdere testen uitgevoerd ter identificatie van de mogelijke ziekteverwekker(s), maar daardoor was de methodiek tijdrovend. Vaak hadden deze testen ook een lage nauwkeurigheid, waardoor er een opmars kwam van nieuwe technieken. In deze studie is het GI panel van de FilmArray onderzocht naar de betrouwbaarheid van zijn resultaten en dit in vergelijking met een in-house real-time PCR en met de conventionele methode. Dit onderzoek was gericht op de parasieten en enterobacteriën die het panel kan detecteren.

Vooraleer de studie gerealiseerd kon worden, moest de in-house real-time PCR geoptimaliseerd worden. De oligonucleotideconcentraties in de mastermix zijn hiervoor herzien. De invloed van additieven en een hogere annealingstemperatuur is bestudeerd, maar bleven identiek aan de standaardmethode. Aspecifieke amplificatiecurves verdwenen met het gebruik van nieuwe oligonucleotiden. De detectielimiet op matrix van *Cryptosporidium* is bepaald en bedroeg 500 oöcyten/ml. Hiermee ligt het in dezelfde range als deze van de andere parasieten. De staalbewaring had in een tijdspanne van zeven dagen geen significant effect op de detectie van parasieten. Uit de validatie van *Clostridium difficile* op de GeneXpert blijkt dat de detectielimiet 3561 CFU/ml bedraagt en dat er over een periode van één week kwalitatief hetzelfde resultaat wordt verkregen.

Uit de vergelijkende studie is gebleken dat zowel het GI panel als de in-house PCR gevoeliger zijn dan de routinemethode voor parasieten. Het panel is een specifieke methode die voor 95% concordant is met de in-house PCR en bovendien ook gevoeliger is dan zowel de kweek/lichtmicroscopie als de in-house PCR. Onderzoek van discordanties voor de twee moleculaire technieken gaf geen duidelijkheid en vergt een verder onderzoek. De enterobacteriën konden enkel vergeleken worden met de kweek. Ook hier is het panel specifiek, maar is de gevoeligheid gelijk. De detectielimiet werd geverifieerd en kwam enkel voor *Entamoeba histolytica* en *Cyclospora cayetanensis* niet overeen met de bijsluiter. Verder onderzoek hiervan is vereist.

Er is geen kruisreactiviteit gedetecteerd. Verder blijkt dat de aanwezige inhibitoren in het staal een invloed hebben op de detectielimiet. In een meer verdund staal werden meerdere pathogenen gedetecteerd. Uit het onderzoek naar de staalbewaring blijkt dat tot drie dagen eenzelfde resultaat wordt verkregen. Menginfecties met drie pathogenen worden steeds gedetecteerd. In geval van de grote pool aan menginfecties wordt *Entamoeba histolytica* niet gedetecteerd.

In het algemeen kan gesteld worden dat de test zeer robuust is. Bij 98% van de testen werd er een resultaat verkregen. Concreet is het panel een gevoelige en specifieke methode die het potentieel heeft om de etiologische diagnose van gastro-enteritis sterk te vereenvoudigen.

Literatuurlijst

- [1] C. Stockmann, M. Rogatcheva, B. Harrel, M. Vaughn, R. Crisp, M. Poritz, S. Thatcher, E. K. Korgenski, T. Barney, J. Daly en A. T. Pavia, „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.*, vol. 21, nr. 2, pp. 179.e9-179.e15, Februari 2015.
- [2] S. N. Buss, A. Leber, K. Chapin, P. D. Fey, M. J. Bankowski, M. K. Jones, M. Rogatcheva, K. J. Kanack en K. M. Bourzac, „Multicenter Evaluation of the BioFire FilmArray Gastrointestinal Panel for Etiologic Diagnosis of Infectious Gastroenteritis,” *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 53, pp. 915-925, March 2015.
- [3] A. Liston, „VIB,” 2 Juli 2015. [Online]. Available: <http://www.vib.be/nl/nieuws/Pages/Angst-verhoogt-het-risico-op-gastro-intestinale-infecties-en-complicaties-op-lange-termijn.aspx>. [Geopend 6 April 2016].
- [4] P. Bol, „Gastro-enteritis,” *Nederlands Tijdschrift Tandheelkunde*, Delft, 2002.
- [5] „Med-Info,” 28 Oktober 2011. [Online]. Available: http://www.med-info.nl/Afwijking_MDL%20-%20Algemeen%20-%20gastroenteritis.html. [Geopend 24 Februari 2016].
- [6] Wieschrijft, „Aandoeningen: gastro-enteritis (buikgriep),” 2016. [Online]. Available: <http://mens-en-gezondheid.infonu.nl/ziekten/15877-aandoeningen-gastro-enteritis-buikgriep.html>. [Geopend 25 Februari 2016].
- [7] Medicinfo, „De enterocyten (bekledende cellen van de dunne darm),” 23 Februari 2010. [Online]. Available: <http://www.medicinfo.nl/%7BDDDF1202-28A5-4B83-877C-8867E2078FD3%7D>. [Geopend 5 Mei 2016].
- [8] Gezondheid.be, „Voedselinfecties,” 3 November 2015. [Online]. Available: http://www.gezondheid.be/index.cfm?fuseaction=art&art_id=125. [Geopend 5 Mei 2016].
- [9] R. Bowen, „Pathophysiology of Diarrhea,” 27 Juli 2006. [Online]. Available: <http://arbl.cvmb.colostate.edu/hbooks/pathphys/digestion/smallgut/diarrhea.html>. [Geopend 19 Mei 2016].
- [10] R. Bowen, „Secretion in the Small Intestine,” 28 April 2006. [Online]. Available: <http://arbl.cvmb.colostate.edu/hbooks/pathphys/digestion/smallgut/secretion.html>. [Geopend 3 Juni 2016].
- [11] E. Rummens, „Hoe worden een voedselinfectie en -vergiftiging veroorzaakt?,” 2015. [Online]. Available: <https://www.cm.be/ziekte-en-behandeling/klachten-en-ziekten/voedselinfectie-en--vergiftiging/oorzaken.jsp>. [Geopend 13 Mei 2016].
- [12] R. M. Humphries en A. J. Linscott, „Laboratory Diagnosis of Bacterial Gastroenteritis,” *Clinical Microbiology Reviews*, vol. 28, pp. 3-31, 2015.

- [13] MLDS, „Clostridium difficile, infectie met,” [Online]. Available: <https://www.mlds.nl/ziekten/clostridium-difficile-infectie-met/#beschrijving>. [Geopend 5 Mei 2016].
- [14] Public Health Agency of Canada, „Clostridium difficile - Pathogen Safety Data Sheet,” December 2011. [Online]. Available: <http://www.phac-aspc.gc.ca/lab-bio/res/psds-ftss/msds36e-eng.php>. [Geopend 26 April 2016].
- [15] L. Boucher, M. Hild en L. Flannigan, „Clostridium difficile-associated disease,” [Online]. Available: https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Clostridium_difficile-associated_disease#Infectious_dose.2C_incubation.2C_and_colonization. [Geopend 26 April 2016].
- [16] De Merck Manual, „Salmonella-infecties,” Februari 2003. [Online]. Available: <http://merckmanual.nl/mmhenl/sec17/ch190/ch190q.html?qt=salmonella&alt=sh>. [Geopend 5 Mei 2016].
- [17] Public Health Agency of Canada, „Salmonella enterica spp.,” 2010. [Online]. Available: <http://www.phac-aspc.gc.ca/lab-bio/res/psds-ftss/salmonella-ent-eng.php>. [Geopend 13 Mei 2016].
- [18] Public Health Agency of Canada, „Shigella spp.,” September 2010. [Online]. Available: <http://www.phac-aspc.gc.ca/lab-bio/res/psds-ftss/shigella-eng.php>. [Geopend 13 Mei 2016].
- [19] Public Health Agency of Canada, „Campylobacter coli,” December 2011. [Online]. Available: <http://www.phac-aspc.gc.ca/lab-bio/res/psds-ftss/campylobacter-coli-eng.php>. [Geopend 23 April 2016].
- [20] Z. Zafar Khan, „Yersinia enterocolitica,” 20 Oktober 2015. [Online]. Available: <http://emedicine.medscape.com/article/232343-overview#a1>. [Geopend 13 Mei 2016].
- [21] Public Health Agency of Canada, „Yersinia Enterocolitic,” December 2011. [Online]. Available: <http://www.phac-aspc.gc.ca/lab-bio/res/psds-ftss/yersinia-enterocolitica-eng.php>. [Geopend 13 Mei 2016].
- [22] I. H. McHardy, M. Wu, R. Shimizu-Cohen, M. R. Couturier en R. M. Humphries, „Detection of Intestinal Protozoa in the Clinical Laboratory,” *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 52, pp. 712-720, March 2014.
- [23] LCI/Gr, „Giardiasis,” November 2008. [Online]. Available: <http://www.zorg-en-gezondheid.be/sites/default/files/atoms/files/16%20Giardiasis.pdf>. [Geopend 18 Maart 2016].
- [24] H. Nazer, „Giardiasis,” 15 Februari 2016. [Online]. Available: <http://emedicine.medscape.com/article/176718-overview#a4>. [Geopend 25 April 2016].
- [25] Giardia.nl, „Giardia tests en behandeling,” [Online]. Available: <http://www.giardia.nl/>. [Geopend 25 Februari 2016].

- [26] Safewater, „Detailed information for Cryptosporidium”.
- [27] M. M. Cabada, „Cryptosporidiosis,” 11 April 2016. [Online]. Available: <http://emedicine.medscape.com/article/215490-overview#a3>. [Geopend 25 April 2016].
- [28] Public Health Agency of Canada, „Cryptosporidium parvum - Pathogen Safety Data Sheet,” December 2011. [Online]. Available: <http://www.phac-aspc.gc.ca/lab-bio/res/psds-ftss/msds48e-eng.php>. [Geopend 25 April 2016].
- [29] „Cryptosporidium infectie,” Darmaandoening, 26 December 2013. [Online]. Available: <http://www.darmaandoening.nl/cryptosporidium-infectie/>. [Geopend 25 Februari 2016].
- [30] „Amoebiasis,” De Merck Manual, Februari 2003. [Online]. Available: <http://www.merckmanual.nl/mmhenl/sec17/ch196/ch196b.html>. [Geopend 2 Maart 2016].
- [31] Public Health Agency of Canada, „Entamoeba histolytica - Pathogen Safety Data Sheet,” December 2011. [Online]. Available: <http://www.phac-aspc.gc.ca/lab-bio/res/psds-ftss/msds58e-eng.php>. [Geopend 25 April 2016].
- [32] W. H. Shoff en P. H. Chandrasekar, „Cyclospora,” 5 Oktober 2015. [Online]. Available: <http://emedicine.medscape.com/article/236105-overview>. [Geopend 14 April 2016].
- [33] Public Health Agency of Canada, „Cyclospora spp. - Pathogen Safety Data Sheet,” December 2011. [Online]. Available: <http://www.phac-aspc.gc.ca/lab-bio/res/psds-ftss/cyclospora-eng.php>. [Geopend 25 April 2016].
- [34] M. Lontie, „Cyclospora cayetanensis: Coccidium en diarreeverwekker,” 2002.
- [35] „Parasites-Cyclosporiasis (Cylospora Infection),” 1 april 2016. [Online]. Available: <http://www.cdc.gov/parasites/cyclosporiasis/biology.html>. [Geopend 20 april 2016].
- [36] „Integrated DNA Technologies,” 2011. [Online]. Available: <https://www.idtdna.com/pages/docs/educational-resources/the-polymerase-chain-reaction.pdf?sfvrsn=4>. [Geopend 6 Oktober 2015].
- [37] „Learn Genetics,” University of Utah, 2015. [Online]. Available: <http://learn.genetics.utah.edu/content/labs/pcr/>. [Geopend 10 Oktober 2015].
- [38] LabCE, „Advantages of Real-Time PCR,” MediaLab, 2016. [Online]. Available: https://www.labce.com/spg448465_advantages_of_real_time_pcr.aspx. [Geopend 26 Maart 2016].
- [39] BioSistemika, „Real-Time PCR Tecnology Basics,” [Online]. Available: <http://biosistemika.com/workshops/qpcr-basics/>. [Geopend 20 Mei 2016].
- [40] BioSynthesis, „TaqMan® vs. SYBR® Green Chemistries,” [Online]. Available: <http://www.biosyn.com/tew/taqman-vs-sybr-green-chemistries.aspx>. [Geopend 20 Mei 2016].

- [41] Life technologies, „Real-time PCR handbook,” 2012. [Online]. Available: <http://www.genequantification.com/real-time-pcr-handbook-life-technologies-update-flr.pdf>. [Geopend 29 Maart 2016].
- [42] A. Porterfield, „What is a Ct value?,” 16 Juli 2015. [Online]. Available: <http://bitesizebio.com/24581/what-is-a-ct-value/>. [Geopend 12 Maart 2016].
- [43] PREMIER Biosoft, „Multiplex PCR,” 2016. [Online]. Available: http://www.premierbiosoft.com/tech_notes/multiplex-pcr.html. [Geopend 30 Maart 2016].
- [44] „Nested PCR,” [Online]. Available: http://www.clcsupport.com/clcgenomicsworkbench/650/Nested_PCR.html. [Geopend 30 Maart 2016].
- [45] Cold Spring Harbor Laboratory, „Biology Animation Library - Early DNA Sequencing,” [Online]. Available: <https://www.dnalc.org/resources/animations/sangerseq.html>. [Geopend 24 Maart 2016].
- [46] PREMIER Biosoft, „Mass Spectrometry,” 2016. [Online]. Available: http://www.premierbiosoft.com/tech_notes/mass-spectrometry.html. [Geopend 15 April 2016].
- [47] Qiagen, „QIASymphony DSP Virus/Pathogen Kit Instructions for Use (Handbook),” Hilden, GERMANY, 2015.
- [48] B. Bassam, „Introducing the Rotor-Gene 6000 real-time rotary analyzer,” 2003.
- [49] BioFire Diagnostics, „FilmArray Operator's Manual,” Juni 2014. [Online]. Available: ftp://ftp.bmgrp.at/Austria/BioFire-BCID-Lit/Manuals-Beipacktexte/RFIT-PRT-0057_FA%20IVD%20Instrum%20Info%20Doc_ENG.pdf. [Geopend 28 Maart 2016].
- [50] BioMérieux, „FilmArray GI Panel,” [Online]. Available: <http://www.biomerieux-diagnostics.com/video/2585/player>. [Geopend 8 Februari 2016].
- [51] K. Petersen, „Genetic Analysis Leaves the Lab,” Juni 2003. [Online]. Available: <http://archives.sensorsmag.com/articles/0603/37/main.shtml>. [Geopend 8 April 2016].
- [52] G. Kruppa, „The MALDI Biotyper,” Februari 2009. [Online]. Available: <https://www.pda.org/docs/default-source/website-document-library/chapters/presentations/southeast/microbial-identification-for-the-21st-century-the-maldi-biotyper.pdf?sfvrsn=6>. [Geopend 29 April 2016].
- [53] C. Indevuyt, „Identificatie van gisten met MALDI-TOF massaspectrometrie,” Leuven, 2012.
- [54] Applied Biosystems, „Applied Biosystems 3500/3500xL Genetic Analyzer User Guide,” Juni 2010. [Online]. Available: <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/4401661.pdf>. [Geopend 28 Maart 2016].
- [55] P. Van Lint, J. W. Rossen, S. Vermeiren, K. Ver Elst, S. Weekx, J. Van Schaeren en A. Jeurissen, „Detection of Giardia lamblia, Cryptosporidium Spp. and Entamoeba histolytica in clinical

stool sample by using Multiplex Real-Time PCR after automated DNA isolation," *Acta Clinica Belgica*, vol. 3, nr. 68, p. 5, 2013.

- [56] R. A. Guy, P. Payment, U. J. Krull en P. A. Horgen, „Real-Time PCR for Quantification of *Giardia* and *Cryptosporidium* in Environmental Water Samples and Sewage,” vol. 69, pp. 5178-5185, 23 June 2003.
- [57] J. J. Verweij, R. A. Blangé, K. Templeton, J. Schinkel, E. A. T. Brienen, M. A. A. van Rooyen, L. van Lieshout en A. M. Polderman, „Simultaneous Detection of *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia*, and *Cryptosporidium parvum* in Fecal Samples by Using Multiplex Real-Time PCR,” *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 42, pp. 1220-1223, 28 November 2003.
- [58] M. Niebel, K. M. Bourzac, B. Jones en C. L. Alexander, „Evaluation of the FilmArray Gastrointestinal Panel to Detect *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium* Species,” Salt Lake City.
- [59] A. Vezeteu, „Detectie van feces pathogenen via real-time PCR,” Genk, 2015.
- [60] Food and Drug Administration, „510(k) Substantial Equivalence Determination Decision Summary,” [Online]. Available: http://www.accessdata.fda.gov/cdrh_docs/reviews/K110203.pdf. [Geopend 26 April 2016].
- [61] R. Khare, M. J. Espy, E. Cebelinski, D. Boxrud, L. M. Sloan, S. A. Cunningham, B. S. Pritt, R. Patel en M. J. Binnicker, „Comparative Evaluation of Two Commercial Multiplex Panels for Detection of Gastrointestinal Pathogens by Use of Clinical Stool Specimens,” *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 52, nr. 10, pp. 3667-3673, 29 Juli 2014.
- [62] R. Gautam, F. Lyde, M. Esona, O. Quaye en M. Bowen, „Comparison of Premier Rotaclone, Prospect, and RIDASCREEN rotavirus enzyme immunoassay kits for detection of rotavirus antigen in stool specimens,” *J Clin Virol*, vol. 58, nr. 1, pp. 292-294, 2013.
- [63] W. P.F.G., C. Bruggeman, G. van Well en I. van Loo, „Replacing traditional diagnostics of fecal viral pathogens by a comprehensive panel of real-time PCRs,” *J Clin Microbiol*, vol. 49, nr. 5, pp. 1926-1931, 2011.

Figurenlijst

Figuur 1: Norovirus onder elektronenmicroscop	11
Figuur 2: Darmvlok met crypt	12
Figuur 3: Secretie van NaCl in crypten	12
Figuur 4: <i>Salmonella typhi</i> bacterie	13
Figuur 5: <i>Giardia lamblia</i> parasiet	15
Figuur 6: Trofozoiet van <i>Cryptosporidium parvum</i> op het oppervlak van intestinale epitheelcellen	16
Figuur 7: <i>Entamoeba histolytica</i> trofozoiet	17
Figuur 8: Verschil ongesporuleerde en gesporuleerde oöcyten <i>Cyclospora cayetanensis</i>	18
Figuur 9: PCR amplificatie	19
Figuur 10: Amplificatie curve	20
Figuur 11: Resultaat van een real-time PCR reactie	21
Figuur 12: Verschil dNTP met ddNTP	23
Figuur 13: Principe terminatiereactie bij cycle sequencing	24
Figuur 14: Werkingsprincipe QIASymphony	26
Figuur 15: Overzicht van een dwarsdoorsnede van de roterende optica in de Rotor-Gene 6000	27
Figuur 16: De FilmArray Pouch	28
Figuur 17: Voorbeelden smeltcurves en smeltpieken	29
Figuur 18: Samenstelling cartridge GeneXpert	30
Figuur 19: Proefopzet van de optimalisatie en validatie van de in-house real-time PCR	32
Figuur 20: Proefopzet validatie van commerciële nested PCR	33
Figuur 21: Proefopzet validatie commerciële real-time PCR	33
Figuur 22: Grafiek staalbewaring <i>Cryptosporidium</i>	57
Figuur 23: Grafiek staalbewaring <i>Entamoeba histolytica</i>	58
Figuur 24: Grafiek staalbewaring <i>Giardia lamblia</i>	58
Figuur 25: Vergelijking detectielimieten parasieten	61
Figuur 26: Verhouding hoeveelheid co-infecties t.o.v. type parasiet	66
Figuur 27: Co-infecties bij methodevergelijking parasieten	66
Figuur 28: Negatieve stalen voor <i>G. lamblia</i> volgens lichtmicroscopie	68
Figuur 29: Vergelijking infectieuze dosis met detectielimiet bacteriën	72
Figuur 30: Co-infecties per type bacterie	75
Figuur 31: Co-infecties bij methodevergelijking bacteriën	75
Figuur 32: Percentage alle co-infecties	76
Figuur 33: Overzicht verhouding geslaagde/gefaalde testen	76

Tabellenlijst

Tabel 1: Types bacteriële gastro-enteritis [12]	13
Tabel 2: Overzicht gebruikte apparatuur	34
Tabel 3: Overzicht gebruikt glaswerk en disposables	34
Tabel 4: Overzicht gebruikte stoffen.....	35
Tabel 5: Overzicht stalen met oorsprong en identificatie.....	36
Tabel 6: Samenstelling interne controle per staal	37
Tabel 7: Overzicht gebruikte apparatuur	38
Tabel 8: Overzicht gebruikt glaswerk en disposables	39
Tabel 9: Overzicht gebruikte stoffen.....	39
Tabel 10: Overzicht primer en probes.....	40
Tabel 11: Geoptimaliseerde mastermix	42
Tabel 12: Geoptimaliseerd temperatuursprofiel	43
Tabel 13: Eindconcentraties van verschillende soorten mastermixen	43
Tabel 14: Spiken van sterk en zwak positieve controles.....	46
Tabel 15: Overzicht gebruikte apparatuur	46
Tabel 16: Overzicht gebruikt glaswerk en disposables	47
Tabel 17: Overzicht gebruikte oplossingen	47
Tabel 18: Gebruikte bacteriestammen voor kweek.....	48
Tabel 19: Samenstelling sterk positieve pool.....	50
Tabel 20: Samenstelling zwak positieve pool.....	50
Tabel 21: Werkwijze bij discordante stalen	51
Tabel 22: Overzicht gebruikte apparatuur	52
Tabel 23: Overzicht gebruikt glaswerk en disposables	52
Tabel 24: Overzicht gebruikte oplossingen	53
Tabel 25: Optimalisatie eindconcentratie <i>Giardia lamblia</i> in mastermix	54
Tabel 26: Resultaat real-time PCR: Detectielimiet op matrix	55
Tabel 27: Resultaat real-time PCR: Detectielimiet ½ verdunningsreeks.....	55
Tabel 28: Resultaat real-time PCR: Detectielimiet 10 ³ en ½ verdunning.....	56
Tabel 29: Ct-waardes staalbewaring <i>Cryptosporidium</i>	56
Tabel 30: Ct-waardes staalbewaring <i>Entamoeba histolytica</i>	57
Tabel 31: Ct-waardes staalbewaring <i>Giardia lamblia</i>	57
Tabel 32: Verificatie detectielimiet parasieten.....	59
Tabel 33: Vergelijking detectielimiet parasieten	60
Tabel 34: Reproduceerbaarheid/staalbewaring bacteriën en parasieten.....	62
Tabel 35: Invloed van inhibitoren	63
Tabel 36: Methodevergelijking van positieve parasieten stalen via microscopie	64
Tabel 37: Sequencing primers <i>Entamoeba</i>	67
Tabel 38: Methodevergelijking van negatieve stalen via microscopie	67
Tabel 39: Sequencing primers <i>Giardia lamblia</i>	67
Tabel 40: Specificiteit	69
Tabel 41: Menginfecties van bacteriën en parasieten.....	70
Tabel 42: Detectielimiet van de bacteriën volgens bijsluiter	71
Tabel 43: Verificatie detectielimiet enterobacteriën.....	71
Tabel 44: Methodevergelijking met de gekweekte kweek van bacteriën	73
Tabel 45: Vergelijking sensitiviteit en specificiteit van GI panel en In-house PCR.....	74
Tabel 46: Ct-waardes interrun/staalbewaring <i>C. difficile</i>	77

Tabel 47: Eerste Ct-waardes bij bepaling detectielimiet	77
Tabel 48: Ct-waarde detectielimiet <i>C. difficile</i>	78
Tabel 49: Kostprijs één test verschillende algoritmen	78

Bijlage

Toestel	BioFire FilmArray
Disposables	FecalSwab met Cary Blair medium GI panel kit

Prijs	Aantal	Afschrijfbedrag per jaar op basis van 5 jaar
€ 39 500,00	1	€ 7 900,00
Aankoopprijs	Aantallen bij aankoop	Prijs per stuk
€ 64,80	50	€ 1,30
€ 3 150,00	30	€ 105,00
Kosten per test		€ 106,30
Kostprijs laborant per uur		€ 40,8
Hand on time per staal		5 minuten
Totale prijs per test		€ 109,70

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O
2	Enteropathogenen			Prijs	Aantal	Korting	Prijs/stuk								
3	Disposables	Entlussen van 10 µL		€ 24,69	960		€ 0,026								
4		Steriele wisser		€ 65,57	1000		€ 0,066								
5		Steriel plastieken pipet		€ 30,33	500		€ 0,061								
6															
7	Kweekmedia	MacConkey agar (McC)		€ 29,07	100		€ 0,291								
8		XyloseLysineDesoxycholaat agar (XLD)		€ 9,88	20		€ 0,494								
9		Yersiniaplaat (YER)		€ 10,49	20		€ 0,525								
10		Brilliant Green Agar (BGA)		€ 4,06	10		€ 0,406								
11		Rappaport <i>Salmonella</i> aanrijkingsbodem		€ 37,33	50	36,65%	€ 0,473								
12		Seleniet aanrijkingsbodem		€ 40,08	50	26,22%	€ 0,591								
13		Campylobacterplaat		€ 14,60	20		€ 0,730								
14		Sorbitol MacConkey agar (SMAC) wordt niet altijd gebruikt		€ 6,73	10		€ 0,673								
15		Triple Sugar Iron (TSI) wordt niet altijd gebruikt		€ 113,18	500		€ 0,094								
16		Mobiliteit-Indol-Urease (MIU) wordt niet altijd gebruikt					€ 0,058								
17		Urea broth base		€ 67,94	500		€ 0,006	5,4	600	5	120	92,592593	11111,1		
18		Tryptone		€ 73,80	500	1,26%	€ 0,015	12	600	5	120	41,666667	5000		
19		Agar		€ 132,15	500	1,27%	€ 0,004	1,8	600	5	120	277,77778	33333,3		
20		Urease		€ 42,53	10	5,73%	€ 0,033	1	600	5	120	10	1200		
21															
22					Gemiddeld per test		€ 0,585								
23					Tijd per test (hands-on time)	37 minuten	0,61666667	uur							
24					Kostprijs laborant per uur		€ 40,8								
25					Totale prijs 1 test		€ 25,745								
26	Parasieten														
27															
28		- De kit Parasep		€ 93,33	40		€ 2,333								
29		"-Iugol													
30		jodiumkristallen									Prijs per test	€ 2,901	(zonder sneltest)		
31		kaliumjodide										€ 15,24	(met sneltest)		

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
26		Parasieten									
27											
28		- De kit Parasep		€ 93,33	40		€ 2,333				
29		-Iugol									
30		jodiumkristallen							Prijs per test	€ 2,901	(zonder sneltest)
31		kaliumjodide								€ 15,24	(met sneltest)
32									Gemiddeld	€ 9,071	
33									Tijd per test (hands-on time)	20 minuten	
34											
35		- De kit TB-Color (Merck)		€ 142,00	250		€ 0,568		Totale prijs 1 test	€ 22,671	
36											
37		-Giardia sneltest (enkel bij vermoeden)		€ 152,40	25		€ 6,096				
38		-Crypto sneltest (enkel bij vermoeden)		€ 83,55	25		€ 3,342				
39											
40											
41		Andere (enkel op aanvraag)							Handson-timeTijd in minuten		
42		Rota-adenovirus kit		56	20		€ 2,800			2	
43		Clostridium:					€ 23,653				
44		GDH kit		100	25		€ 4,000	GDH -		10	
45		Clostridium plaat		17,99	20		€ 0,900				
46		PCR Tox		336	10		€ 33,600	GDH +			
47		swab voor pcr		40	120		€ 0,333			25	
48		tox a+B		100	25		€ 4,000				
49		Benzidine (5 min)		40	84,64		€ 0,473			5	
50									Gemiddelde tijd per test	8 minuten	
51		Samenvatting	Prijs één test						Gemiddeld prijs per test	€ 8,975	
52		Enteropathogenen	€	25,745					Kostprijs laborant per uur	€ 40,8	
53		Parasieten	€	22,671					Totale prijs 1 test	€ 14,415	
54		Op aanvraag	€	14,415							
55		FilmArray	€	109,70							
56											

