



WETENSCHAPPELIJK INSTITUUT
VOLKSGEZONDHEID
INSTITUT SCIENTIFIQUE
DE SANTÉ PUBLIQUE



**EXPERTISE, DIENSTVERLENING EN KLANTENRELATIES
KWALITEIT VAN MEDISCHE LABORATORIA**

**COMMISSIE VOOR KLINISCHE BIOLOGIE
COMITE VAN EXPERTEN**

**EXTERNE KWALITEITSEVALUATIE VOOR
ANALYSEN KLINISCHE BIOLOGIE**

DEFINITIEF GLOBAAL RAPPORT MALDI-TOF 2017

WIV/Microbiologie/112

Expertise, dienstverlening en klantenrelaties
Kwaliteit van medische laboratoria
J. Wytsmanstraat, 14
1050 Brussel | België

www.wiv-isp.be



EXPERTENCOMITE

WIV					
Pannis Martine	Secretariaat	TEL:	02/642.55.22	FAX:	02/642.56.45
Dr. VERNELEN Kris	Enquêtecöördinator	TEL:	02/642.55.299		
		e-mail:	kris.vernelen@wiv-isp.be		
Dr. CHINA Bernard	Vervanger enquêtecöördinator	TEL:	02/642.53.85		
		e-mail:	bernard.china@wiv-isp.be		
Experten	Instelling				
Dr. BERTH Mario	AML Antwerpen	TEL:	03/30.30.809	FAX:	03/30.30.882
		e-mail:	mario.berth@aml-lab.be		
Pharm. BOEL An	OLVZ Aalst	TEL:	053/72.47.85	FAX:	053/72.45.88
		e-mail:	an.boel@olvz-aalst.be		
Dr. BOELENIS Jerina	UZ Gent	TEL:	093/32.19.69	FAX:	093/32.36.40
		e-mail:	jerina.boelens@uzgent.be		
Dr. BOERAS Anca	Clinique St Joseph Liège	TEL:	042/24.83.58	FAX:	042/24.84.73
		e-mail:	anca.boeras@chc.be		
Dr. CLAEYS Geert	UZ Gent	TEL:	09/332.36.45	FAX:	09/332.49.85
		e-mail:	geert.claeys@ugent.be		
Dr. DE BEENHOUWER Hans	OLVZ Aalst	TEL:	053/72.42.72	FAX:	053/72.45.88
		e-mail:	hans.de.beenhouwer@olvz-aalst.be		
Dr. DE GHELDRE Yves	CHIREC Bruxelles	TEL:	02/340.41.34	FAX:	02/340.41.79
		e-mail:	yves.degheldre@chirec.be		
Dr. DELFORGE Marie-Luce	ULB Erasme Bruxelles	TEL:	02/555.34.53	FAX:	02/555.64.59
		e-mail:	marie-luce.delforge@erasme.ulb.ac.be		
Dr. MAGERMAN Koen	Jessa Ziekenhuis Hasselt	TEL:	011/30.97.40	FAX:	011/30.97.50
		e-mail:	koen.magerman@jessazh.be		
Dr. PADALCO Elizaveta	UZ Gent	TEL:	09/332.21.08	FAX:	09/332.49.85
		e-mail:	elizaveta.padalko@uzgent.be		
Dr. REYNDERS Marijke	AZ Sint Jan Brugge	TEL:	050/45.26.03	FAX:	050/45.26.19
		e-mail:	marijke.reynders@azsintjan.be		
Dr. SAEGEMAN Veroniek	UZ Leuven	TEL:	016/34.24.23	FAX:	016/34.70.10
		e-mail:	veroniek.saegeman@uzleuven.be		
Dr. VAN ACKER Jos	AZ ST Lucas Gent	TEL:	09/224.64.45	FAX:	09/224.64.46
		e-mail:	jos.vanacker@azstlucas.be		
Dr. VERROKEN Alexia	Cliniques Saint-Luc Bruxelles	TEL:	02/764.67.32	FAX:	02/764.69.33
		e-mail:	alexia.verroken@uclouvain.be		
Pharm. VIJGEN Sara	Jessa Ziekenhuis Hasselt	TEL:	011/33.82.22	FAX:	011/33.82.08
		e-mail:	sara.vijgen@jessazh.be		

Een voorlopige versie van dit rapport werd voorgelegd aan de experten op : 24/11/2017

Dit rapport werd besproken op de expertvergadering van 01/12/2017

Autorisatie verspreiding rapport:

Door Kris Vernelen, op 12/12/2017.

Handtekening van de enquêtecöördinator

A handwritten signature in blue ink, appearing to be 'Kris Vernelen', written over a light grey rectangular background.

Alle rapporten zijn tevens te raadplegen op onze website:

https://www.wiv-isp.be/QML/activities/external_quality/rapports/ nl/rapports_ annee.htm

Inhoudstafel

I. De Stalen	5
II. De resultaten.....	6
M/7438: <i>Rhodococcus equi</i>	6
Uiteindelijk resultaat.....	7
Technische resultaten bekomen met het apparaat van Bruker.....	8
Technische resultaten bekomen met het apparaat van bioMérieux.....	10
Commentaar M/7438 <i>Rhodococcus equi</i>	11
M/14598: <i>Salmonella</i> Chester	14
Uiteindelijk resultaat.....	15
Technische resultaten bekomen met het apparaat van Bruker.....	16
Technische resultaten bekomen met het apparaat van bioMérieux.....	20
Commentaar M/14598 <i>Salmonella</i> Chester	20
M/14854: <i>Listeria monocytogenes</i>	23
Uiteindelijk resultaat.....	23
Technische resultaten bekomen met het apparaat van Bruker.....	24
Technische resultaten bekomen met het apparaat van bioMérieux.....	27
Commentaar M/14854 <i>Listeria monocytogenes</i>	28
M/15149: <i>Shewanella</i> species	31
Uiteindelijk resultaat.....	31
Technische resultaten bekomen met het apparaat van Bruker.....	32
Technische resultaten bekomen met het apparaat van bioMérieux.....	35
Commentaar M/15149 <i>Shewanella algae</i>	35
M/15165: <i>Streptococcus dysgalactiae</i>	38
Uiteindelijk resultaat.....	38
Technische resultaten bekomen met het apparaat van Bruker.....	39
Technische resultaten bekomen met het apparaat van bioMérieux.....	41
Commentaar M/15165 <i>Streptococcus dysgalactiae</i>	41

I. De Stalen

Er werden 5 gelyofiliseerde stalen verstuurd. De stalen moesten gereconstitueerd worden met 0.5 ml AD en op de geschikte cultuurbodems geënt worden. Nadien diende de identificatie uitgevoerd te worden met Maldi-tof.

De informatie betreffende de stammen omschreef de afnameplaats:

M/7438: hemocultuur

M/14598: stoelgang

M/14854: hemocultuur

M/15149: stoelgang

M/15165: hemocultuur

De interpretatie van de antwoorden diende te gebeuren in functie van de afnameplaats. Voor het antwoord werd eerst gevraagd de producent, het type software en het type van extractie te antwoorden; vervolgens werden een aantal gegevens in functie van het gebruikte apparaat gevraagd. Voor de bioMérieux-gebruikers het bekomen resultaat. Voor de Bruker-gebruikers: de 1^e 3 resultaten met de overeenkomstige scores en de “consistence with score”.

Uiteindelijk moesten de laboratoria antwoorden of ze dit resultaat in routine zouden doorgegeven en, in geval van een positief antwoord op deze vraag, welke de uiteindelijke identificatie was. De slotvraag was of het laboratorium bijkomende testen zou uitvoeren voor de verdere identificatie, ter confirmatie,... **De bedoeling was echter niet om deze bijkomende testen uit te voeren: de uiteindelijke identificatie diende dus enkel op het resultaat van de Maldi-tof gebaseerd te zijn; het kon dan ook mogelijk of zelfs waarschijnlijk zijn dat een laboratorium antwoordde in routine het resultaat van het toestel niet door te geven.**

De verstuurde kiemen waren:

M/7438: *Rhodococcus equi*

M/14598: *Salmonella* Chester

M/14854: *Listeria monocytogenes*

M/15149: *Shewanella algae*

M/15165: *Streptococcus dysgalactiae*

II. De resultaten

Er hebben in totaal 81 laboratoria deelgenomen aan deze enquête: 80 klinische laboratoria en 1 firmalaboratorium; dit laatste werd niet in de verwerking opgenomen. Niet alle labo's hebben echter resultaten doorgegeven voor alle stalen.

Een aantal laboratoria hebben de bijkomende testen toch uitgevoerd voor bepaalde stalen en ermee rekening gehouden voor het "definitieve routine-antwoord": sommige antwoorden zijn daarom gebiased.

M/7438: Rhodococcus equi

Aantal deelnemers: 77 (drie laboratoria vermeldden geen Maldi-tof te gebruiken voor dit (type) staal)

Bruker: N = 59

Software: IVD: 38
RUO: 9
IVD + RUO: 2
IVD + RUO + bioterrorisme + schimmels + mycobacteriën: 1
IVD + bioterrorisme + schimmels + mycobacteriën + eigen basis: 1
RUO + bioterrorisme: 6
RUO + bioterrorisme+ schimmels + mycobacteriën: 1
RUO + schimmels + mycobacteriën + eigen basis: 1

Extractie: Geen: 26
Mierenzuur: 22
Volledig: 6
Geen + mierenzuur: 4
Geen + volledig: 1

bioMérieux N = 18

Software: IVD: 17
Myla: 1

Extractie: Geen: 13
Mierenzuur: 3
Volledig: 1
Vitek MS-CHCA: 1

Uiteindelijk resultaat (in routine geantwoord)

Bruker

Niet geantwoord in routine: N = 1

Wel geantwoord in routine: N = 58

Verstreckte antwoorden:

Antwoord	N labo's
Rhodococcus equi	54
Rhodococcus species	2
Totaal	56

bioMérieux

Niet geantwoord in routine: N = 5

Wel geantwoord in routine: N = 13

Verstreckte antwoorden:

Antwoord	N labo's
<i>Rhodococcus equi</i>	10
<i>Rhodococcus hoagii</i>	1
<i>Gemella morbillorum</i>	1
<i>Haemophilus haemolyticus</i>	1
Totaal	13

Technische resultaten bekomen met het apparaat van Bruker

We stelden geen verschillen vast in de gebruikte versies van de IVD en RUO software: de verschillende antwoorden werden bekomen door laboratoria met verschillende software versies.

Laboratoria die in routine geen antwoord zouden verstrekken (N = 3)

1^e resultaat: *R. equi* N = 3

Score: mediaan: 2.095; min: 2.049; max: 2.209

2^e resultaat: *R. equi* N = 3

Score: mediaan: 2.037; min: 2.011; max: 2.057

3^e resultaat: *R. equi* N = 3

Score: mediaan: 2.021; min: 2.020; max: 1.968

Consistence with score: A: 3

Eén laboratorium raadde bijkomende testen aan: Gramkleuring, pigmentcontrole, katalase, Api coryne en CAMP test met *S. aureus*.

Laboratoria die in routine *R. equi* zouden antwoorden (N = 54)

1^e resultaat: *R. equi* N = 54

Score: mediaan: 2.150; min: 1.765; max: 2.420

2^e resultaat: *R. equi* N = 54

Score: mediaan: 2.088; min: 1.728; max: 2.330

3^e resultaat: *R. equi* N = 54

Score: mediaan: 1.990; min: 1.181; max: 2.260

Consistence with score: A: 45

B: 8

C: 1

Labo's die bijkomende testen aanraden: N = 14

Welke testen

<i>Test</i>	<i>N labo's</i>
Gramkleuring	2
Gramkleuring + katalase	4
Gramkleuring + katalase + oxidase + nitraat + 16S sequencing	1
Gramkleuring + katalase + oxidase + CAMP-test + H2S + afwezigheid van hemolyse + doorsturen naar referentielabo	1
Gramkleuring + genetische identificatie	1
Gramkleuring (op oude en jonge culturen) + katalase + Ziehl-Neelsen + ureum + bepaling vancomycine-gevoeligheid	1
Gramkleuring + kweek op specifieke bodems + AB-gevoeligheid + 16S sequencing + PCR	1
API coryne	1
16S sequencing	1
<i>Totaal</i>	<i>14</i>

Laboratoria die in routine *Rhodococcus* species zouden antwoorden (N = 2)

1^e resultaat: *R. equi* N = 2

Scores: 1.958, 1. 930

2^e resultaat: *R. equi* N = 2

Scores: 1.830, 1.840

3^e resultaat: *R. equi* N = 2

Scores: 1.692, 1.840

Consistence with score: B: 2

Geen van beide laboratoria zouden in routine bijkomende testen uitvoeren

Technische resultaten bekomen met het apparaat van bioMérieux

Laboratoria die in routine geen antwoord zouden verstrekken (N =5)

Resultaat: *R. equi* N = 2
S. anginosus N = 1
N. asteroides N = 1
Nocardia species N = 1

Welke testen

Antwoord op protocol: Grampositieve kokken, vermoedelijk *Rhodococcus* spp., identificatie wordt gecontroleerd. Stam wordt doorgestuurd naar extern labo. (Malditof Bruker, Phoenix en 16S sequencing indien nodig) Vitek kaart: Geen identificatie Gram: Gram positieve kokken Stringtest: Negatief In routine wordt de stam verstuurd voor 16S sequencing.
(ID Malditof bioMérieux = *R. equi*)

Betrouwbaarheidsscore slechts 28% => Andere methode te gebruiken voor identificatie (Vitek ID kaart)
(ID Malditof bioMérieux = *S. anginosus*)

Gram variabele cocco-bacil kaart Gn Vitek 2: *Brucella melitensis* op Malditoff identificatie is niet betrouwbaar want 4 verschillende identificaties (*Nocardia*, *Rhodococcus*, *Eggerthelia*, *Prevotella*). Doorstuur naar ander laboratorium voor identificatie
(ID Malditof bioMérieux = *N. asteroides*)

Resultaat Vitek MS: *Nocardia nova* 50%/ *Nocardia africana* 50%; doch gezien deze identificatie discordant is met de gramkleuring, zouden wij deze stam in routine doorsturen voor identificatie naar UZ Brussel
(ID Malditof bioMérieux = *Nocardia species*)

Laboratoria die in routine *R. equi* zouden antwoorden (N = 10)

Resultaat: *R. equi* N = 10

Labo's die bijkomende testen aanraden: N = 3

Welke testen

Test	N labo's
Gramkleuring	2
16S sequencing	1
Totaal	3

Het laboratorium dat in routine *Rhodococcus hoagii* zou antwoorden (N = 1)

Resultaat: *R. hoagii*

Het laboratorium zou in routine geen bijkomende testen uitvoeren

Het laboratorium dat in routine *Gemella morbillorum* zou antwoorden (N = 1)

Resultaat: *N. gonorrhoeae*

Bijkomende testen: Gram en oxydase want MS gaf 58% *N. gonorrhoeae* en 42% *Gemella morbillorum*.

Het laboratorium dat in routine *Haemophilus haemolyticus* zou antwoorden (N = 1)

Resultaat: *Haemophilus haemolyticus*

Het laboratorium zou in routine geen bijkomende testen uitvoeren

Commentaar M/7438 *Rhodococcus equi*.

Rhodococcus equi (Goodfellow and Alderson 1977), ***Corynebacterium equi*** (Magnusson 1923), ***Corynebacterium hoagii*** (Morse 1912 Ebersson 1918) en ***Nocardia restricta*** (Turfitt 1944, McClung 1974) duiden dezelfde bacteriële species aan. Uit een polyfasische taxonomische analyse in 2014 bleek dat ***Rhodococcus equi*** samen met ***Corynebacterium hoagii*** één enkele species vormt: ***Rhodococcus hoagii*** (1). Het voorstel om ***Rhodococcus equi*** toe te kennen aan het genus ***Prescotella*** (2,3) werd niet weerhouden (4).

De kiem werd in 1923 geïdentificeerd als pathogeen bij paarden (5) en is in de diergeneeskunde gekend als verwekker van pneumonie bij veulens; hij werd nadien geïsoleerd bij andere dieren: runderen, varkens, schapen, geiten, beren, herten, zeehonden, honden en katten. Uitwerpselen en mest vormen het voornaamste reservoir van ***Rhodococcus equi***; de frequentste manier van besmetting gebeurt via inhalatie. (6)

De eerste humane infectie werd gerapporteerd in 1967(7). Er werd een opstoot vastgesteld in de jaren 1980 die samenviel met het begin van de HIV-pandemie.(8)

Rhodococcus equi is een facultatief intracellulaire pathogeen die de macrofagen besmet en kan overleven in de lysosomen. Meer dan 85% van de gevallen komen voor bij patiënten met een deficiëntie van de cellulaire immuniteit, in het bijzonder bij HIV-patiënten.(8)

80% van de humane infecties zijn pulmonair. In 50% van deze gevallen zijn enkel de hemoculturen positief. De isolatie van een ***Rhodococcus equi*** uit de hemoculturen moet aangegeven worden! Verschillende extra pulmonaire lokalisaties werden

beschreven: cerebrale abscessen, wondinfecties, artritis, endoftalmie, peritonitis, mesenterische adenitis, osteomyelitis, otitis media met mastoïditis.

Behorend tot de "aerobe" Actinomyceten die onder andere ***Nocardia***, ***Gordonia***, ***Actinomadura***, ***Streptomyces*** en ***Tsukamurella*** omvatten, is ***Rhodococcus equi*** een Gram positieve bacterie, met een morfologie die varieert in functie van de incubatietijd en de aard van de gebruikte bodem: bacillair voor jonge kolonies of bij kweek in vloeibaar milieu, coccoïd bij veroudering. Dit kenmerk is gemeenschappelijk voor alle ***Rhodococcus*** species. Het gedeeltelijke zuurvaste karakter bij gebruik van de Kinjoun techniek (koude Ziehl-Neelsen), dat te wijten is aan het feit dat de celwand mycolzuur en tuberculostearic zuur bevat, kan leiden tot verwarring met ***Nocardia***, ***Gordonia***, ***Dietzia***, ***Segniliparus***, ***Tsukamurella*** en ***Williamsia***.

De kolonies zijn slijmerig en zalmkleurig (het pigment verschijnt laattijdig na 2-3 dagen).

Het macroscopisch en microscopisch aspect laat niet toe de kiem te onderscheiden van corynebacteriën (de bacillaire vorm) of microkokken (de coccoïde vorm), wat het risico inhoudt dat ze als een contaminant beschouwd worden.

Rhodococcus equi bezit de volgende eigenschappen : strikt aerob, catalase positief, onbeweeglijk, niet sporulerend, longitudinale splitsing (palissaden), geen luchtmycelium.

De CAMP factor is positief met ***Staphylococcus aureus*** en ***Listeria ivanovii***.

De moleculaire referentie identificatiemethode van ***Rhodococcus equi*** (met inbegrip van de klinische stalen) is amplificatie van een fragment van het choE gen dat codeert voor een cholesterol-oxidase. (9)

Er zijn weinig gegevens over identificatie via MALDI-TOF MS in de literatuur. **Alegría Puig et al** kwamen tot het besluit dat de Biotyper (Bruker) 131 (85.1%) van de 154 isolaten van ***Rhodococcus equi*** geïdentificeerd heeft tot op speciesniveau. Het correcte identificatiepercentage bedroeg 98,7% als de cut-off van de score ≥ 2.000 naar de score ≥ 1.750 gaat. Vitek MS (bioMérieux) identificeerde het species correct voor 130 isolaten (84,4%) na extractie met ethanol , maar slechts 35 (22,7%) isolaten, indien de identificatie rechtstreeks vanaf de kolonies uitgevoerd wordt. (10)

In onze enquête, hebben 100% van de 59 laboratoria die de Mald- Biotyper (Bruker) gebruiken de kiem correct geïdentificeerd tot op speciesniveau. Slechts 13 van de 18 laboratoria (72,22%) die de Vitek-MS gebruiken, hebben de kiem correct geïdentificeerd tot op speciesniveau. De extractie blijkt de resultaten van de Mald- Biotyper (Brüker) niet te beïnvloeden; de gebruikers van de Vitek-MS daarentegen verbeteren hun resultaat door gebruik te maken van een extractie.

We moeten ook opmerken dat er geen update van beide databases plaats gevonden heeft. ***Rhodococcus hoagii*** is er niet in opgenomen.

A. Boeras, Clinique St-Joseph, Liège

Referenties

Kämpfer,P.,Dott,W.,Martin,K.,Glaeser,S.P.2014 *Rhodococcus defluvii* sp. nov., isolated from wastewater of a bioreactor and formal proposal to reclassify [*Corynebacterium hoagii*] and *Rhodococcus equi* as *Rhodococcus hoagii* comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 2014 Mar;**64** (pt3):755-61.

Jones,A.L.,Sutcliffe,I.C.,Goodfellow,M.2013 *Prescottia equi* gen. nov.;comb. nov : a newhome for an old pathogen .*Antonie van Leeuwenhoek* 2013 Mar;**103**(3):655-71.

Jones,A.L.,Sutcliffe, I.C.,Goodfellow,M.2013 Proposal to replace the illegitimate genus name *Prescottia* et al. 2013 with the genus name *Prescotella* gen. nov. and to replace the illegitimate combination *Prescottia equi* Jones et al. 2013 with *Prescotella equi* comb. nov *Antonie van Leeuwenhoek* 2013 Jun;**103**(6):1405-7.

Conville,P.S., Wittersby,F.G. *Nocardia, Rhodococcus, Gordonia, Actinomadura, Streptomyces, and Other Aerobic Actinomycetes Manual of Clinical Microbiology 11 edition 2015* Washington DC Press

Magnusson,H. 1923.Spezifische infektiöse Pneumonie beim Fohlen. Ein Neuer Eitererreger beim Pferd. *Arch. Wiss. Prakt.Tierheilkd.* **50**:22-37.

Prescott,J.F. 1991 : *Rhodococcus equi* : an animal and human pathogen . *Clin. Microbiol.Rev.***4**: 20-34

Meyer,D.K.,Reboli, A.C.Other Coryneform Bacteria and Rhodococci *Mandell, Douglass and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases-seventh edition 2010*, Churchill Livingstone Elsevier

Sonnet,J., Wauters,G., Zech,F.,Gigi, J.1987 Opportunistic *Rhodococcus equi* infection in an African AIDS case (1976-1981) *Acta Clin Belg* **42**: 215-216

Ladrón N., Fernández M., Agüero J., González Zörn B., Vázquez-Boland J. A., Navas J. 2003. Rapid identification of *Rhodococcus equi* by a PCR assay targeting the *choE* gene. *J. Clin. Microbiol.* **41**: 3241–3245.

Alegría Puig ,C.R., Pilares, L., Marco, F., Vila, J., Martínez-Martínez, L., Navas, J. 2017 Comparison of the Vitek MS and Bruker Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry Systems for Identification of *Rhodococcus equi* and *Dietzia* spp. *J Clin Microbiol.* 2017 Jul;**55**(7):2255-2260.

M/14598: Salmonella Chester

Aantal deelnemers: 80

Bruker: N = 59

Software: IVD: 40
RUO: 9
IVD + RUO: 2
IVD + bioterrorisme + schimmels + mycobacteriën + eigen basis: 1
RUO + bioterrorisme: 6
RUO + schimmels + mycobacteriën + eigen basis: 1

Extractie: Geen: 52
Mierenzuur: 5
Geen + mierenzuur: 2

bioMérieux N = 21

Software: IVD: 19
Myla: 1
Saramis version 3.2: 1

Extractie: Geen: 18
Volledig: 2
Vitek MS-CHCA: 1

Nota: U kan voor Salmonella een aantal species terugvinden in de aflopende lijst in de toolkit (*S. arizonae*, *S. bongori*, *S. choleraesuis*, *S. enterica*, *S. enteritidis*, *S. paratyphi*, *S. subterranea*, *S. typhi*, *S. typhimurium*). Voor de andere Salmonella kiest u Salmonella species, de wijze waarop u deze species dient te antwoorden vindt u terug in de brochure over de algemene EKE microbiologie op volgende pagina: https://www.wiv-isp.be/QML/activities/external_quality/brochures/nl/brochures.htm

Uiteindelijk resultaat (in routine geantwoord)

Bruker

Niet geantwoord in routine: N = 1

Wel geantwoord in routine: N = 58

Verstreckte antwoorden:

Antwoord	N labo's
<i>Salmonella species</i>	51
<i>Salmonella enterica</i>	6
<i>Salmonella arizonae</i>	1
Totaal	56

bioMérieux

Niet geantwoord in routine: N = 21

Verstreckte antwoorden:

Antwoord	N labo's
<i>Salmonella species</i>	20
<i>Salmonella enterica</i>	1
Totaal	21

Technische resultaten bekomen met het apparaat van Bruker

We stelden geen verschillen vast in de gebruikte versies van de IVD en RUO software: alle antwoorden werden bekomen door laboratoria met verschillende software versies.

Het laboratorium dat in routine geen antwoord zou verstrekken (N = 1)

1^e resultaat: *S typhi* score: 2.226

2^e resultaat: *S typhi* score: 2.216

3^e resultaat: *S choleraesuis* score: 2.165

Consistence with score: B

Het laboratorium vermeldt als bijkomende testen: TSI, citraat, LDC, agglutinatie Vi-antiserum Indien deze testen compatibel zijn met *S. typhi* antwoorden we. Maar in alle gevallen wordt de stam naar het NRC verzonden.

Laboratoria die in routine *Salmonella species* zouden antwoorden (N = 51)

1^e resultaat: *Salmonella species* N = 43

Score: mediaan: 2.300; min: 2.050; max: 2.480

Salmonella enterica N = 7 (waarvan 1 *S. enterica enterica*)

Score: mediaan: 2.428; min: 2.240; max: 2.482

Salmonella typhi N = 1

Score: 2.227

2^e resultaat: *Salmonella species* N = 44

Score: mediaan: 2.221; min: 1.980; max: 2.436

Salmonella enterica N = 3 (waarvan 1 *S. enterica enterica*)

Scores: 2.430,; 2.350, 2.200

Salmonella typhimurium N = 2

Scores: 2.350, 2.427

Salmonella choleraesuis N = 1

Score: 2.377

Salmonella typhi N = 1

Score: 2.377

3^e resultaat: *Salmonella* species N = 43

Score: mediaan: 2.139; min: 1.670; max: 2.400

Salmonella enterica N = 4 (waarvan 1 *S. enterica enterica*)

Scores: 2.430, 2.384, 2.350, 2.020

Salmonella typhimurium N = 1

Scores: 2.321

Salmonella choleraesuis N = 1

Score: 2.321

Salmonella typhi N = 1

Score: 2.152

Escherichia coli N = 1

Score: 1.871

Consistence with score: A: 31

B: 2

C: 10

Labo's die bijkomende testen aanraden: N = 4

Welke testen

<i>Test</i>	<i>N labo's</i>
Doorstuur naar NRC	23
Agglutinatie	6
Doorstuur naar NRC + agglutinatie	7
Doorstuur naar NRC + identificatie op Vitek	1
Agglutinatie + Api 20E + Api 32E + tartraat	1
Agglutinatie + LDC + ONPG + TSI	1
Doorstuur naar NRC + agglutinatie + TSI	3
Doorstuur naar NRC + agglutinatie + ONPG + ureum	1
Doorstuur naar NRC + agglutinatie + indol + ureum + TSI	1
Doorstuur naar NRC + agglutinatie + identificatie op Vitek	1
Antibiogram	1
Totaal	46

Laboratoria die in routine *Salmonella enterica* zouden antwoorden (N = 6)

1^e resultaat: *Salmonella enterica* N = 4

Scores: 2.091, 2.190, 2.220, 2.310

Salmonella choleraesuis N = 1

Score: 2.063

Salmonella species N = 1

Score: 2.080

2^e resultaat: *Salmonella enterica* N = 5 (waarvan 1 *S. enterica diarizonae*)

Scores: 2.046, 2.085 2.110, 2.110, 2.230

Salmonella species N = 1

Score: 2.020

3^e resultaat: *Salmonella enterica* N = 2 (waarvan 1 *S. enterica arizonae*)

Scores: 1.936, 1.966

Salmonella typhimurium N = 2

Score: 2.090, 2.100

Salmonella choleraesuis N = 1

Score: 2.230

Salmonella species N = 1

Score: 1.950

Consistence with score: A: 4

B: 1

C: 1

Labo's die bijkomende testen aanraden: N = 6

Welke testen

<i>Test</i>	<i>N labo's</i>
Doorstuur naar NRC	4
Doorstuur naar NRC + agglutinatie	2
<i>Totaal</i>	6

Het laboratorium dat in routine *Rhodococcus* hoagii zou antwoorden (N = 1)

1^e resultaat: *Salmonella arizonae* score: 2.257

2^e resultaat: *Salmonella arizonae*: score: 2.096

3^e resultaat: *Salmonella arizonae* score: 2.031

Consistence with score: A

Het laboratorium raadt aan de identificatie te bevestigen met Phoenix

Technische resultaten bekomen met het apparaat van bioMérieux

Laboratoria die in routine *Salmonella species* zouden antwoorden (N = 20)

Resultaat: *Salmonella species* N = 20

Labo's die bijkomende testen aanraden: N = 15

Labo's die bijkomende testen aanraden: N = 15

Welke testen

<i>Test</i>	<i>N labo's</i>
Doorstuur naar NRC	5
Agglutinatie	2
Doorstuur naar NRC + agglutinatie	5
Doorstuur naar NRC + Api	1
Doorstuur naar NRC + PCR	1
Doorstuur naar NRC + agglutinatie + identificatie op Vitek	1
<i>Totaal</i>	15

Het laboratorium dat in routine *Salmonella enterica* zou antwoorden (N = 1)

Resultaat: *Salmonella enterica*

Het laboratorium raadt aan agglutinatie uit te voeren.

Commentaar M/14598 *Salmonella* Chester

Van de 80 deelnemers aan deze enquête, hebben er 71 *Salmonella species* geantwoord, 7 *Salmonella enterica*, 1 *Salmonella arizona* en een laatste laboratorium verkoos zijn bekomen antwoord niet door te geven. Daarnaast gaven 87% van de laboratoria aan dat ze bijkomende testen zouden uitvoeren zoals agglutinatie, biochemische testen of doorsturen naar het Nationaal Referentie Centrum. De analyse naargelang de MALDI-TOF MS producent toonde geen verschillen aan in de bekomen resultaten.

De antwoorden die « *Salmonella species* » of « *Salmonella enterica* » combineren met het uitvoeren van bijkomende testen zijn correct.

Het genus *Salmonella* behoort tot de familie van de enterobacteriaceae en bestaat uit 2 species, *S. enterica* en *S. bongori*. Het species *S. enterica* wordt vervolgens onderverdeeld in 6 subspecies waarvan de belangrijkste die bij de mens teruggevonden wordt *S. enterica* subsp. *enterica* is. De subspecies van *S. enterica* worden vervolgens onderverdeeld in serotypen.

Momenteel laat de MALDI-TOF MS techniek die in de routine microbiologie gebruikt wordt geen verdere identificatie toe dan *Salmonella species*. Voor zover wij weten heeft geen enkele publicatie de mogelijkheid van MALDI-TOF MS om *S. enterica* van *S. bongori* te onderscheiden, onderzocht. De bepaling van de species en subspecies

dient te gebeuren via biochemische testen. De bepaling van het serotype (serovar) van *S. enterica* subsp. *enterica* gebeurt door agglutinatie met specifieke antisera gericht tegen de somatische (O) en flagellaire (H) antigenen van de stam. Alle serotypen zijn opgenomen in het schema van Kauffmann-White.

Salmonella veroorzaakt infectieuze diarree bij de mens. Identificatie van de stam verder dan het speciesniveau laat toe om eventuele epidemieën te detecteren. De bijkomende testen die toelaten het serovar te bepalen, kunnen uitgevoerd worden door het laboratorium zelf of door het Wetenschappelijk Instituut Volksgezondheid, Nationaal Referentie Centrum Salmonella & Shigella. Voor deze stam is de volledige identificatie *S. enterica* subsp. *enterica* serovar Chester. Deze serovar is relatief zeldzaam maar werd reeds beschreven als oorzaak van een gastro-enterische epidemie met 33 patiënten in Canada.

Alexia Verroken

Referenties

Schaumann R, Knoop N, Genzel GH, Losensky K, Rosen-kranz C, Stingu CS, Schellenberger W, Rodloff AC, Eschrich K. Discrimination of *Enterobacteriaceae* and Non-fermenting Gram negative bacilli by MALDI-TOF mass spectrometry. Open Microbiol J. 2013 ;7 :118-122.

Taylor J, Galanis E, Wilcott L, Hoang L, Stone J, Ekkert J, Quibell D, Huddleston M, McCormick R, Whitfield Y, Adhikari B, Grant CC, Sharma D. An outbreak of *Salmonella* Chester infection in Canada: rare serotype, uncommon exposure, and unusual population demographic facilitate rapid identification of food vehicle. J Food Prot. 2012;75:738-42.

https://nrchm.wiv-isp.be/nl/ref_centra_lab/salmonella_shigella/default.aspx

M/14854: Listeria monocytogenes

Aantal deelnemers: 79 (één laboratoria vermeldde geen Maldi-tof te gebruiken voor dit (type) staal)

Bruker: N = 59

Software: IVD: 40
RUO: 8
IVD + RUO: 2
IVD + bioterrorisme + schimmels + mycobacteriën + eigen basis: 1
RUO + bioterrorisme: 6
RUO + bioterrorisme + mycobacteriën + schimmels: 1
RUO + schimmels + mycobacteriën + eigen basis: 1

Extractie: Geen: 48
Mierenzuur: 1
Volledig: 2
Geen + mierenzuur: 1

bioMérieux N = 20

Software: IVD: 19
Myla: 1

Extractie: Geen: 17
Volledig: 2
Vitek MS-CHCA: 1

Uiteindelijk resultaat (in routine geantwoord)

Bruker

Niet geantwoord in routine: N = 3
Wel geantwoord in routine: N = 56

Verstreckte antwoorden:

<i>Antwoord</i>	<i>N labo's</i>
<i>Listeria monocytogenes</i>	49
<i>Listeria innocua</i>	2
<i>Listeria species</i>	5
<i>Totaal</i>	56

bioMérieux

Alle laboratoria zouden het antwoord in routine doorgeven en ze zouden allen *Listeria monocytogenes* antwoorden 1

Technische resultaten bekomen met het apparaat van Bruker

We stelden geen verschillen vast in de gebruikte versies van de IVD en RUO software: alle antwoorden werden bekomen door laboratoria met verschillende software versies.

Laboratoria die in routine geen antwoord zouden verstrekken (N = 3)

1^e resultaat: *Listeria monocytogenes* N= 3

Scores: 2.287, 2.322, 2.399

2^e resultaat: *Listeria monocytogenes* N= 3

Scores: 2.255, 2.256, 2.375

3^e resultaat: *Listeria monocytogenes* N= 3

Scores: 2.233, 2.242, 2.362

Consistence with score: B3

Labo's die bijkomende testen aanraden: N = 2

Het ene laboratorium zou een Api Coryne uitvoeren, het andere zou de stalen naar het NRC versturen.

Laboratoria die in routine *Listeria monocytogenes* zouden antwoorden (N = 49)

1^e resultaat: *Listeria monocytogenes* N= 49

Score: mediaan: 2.321; min: 2.090; max: 2.460

Listeria monocytogenes N= 45

Score: mediaan: 2.281; min: 2.050; max: 2.450

Listeria innocua N= 4

Scores: 2.040, 2.070, 2.220, 2.220

2^e resultaat: *Listeria monocytogenes* N= 43

Score: mediaan: 2.281; min: 2.050; max: 2.450

Listeria innocua N= 4

Scores: 2.040, 2.070, 2.220, 2.220

3^e resultaat: *Listeria monocytogenes* N= 43

Score: mediaan: 2.247; min: 2.030; max: 2.410

Listeria innocua N= 6

Score: mediaan: 2.239; min: 2.070; max: 2.370

Consistence with score: A: 27

B: 22

Labo's die bijkomende testen aanraden: N = 23

Welke testen

<i>Test</i>	<i>N labo's</i>
Doorstuur naar NRC	10
Doorstuur naar NRC + β -hemolyse	1
Doorstuur naar NRC + gramkleuring + katalase	2
Doorstuur naar NRC + gramkleuring + katalase + CAMP + PCR	1
Agglutinatie	1
β -hemolyse + CAMP	1
β -hemolyse + gramkleuring + beweeglijkheid	1
CAMP + beweeglijkheid	1
Gramkleuring	1
Gramkleuring + CAMP + groei op 4°C + identificatie op Vitek	1
Gramkleuring + CAMP + katalase	1
Gramkleuring + CAMP + katalase + β -hemolyse	1
Gramkleuring + katalase + β -hemolyse + oxidase+ esculine + glucose + VP + 16S sequencing	1
<i>Totaal</i>	23

Laboratoria die in routine *Listeria innocua* zouden antwoorden (N = 2)

1^e resultaat: *Listeria innocua* N = 1

Scores: 2.009

Listeria monocytogenes N = 41

Score: 2.253

2^e resultaat: *Listeria innocua* N = 2

Scores: 1.957, 2.232

Listeria innocua N = 2

Score: Scores: 1.947, 2.226

Consistence with score: A: 4

B: 1

Eén laboratorium raadt als bijkomende test aan om een biochemische galerij uit te voeren

Laboratoria die in routine *Listeria* species zouden antwoorden (N = 5)

1^e resultaat: *Listeria monocytogenes* N= 5

Scores: 2.050, 2.180, 2.320, 2.421, 2.441

2^e resultaat: *Listeria monocytogenes* N= 3

Score: 2.140, 2.357, 2.387

Listeria innocua N = 2

Scores: 2.070, 2.260

3^e resultaat: *Listeria monocytogenes* N= 5

Score: 1.970, 2.130, 2.240, 2.307, 2.379

Consistence with score: A: 1

B: 4

Labo's die bijkomende testen aanraden: N = 4

Welke testen

<i>Test</i>	<i>N labo's</i>
Doorstuur naar NRC	2
Doorstuur naar NRC + biochemische testen	1
β-hemolyse + katalase + API coryne	1
<i>Totaal</i>	4

Technische resultaten bekomen met het apparaat van bioMérieux

Laboratoria die in routine *Salmonella species* zouden antwoorden (N = 20)

Resultaat: *Listeria monocytogenes* N= 20

Labo's die bijkomende testen aanraden: N = 5

Welke testen

Gramkleuring ter bevestiging
Antibiogram + Doorsturen naar referentielabo
Verzending naar referentielabo.
Gramkleuring + beweeglijkheid + katalase + doorstuur naar referentielabo
Doorsturen naar referentielabo ter bevestiging en serotypering

Commentaar M/14854 Listeria monocytogenes

79 laboratoria hebben aan deze enquête deelgenomen en 69 (87%) hebben de stam correct geïdentificeerd als *Listeria monocytogenes*. 2 laboratoria hebben ze geïdentificeerd als « *Listeria innocua* », 5 hebben aangegeven dat ze in routine « *Listeria species* » antwoorden en tenslotte hebben 3 laboratoria aangegeven dat ze bijkomende testen uitvoeren alvorens de identificatie te antwoorden.

Een diepgaandere analyse van de resultaten liet toe om vast te stellen dat 20/20 gebruikers van het MALDI-TOF MS toestel van bioMérieux de stam correct geïdentificeerd hebben versus 49/56 gebruikers van het MALDI-TOF MS toestel van Bruker. Dit laatste toestel geeft de resultaten weer onder vorm van de 10 beste matches met de database en kent hier een score aan toe. *L. innocua* komt 17 maal terug in de top 3 van de resultaten met een score >2. Dit onderlijnt duidelijk de moeilijkheid die het systeem ondervindt om beide species te onderscheiden zelfs indien de analyse voorafgegaan wordt door een proteïne extractie. Ojima-Kato et al. hebben recent gepubliceerd dat ze *L. innocua* en *L. monocytogenes* kunnen onderscheiden met MALDI-TOF MS maar dit door het creëren van een database en door de analyse van pieken wat moeilijk haalbaar is in het routinelaboratorium. Het onderscheid tussen beide species is nochtans primordiaal voor een goede klinische interpretatie van het resultaat en omwille van epidemiologische redenen. We herinneren er hier aan dat de hemolyse, die uitsluitend aanwezig is bij *L. monocytogenes* toelaat de beide species te onderscheiden.

L. innocua is nauw verwant met *L. monocytogenes* maar wordt over het algemeen beschouwd als niet pathogeen gezien het geen drager is van de virulentiegenen die bij *L. monocytogenes* beschreven zijn. Er zijn echter wel zeldzame gevallen beschreven van sepsis of meningitis door *L. innocua*.

L. monocytogenes daarentegen ligt aan de basis van een ernstige pathologie: listeriose, die meer bepaald voorkomt bij immuungedeprimeerden en zwangere vrouwen et. Deze ernstige infectie van voedingsorigine kan leiden tot een sepsis of tot een infectie van het centraal zenuwstelsel. Indien ze aanwezig is in de amniosvloeistof van een zwangere vrouw kan ze leiden tot een spontane abortus, een vroeggeboorte of een ernstige neonatale infectie. Met een mortaliteit tussen 20 en 30%, wordt listeriose beschouwd als een probleem voor de volksgezondheid en moet ze opgevolgd worden.

Het is sterk aanbevolen om elke *Listeria* stam die uit een klinisch staal geïsoleerd wordt door te sturen naar het wetenschappelijk Instituut Volksgezondheid, Nationaal Referentiecentrum (NRC) voor Listeria. Het NRC voert een identificatie uit op basis van biochemische testen en zo nodig op basis van moleculaire testen Tevens wordt een serotypering uitgevoerd. Tenslotte laat een moleculaire typering via MLST (Multi locus sequence typing) toe om de klonaliteit van de stammen te analyseren. In 2015, werden 85 *L. monocytogenes* stammen, die 78 gevallen van humane listeriose betroffen, naar het NRC verstuurd. Negen gevallen waren materno-neonataal en 69 gevallen niet materno-neonataal. De serotypen 4b et 1/2a werden vastgesteld in respectievelijk 30,8% en 47,4% van de gevallen.

We herhalen hier ook dat listeriose deel uitmaakt van de ziekten die aangegeven moeten worden.

Alexia Verroken

Referenties

Allerberger F. *Listeria*: growth, phenotypic differentiation and molecular microbiology. 2003. FEMS Immunology and Medical Microbiology, 35 :183-189.

Favaro M, Sarmati L, Sancesario G, Fontana C. First case of *Listeria innocua* meningitis in a patient on steroids and etanercept. JMM Case Reports. 2014. Doi 10.1099 ;jmmcr.0.003103.

Ojima-Kato T, Yamamoto N, Takahashi H, Tamura H. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) can precisely discriminate the lineages of *Listeria monocytogenes* and species of *Listeria*. PloS ONE. 2016. Doi :10.1371/journal.pone.0159730.

Bertrand S, Mattheus W, Vanhoof R, Ceysens P-J. Jaarverslag Nationaal Referentiecentrum voor *Listeria*: *Listeria* stammen afgezonderd in België in 2015. https://nrchm.wiv-isp.be/nl/ref_centra_labo/listeria_monocytogenes/Rapporten/Forms/AllItems.aspx

M/15149: Shewanella species

Aantal deelnemers: 79 (één laboratoria vermeldde geen Maldi-tof te gebruiken voor dit (type) staal)

Bruker: N = 59

Software: IVD: 40
RUO: 9
IVD + RUO: 2
IVD + bioterrorisme + schimmels + mycobacteriën + eigen basis: 1
RUO + bioterrorisme: 6
RUO + schimmels + mycobacteriën + eigen basis: 1

Extractie: Geen: 53
Mierenzuur: 4
Geen + mierenzuur: 2

bioMérieux N = 20

Software: IVD: 19
Myla: 1
Saramis version 3.2: 1

Extractie: Geen: 17
Volledig: 2
Vitek MS-CHCA: 1

Uiteindelijk resultaat (in routine geantwoord)

Bruker

Niet geantwoord in routine: N = 43

Wel geantwoord in routine: N = 16

Verstreckte antwoorden:

<i>Antwoord</i>	<i>N labo's</i>
<i>Shewanella putrefaciens</i>	8
<i>Shewanella species</i>	6
<i>Shewanella algae</i>	2
<i>Totaal</i>	16

bioMérieux

Niet geantwoord in routine: N = 11

Wel geantwoord in routine: N = 9

Verstreckte antwoorden:

Antwoord	N labo's
<i>Shewanella algae</i>	8
<i>Shewanella</i> species	1
Totaal	9

Technische resultaten bekomen met het apparaat van Bruker

We stelden geen verschillen vast in de gebruikte versies van de IVD en RUO software: alle antwoorden werden bekomen door laboratoria met verschillende software versies.

Laboratoria die in routine geen antwoord zouden verstrekken (N = 43)

1^e resultaat: *S. putrefaciens* N = 39

Score: mediaan: 2.235; min: 1.979; max: 2.400

S. algae N = 4

Score: mediaan: 2.020, 2.052, 2.080, 2.128

2^e resultaat: *S. putrefaciens* N = 39

Score: mediaan: 2.160; min: 1.917; max: 2.310

S. algae N = 4

Score: mediaan: 1.974, 1.980, 2.010, 2.030

3^e resultaat: *S. putrefaciens* N = 18

Score: mediaan: 1.992; min: 1.800; max: 2.352

S. algae N = 25

Score: mediaan: 1.980; min: 1.846; max: 2.099

Consistence with score: A: 32

Labo's die bijkomende testen aanraden: N = 9

Welke testen

Antwoord in functie van de verwachte fecale microbiota en de klinische context.

groei op 4°C, NaCl afhankelijkheid, hemolyse

Oxidase, mobiliteit, TSI(H₂S)

Gezien *Shewanella* identificatie (niet pathogeen in stoelgangsstaal) niet gevalideerd op onze Maldi-tof zouden we identificatie bevestigen om mogelijke foutieve identificatie van mogelijks wel een pathogene kiem uit te sluiten. Zo identificatie wordt bevestigd zouden we indien massieve groei en reinkultuur dit op protocol antwoorden met de vermelding "dit wijst op een gestoorde darmflora"
Bijkomende testen= TSI: H₂S moet positief zijn. Oxidase: moet positief zijn.

Oxidase

Gram: Gram negatieve bacil, Kligler: non fermenter, H₂S ++ Oxydase +, beweeglijk groei op 4°C: + voor *S. putrefaciens*, (-) voor *S. algae* groei op 42°C: (-)voor *S. putrefaciens*, + voor *S. algae* Maltose, Arabinose: + voor *S. putrefaciens*, (-)voor *S. algae*

Oxydase Kligler

16-S RNA gene sequencing voor verdere validatie van de identificatie door MALDI-TOF

16S rRNA gene sequencing

Laboratoria die in routine *S. putrefaciens* zouden antwoorden (N = 8)

1^e resultaat: *S. putrefaciens* N = 8

Score: mediaan: 2.210; min: 2.000; max: 2.312

2^e resultaat: *S. putrefaciens* N = 8

Score: mediaan: 2.110; min: 1.930; max: 2.320

3^e resultaat: *S. putrefaciens* N = 2

Scores: 2.000, 2.120

S. algae N = 6

Score: mediaan: 1.950; min: 1.871; max: 2.046

Consistence with score: A: 5

B: 3

Drie laboratoria zouden bijkomende testen aanraden: twee de bepaling van oxidase en één zou het staal naar het NRC doorsturen

Laboratoria die in routine *S. algae* zouden antwoorden (N = 2)

1^e resultaat: *S. algae* N = 1

Score: 1.857

S. putrefaciens N = 1

Score: 2.124

2^e resultaat: *S. algae* N = 1

Score: 1.888

S. putrefaciens N = 1

Score: 2.109

3^e resultaat: *S. algae* N = 1

Score: 1.511

S. putrefaciens N = 1

Score: 2.048

Consistence with score: B: 2

Het laboratorium dat *S. putrefaciens* bekwam raadt aan om een bepaling op Vitek2 uit te voeren.

Laboratoria die in routine *Shewanella* species zouden antwoorden (N = 6)

1^e resultaat: *S. putrefaciens* N = 5

Scores: 2.170, 2.180, 2.210, 2.229, 2.306

S. algae N = 1

Score: 1.962

2^e resultaat: *S. putrefaciens* N = 5

Scores: 1.912, 2.100, 2.160, 2.171, 2.242

S. algae N = 1

Score: 2.070

3^e resultaat: *S. putrefaciens* N = 3

Scores: 1.833, 2.010, 2.150

S. algae N = 3

Score: 1.951, 1.990, 2.020

Consistence with score: B: 4

B: 2

Vier laboratoria zouden bijkomende testen aanraden: twee de uitvoering van een 16S sequencing, één het uitvoeren van een Gramkleuring en één identificatie via Vitek2

Technische resultaten bekomen met het apparaat van bioMérieux

Laboratoria die in routine *Salmonella species* zouden antwoorden (N = 11)

Resultaat: *S. algae* N = 11

Eén laboratorium raadt een bijkomende test aan: controle op de aanwezigheid van H₂S op TSI.

Laboratoria die in routine *S. algae* zouden antwoorden (N = 8)

Resultaat: *S. algae* N = 8

Geen enkel laboratorium zou bijkomende testen aanraden

Het laboratorium dat in routine *Shewanella species* zou antwoorden (N = 1)

Resultaat: *S. algae*

Het laboratorium zou de identificatie bevestigen met Vitek2.

Commentaar M/15149 *Shewanella algae*

De kiem die in het verleden beschreven werd als *Pseudomonas putrefaciens*, *Alteromonas putrefaciens*, *Achromobacter putrefaciens*, *CDC groep Ib*, werd geklasseerd in het genus *Shewanella* dat meer dan 50 species omvat.

Shewanella putrefaciens omvatte 2 biotypes: CDC biotype I en II. CDC biotype I komt momenteel overeen met *Shewanella putrefaciens sensu stricto*, CDC biotype II met een nieuwe species: *Shewanella alga*, hernoemd *Shewanella algae*.(1)

Shewanella putrefaciens en *algae* zijn Gram negatieve bacillen, non fermenters, beweeglijk, oxydase positief. De 2 species van *Shewanella* produceren H₂S, een unieke eigenschap onder de Gram negatieve non fermenters. De beide species zijn gepigmenteerd (bruin pigment). Alkalisch fosfatase, gelatinase, trypsine en pyrrolidonyl aminopeptidasen en ornithinedecarboxylase zijn positief.

De eigenschappen die de beide species onderscheiden zijn de volgende: ***Shewanella algae*** is asaccharolytisch en halofiel, terwijl ***Shewanella putrefaciens*** saccharolytisch is en geen NaCl vereist voor zijn groei. (2)

De habitat van ***Shewanella algae*** is zeewater. ***Shewanella putrefaciens*** wordt zowel in zoet als zout water aangetroffen.

De voornaamste species die in de humane pathologie geïsoleerd wordt is ***Shewanella algae***. (77% van de gevallen). ***Shewanella putrefaciens*** vormt de meerderheid van de omgevings- en dierlijke isolaten. (89%).(3)

Beide species veroorzaken infecties van huid en zachte weefsels, otitis media, ooginfecties, osteomyelitis, septicemie, peritonitis, infecties van de galwegen.(4)

Recent werd een septicemie door ***Shewanella algae*** na het eten van rauwe vis beschreven bij een patiënt met terminale nierinsufficiëntie (5). Vandaar het belang om de kiemen op te sporen in stoelgang bij gastro-enteritis na het eten van rauwe vis of zeevruchten.

Het is moeilijk beide species te onderscheiden door massaspectrometrie.(6)

In de database van Vitek MS, zijn er slechts 2 species: ***Shewanella algae*** en ***Shewanella putrefaciens***, terwijl de database van Maldi Biotyper: ***S. algae*** (1 MSP), ***S. baltica*** (1MSP), ***S. fidelis*** (1MSP), ***S. frigidimarina*** (1MSP), ***S. profunda*** (1MSP) en ***S. putrefaciens*** (4MSP) (MSP=Main spectra) voorstelt
Als de speciesidentificatie vereist is, moeten bijkomende testen uitgevoerd worden: groei op 42°C, halofilie, 16S rRNA sequencing.

Voor de stam **M/15149 *Shewanella algae*** werd de identificatie bevestigd door 16S rRNA sequencing. 100% van de 19 gebruikers van de Vitek-hebben de stam correct geïdentificeerd tot op speciesniveau. Voor de 59 laboratoria die de Maldi-Biotyper (Brüker) gebruiken: 10 % (6/59) bekwamen als eerste resultaat (beste match) ***Shewanella algae*** en 90% (53/59) ***Shewanella putrefaciens***.

	<i>Shewanella algae</i>	<i>Shewanella putrefaciens</i>
1 ^e « match »	10%	90%
2 ^e « match »	10%	90%
3 ^e « match »	59%	41%

Dit gebrek aan coherentie dwingt ofwel om ***Shewanella sp.*** te antwoorden, ofwel om bijkomende testen uit te voeren om het species te preciseren

A. Boeras, Clinique St-Joseph, Liège

Referenties

Nozue H, Hayashi T, Hashimoto Y, Ezaki T, Hamasaki K, Ohwa K, Terawaki Y. 1992 Isolation and characterisation of *Shewanella alga* from human clinical specimens and emendation of the description of *S. alga* Simidu et al. 1990, 335. *Int J Syst Bacteriol* **42** :628-634

Vanechoute M, Nemec A, Kämpfer P, Cools P, Wauters G : *Acinetobacter, Chryseobacterium, Moraxella, and Other Nonfermentative Gram-Negative Rods Manual of Clinical Microbiology 11 edition 2015*, Washington DC Press

Khashe S, Janda JM. 1998. Biochemical and pathogenic properties of **Shewanella alga** and *Shewanella putrefaciens*. *J Clin Microbiol* **36**: 783-787

Vignier N, Barreau M, Olive C, Baubion E, Théodose H, Hochedez P, Cabié A 2013 Human infection with *Shewanella putrefaciens* and *S. alga*; report of 16 cases in Martinique and review of literature. *Am J Trop Med Hyg* **89**: 151-156

Tomoaki T, Hiroki C, Shota M, Shintaro H, Shotaro H, Takuji I, Takeaki F, Tomomitsu M, Satoko F, Chishio M, Hajime I 2017 *Shewanella alga* bacteriemia in end stage renal disease patient : a case report and review of the literature. *Intern Med* **56** : 729-732

Jung-Hyun B, Hyunwoong P, Sunjoo K 2017 The phantom menace for patients with hepatobiliary diseases : *Shewanella haliotis*, often misidentified as *Shewanella alga* in biochemical tests and MALDI TOF analysis . *Jpn J Infect Dis* **70**: 177-180.

M/15165: Streptococcus dysgalactiae

Aantal deelnemers: 79 (één laboratoria vermeldde geen Maldi-tof te gebruiken voor dit (type) staal)

Bruker: N = 59

Software: IVD: 40
RUO: 9
IVD + RUO: 2
IVD + bioterrorisme + schimmels + mycobacteriën + eigen basis: 1
RUO + bioterrorisme: 5
RUO + bioterrorisme + mycobacteriën + schimmels: 1
RUO + schimmels + mycobacteriën + eigen basis: 1

Extractie: Geen: 51
Mierenzuur: 7
Geen + mierenzuur: 1

bioMérieux N = 20

Software: IVD: 19
Myla: 1

Extractie: Geen: 17
Volledig: 2
Vitek MS-CHCA: 1

Uiteindelijk resultaat (in routine geantwoord)

Bruker

Niet geantwoord in routine: N = 4
Wel geantwoord in routine: N = 55

Verstreckte antwoorden:

<i>Antwoord</i>	<i>N labo's</i>
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	52
<i>Streptococcus dysgalactiae dysgalactiae</i>	1
<i>Streptococcus dysgalactiae equisimilis</i>	1
<i>Streptococcus species</i>	1
<i>Totaal</i>	55

bioMérieux

Niet geantwoord in routine: N = 1
Wel geantwoord in routine: N = 19

Verstreckte antwoorden:

Antwoord	N labo's
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	13
<i>Streptococcus dysgalactiae dysgalactiae</i>	2
<i>Streptococcus dysgalactiae equisimilis</i>	3
<i>Streptococcus pyogenes</i>	1
Totaal	19

Technische resultaten bekomen met het apparaat van Bruker

We stelden geen verschillen vast in de gebruikte versies van de IVD en RUO software: alle antwoorden werden bekomen door laboratoria met verschillende software versies.

Laboratoria die in routine geen antwoord zouden verstrekken (N = 4)

1^e resultaat: *S. dysgalactiae*

Score: 2.120, 2.199, 2.287, 2.325

2^e resultaat: *S. dysgalactiae* (waarvan 2 *Streptococcus dysgalactiae equisimilis*)

Scores: 2.120, 2.186, 2.258, 2.272

3^e resultaat: *S. dysgalactiae*

Scores: 2.050, 2.111, 2.229, 2.241

Consistence with score: A: 3

B: 1

Twee laboratoria zouden als bijkomende test een agglutinatie uitvoeren en één laboratorium zou een bacitracineschijfje gebruiken om *S. dysgalactiae* en *S. pyogenes/canis* te onderscheiden.

Laboratoria die in routine *Streptococcus dysgalactiae* zouden antwoorden (N = 54)

1^e resultaat: *S. dysgalactiae* N = 53

(1: *S. dysgalactiae dysgalactiae* – 6. *S. dysgalactiae equisimilis*)

Score: mediaan: 2.250; min: 1.994; max: 2.460

S. pyogenes N = 1

Score: 1.841

2^e resultaat: *S. dysgalactiae* N = 54

(2: *S. dysgalactiae dysgalactiae* – 6. *S. dysgalactiae equisimilis*)*Salmonella typhimurium* N = 2

Score: mediaan: 2.195; min: 1.836; max: 2.430

3^e resultaat: *S. dysgalactiae* N = 53

(1: *S. dysgalactiae dysgalactiae* – 10. *S. dysgalactiae equisimilis*)

Score: mediaan: 2.160; min: 1.880; max: 2.360

S. pyogenes N = 1

Scores: 1.789

Consistence with score: A: 48

B: 5

C: 1

Labo's die bijkomende testen aanraden: N = 19

Welke testen

<i>Test</i>	<i>N labo's</i>
Agglutinatie voor bepaling Lancefield groep	9
Agglutinatie voor bepaling Lancefield groep + doorstuur naar NRC	1
Agglutinatie voor bepaling Lancefield groep + identificatie op Vitek	1
Agglutinatie voor bepaling Lancefield groep + bacitracineschijfje + Gramkleuring + Pyrrolidonyl Aminopeptidase + CAMP-factor	1
Doorstuur naar NRC	1
Bacitracineschijfje	1
Bacitracineschijfje + identificatie op Vitek	1
Bacitracineschijfje + antibiogram	1
PYR test	1
B-hemolyse	1
Identificatie op Phoenix	1
<i>Totaal</i>	<i>19</i>

Het laboratorium dat in routine *Streptococcus* species zou antwoorden (N = 1)

1^e resultaat: *S. dysgalactiae*

Score: 2.344

2^e resultaat: *S. dysgalactiae equisimilis*

Score: 2.316

3^e resultaat: *S. dysgalactiae*

Score: 2.282

Consistence with score: B

Het laboratorium zou in routine geen bijkomende testen uitvoeren

Technische resultaten bekomen met het apparaat van bioMérieux

Het laboratorium dat in routine geen antwoord zou verstrekken (N = 1)

Resultaat: *S. dysgalactiae*

Het laboratorium zou de identificatie uitvoeren via Vitek 2 aangezien Maldi-tof geen onderscheid kan maken tussen *S. dysgalactiae dysgalactiae* en *S. dysgalactiae equisimilis*.

Labo's die bijkomende testen aanraden: N = 6

Welke testen

Latex agglutinatie + PYR A

Antibiogram + Doorsturen naar ref. labo

Vitek MS kan niet differentiëren tussen *Streptococcus dysgalactiae equisimilis* en *Streptococcus dysgalactiae dysgalactiae*. Daarom wordt een Lancefield serotypering uitgevoerd en die gaf groep G als resultaat.

Nazicht beta-hemolyse

Gramkleuring

Doorsturen naar NRC voor bevestiging van de subspecies en bepaling van de eventuele invasieve aard van de kiem

Het laboratorium dat in routine *S. pyogenes* zou antwoorden (N = 1)

Resultaat: *S. pyogenes*

Het laboratorium zou in routine geen bijkomende testen uitvoeren.

Commentaar M/15165 *Streptococcus dysgalactiae*.

Stam M/15165 was een *Streptococcus dysgalactiae*

De situering van dit species in de streptokokken –groep is aan bod gekomen en goed beschreven in het verslag van de EKE 2013/3. Dit betrof stam M/12141 die atypisch was en illustreerde dat serotypering en bacitracine niet perfect is voor een zeker onderscheid tussen dit species en enkele verwante: *S. dysgalactiae ssp. dysgalactiae* kan ook agglutineren met A-serum (maar dat is een species dat heel zeldzaam bij de mens gevonden wordt). Bacitracine gevoeligheid en een positieve Pyronidonyl test zijn niet exclusief voor *S. pyogenes*, maar *S. pyogenes* is steeds positief voor deze 2 kenmerken.

Anderzijds kun je in dit verslag lezen dat het verschil tussen *S. pyogenes* en *S. dysgalactiae* niet cruciaal is voor de klinische consequenties: beide species veroorzaken dezelfde infecties, zelfs deze met ernstige complicaties. Het blijft uiteraard vooral epidemiologisch interessant het juiste species te kennen; men kan

alleen maar aanbevelen stammen die aanleiding geven tot toxic shock en ernstige cellulitis of fasciitis naar een referentielabo te sturen.

Kunnen we vertrouwen op Maldi-TOF analyse voor een zeker identificatie van deze verwante soorten? Eigen ervaring leert dat dit niet steeds het geval is. Dit viel voor deze stam echter best mee, ofwel te wijten aan de stam zelf, hetzij aan recente verbeteringen in de referentiebibliotheek bij de laatste updates. De meeste deelnemers antwoorden correct, nl *S. dysgalactiae*, of een van de 2 subtypes: 54 op 55 met Bruker: 18 op 19 met Biomerieux.

Overzicht:

Bruker apparaat

4 labo's geven antwoord niet als dusdanig door in routine (raden bijkomende testen aan); 1^e score *S. dysgalactiae*

54 labo's antwoorden *S. dysgalactiae*; 53: 1^e score *S. dysgalactiae*; 1: 1^e score *S. pyogenes*

1 labo antwoordt *Streptococcus species*; 1^e score *S. dysgalactiae*

bioMérieux apparaat

1 labo geeft antwoord niet als dusdanig door in routine (raadt bijkomende testen aan); technisch resultaat *S. dysgalactiae*

18 labo's antwoorden *S. dysgalactiae*; technisch resultaat *S. dysgalactiae* (al dan niet met vermelding van subspecies)

1 labo antwoordt *Streptococcus species*; technisch resultaat *S. pyogenes*

Enkele labo's antwoordden dat ze extra testen uitvoerden voor definitieve confirmatie; de korte beschrijving hierboven, en meer uitgebreide in ref. 1 illustreren de echte waarde van die confirmatietesten: ze zijn inderdaad niet 100% betrouwbaar maar kunnen mogelijk toch helpen bij de identificatie. 1 labo zou op basis van het resultaat van Maldi-TOF *S. pyogenes* antwoorden zonder bijkomende testen (wat verdedigbaar is), 1 labo *Streptococcus species*, wat veel minder aanvaardbaar is.

G. Claeys, UZ Gent

Referenties

J. Verhaegen, M/12141 *Streptococcus dysgalactiae ssp equisimilis* in het rapport van de EKE 2013/3.

Jensen A; Kilian M. Delineation of *Streptococcus dysgalactiae*, its subspecies and its clinical and phylogenetic relationship to *Streptococcus pyogenes*. J Clin Microbiol 2012, 50(1):113-126.

EINDE

© Wetenschappelijk Instituut Volksgezondheid, Brussel 2017.

Dit rapport mag niet gereproduceerd, gepubliceerd of verdeeld worden zonder akkoord van het WIV. De individuele resultaten van de laboratoria zijn vertrouwelijk. Zij worden door het WIV niet doorgegeven aan derden, noch aan de leden van de Commissie, de expertencomités of de werkgroep EKE.