

I. ALGEMENE BEMERKINGEN

Voor de eerste evaluatie van het jaar 2000 (enquête 2000/1) werd volgend materiaal verzonden op 24 januari.

1.1. Vier gelyofiliseerde monsters voor identificatie.

Het betrof 4 reïnculturen. Voor 1 monster werden de resultaten van de gevoeligheidstesten tegen 4 antibiotica gevraagd.

Eén monster werd opgestuurd vanwege zijn educatief belang, de resultaten worden niet in aanmerking genomen voor de evaluatie van de laboratoriumprestaties.

De urologen met laboratoriummerkenning dienden voor de monsters aangeduid met een asterisk verplicht de identificatie uit te voeren.

1.2. Twee gefixeerde bloeduitstrijkjes voor parasitologisch onderzoek.

1.3. Twee gelyofiliseerde plasmamonsters voor hepatitis B en C serologie.

AANTAL DEELNEMERS

Het aantal evalueerbare antwoordbulletins bedroeg :

1. Voor identificatie en antibiogram :	271
2. Voor parasitologie :	245
3. Voor hepatitis B en C serologie:	250

II. IDENTIFICATIES

2.1 Cultuur M/1670

Deze stam, geïsoleerd uit een hemocultuur van een patiënt met abdominaal abces, is een *Streptococcus anginosus* (vroeger *S. milleri* of *S. intermedius*).

2.1.1. Taxonomie

Deze bacterie behoort tot een species/ groep die 'geplaagd' wordt door discussies en evolutie in de taxonomie.

De streptococci zijn recent onderwerp van belangrijke taxonomische herschikkingen. Enterococcus en Lactococcus zijn genera die van hen werden afgescheiden.

Klassiek worden aanwezigheid van Lancefield antigenen en hemolyse gebruikt om streptococci te identificeren : dit blijft nog steeds nuttig, maar komt niet steeds overeen met aanduiding van een species. *S.anginosus* (of 'S.milleri') is hiervan een mooie illustratie : stammen die tot deze soort/groep behoren kunnen zowel alfa-, beta- als niet-hemolytisch zijn, en een deel van hen kunnen Lancefield antigenen bezitten behorend tot de groep A,C,G,F of een mengsel ervan.

Er is inderdaad nog steeds onenigheid in de literatuur betreffende de classificatie van 'anginosus-groep' streptococci. Eén zienswijze (Whiley) zegt dat *S. constellatus*, *S. anginosus* en *S. intermedius* 3 verschillende species zijn. Deze drie namen zijn valid gepubliceerd. Een andere zienswijze (Coykendall) is dat deze drie groepen eerder 3 subpopulaties zijn van één enkel species. De naam die voor dit ene species moet gebruikt worden is *S. anginosus* omdat dit de oudste naam is.

'S. milleri' is een groepsnaam die de drie verschillende taxa omvat. Deze naam is nooit valid gepubliceerd en moet officieel steeds tussen aanhalingstekens geschreven worden vermits ze niet 'geldig' is (maar ze komt dus inhoudelijk overeen met de volledige anginosus groep). In sommige boeken (Mandell, 2000, 5th Edition) worden deze bacteriën nog als 'S.intermedius' benoemd.

De viridans streptococci ten slotte omvatten naast de anginosus groep, ook de mitis-oralis groep, de thermophilus groep en de mutans groep... Verdere identificatie van viridans-streptococci is wenselijk, vooral indien ze afgezonderd worden uit 'diepe sites', omdat er duidelijke verbanden bestaan tussen identificatie en een achterliggende pathologie.

2.1.2. Voorkomen en klinische betekenis

Behoort tot de normale mucosale flora (mond, darm, vagina).

Als we 'viridans'-streptococci gaan identificeren in 'diepe' monsters (zoals hersen-, lever- en andere intra-abdominale abscessen, pleura-empyeem,...) zien we dat de betreffende stammen verrassend vaak '*S. anginosus*' of '*S. milleri*' blijken te zijn. Meestal zijn ook andere bacteriële species aanwezig zoals anaëroben, *Eikenella corrodens* e.a.

S. anginosus in hemokulturen : moet doen denken aan diepe (meng-) infecties, of aan endocarditis.

2.1.3. Isolatie en identificatie

- microscopie van streptococci
- kolonie-groei : zoals vele 'viridans'-streptococci kleine, eerder grijze kolonies, die best groeien op bodems die bloed bevatten, vaak beter in CO₂ of zelfs micro-aerofiele atmosfeer
- vaak typische 'karamel'-geur
- katalase-negatief
- hemolyse : niet-, alfa- of beta-hemolytisch (de kolonies (minute-colony) zijn steeds veel kleiner dan de pyogene streptococci)
- Lancefield-antigenen : frequent F maar ook, C,G, A of geen of soms meerdere samen
- biochemische kenmerken : VP en Arginine positief, een combinatie waarmee ze zich afzonderen van andere species uit de 'viridans-groep'
 - nuttig lijkt hiervoor, voor beide tests, om snelle resultaten te bekomen, gebruik te maken van een dens inoculum in een klein volume (ref Facklam en Washington) : suspensie van een volledige agar-bodem (waarop de bacterie gedurende 18 uur is gegroeid) in 2 ml VP broth, na incubatie (6 uur volstaat reeds), VP-reagens A en B toevoegen
 - onderscheid met *S. pyogenes*, enterococci... door bacitracine-test, pyrrolidonyl-amidase, BEA, CAMP-test,... : dit is eigenlijk niet nodig als men met de kolonie-grootte rekening houdt
 - bij twijfel : uitgebreider biochemische galerij of commerciële galerij
- commerciële identificatie-galerijen : vaak komen we hierbij tot een oude benaming

differentiatie binnen de *S. anginosus*-groep : niet heel gemakkelijk, en gezien de discussie over taxonomie niet erg relevant (Er zou wel een associatie zijn tussen lokatie van de infectie en de subtypes : *S. anginosus* meer in gastro-intestinale en uro-genitale, de andere 2 'species' meer bij infecties van de bovenste lichaamshelft). Een tabel hieromtrent is bv. te vinden in Mandell , 2000, Vth edition (hoofdstuk 192) en in de Manual of Clinical Microbiology 7th edition.

2.1.4. Gevoeligheid voor antibiotica

- gevoeligheid aan penicilinen : vroeger uitstekend, helaas meer en meer intermediair gevoelige (MIC 0.25 - 2 µg/ml) tot resistente (MIC > 2 µg/ml) stammen
- ter herinnering : er kan eigenlijk geen diffusie-antibiogram gebruikt worden voor het testen van 'viridans-streptococci', er moeten MICs bepaald worden als men de gevoeligheid wil testen (richtlijnen NCCLS)
- ook aan andere B-lactam- antibiotica gevoelig, maar klinische efficiëntie is alleen goed gedocumenteerd voor de nieuwere cefalosporines
- alternatief: clindamycine (en vancomycine)
- chirurgie of drainage zijn van primordiaal belang bij suppuratieve infecties

NAAM geving : besluit

- Correct is : *S. anginosus*-groep maar volgens andere taxonomen kunnen *S. anginosus*, *S. constellatus* en *S. intermedius* geldige species-namen zijn .
- 'S. milleri' is een oude naam, die we beter zouden verlaten, maar is goed ingeburgerd, en de 'klinische boodschap' van suppuratieve infectie is door heel wat clinici gekend.

G. CLAEYS

(Labo voor bacteriologie en virologie UZ Gent)

P. VAN DAMME

(Laboratorium voor Microbiologie, Ledeganckstraat, Universiteit Gent)

2.2. Cultuur M/1871

geïsoleerd uit een urine bij een bejaarde patiënt met pyurie, is een *Acinetobacter baumannii*.

2.2.1. Taxonomie

Acinetobacters zijn gemakkelijk groeiende, oxidase-negatieve, cocco-bacillaire, strict-aerobe, non-fermenterende (inert) Gram negatieve staven die onbeweeglijk (cfr. A-kineto) zijn.

De verwarring wat betreft de benaming en identificatie van *Acinetobacter* kan gedeeltelijk worden opgehelderd door volgend, min of meer historisch, overzicht :

Evolutie van de taxonomie en de naamgeving :

1.

Vertrekpunt : ingedeeld in familie der Neisseriaceae, benoemd als *Mima polymorpha*, *Herellea vaginicola*, *Moraxella* sp.

2.

Opdeling in TWEE species: *Acinetobacter anitratus* en *Acinetobacter Iwoffii*

3.

Hergroepering tot EEN species : *Acinetobacter calcoaceticus* maar met MEERDERE BIOVARS : *anitratus* (glucidolytisch), *Iwoffii* (niet-glucidolytisch), later ook *hemolyticus* (hemolytisch), en *alcaligenes* (proteolytisch)

4.a.

- Volledige herschikking door Bouvet & Grimont (1986), op basis van DNA:DNA hybridisatie. Hieruit blijkt dat de vroegere benamingen niet overeenkwamen met de natuurlijke species. De namen *calcoaceticus*, *Iwoffii* en *hemolyticus* worden wel behouden maar duiden nieuwe species aan. De meeste vroegere klinische stammen behoren tot het nieuwe species *A. baumannii*. Slechts enkele van de andere nieuwe species worden benoemd: *Acinetobacter johnsonii*, *Acinetobacter junii*, *Acinetobacter radioresistens*
- Later gelijktijdig taxonomisch werk van Bouvet & Jeanjean (1989) en van Tjernberg & Ursing (1989) voegt hier nog nieuwe onbenoemde species aan toe (klinisch weinig belangrijk), ongelukkig genoeg met een overlappende nummering, wat het nog wat verwarrender maakt.
- Herschikking van de fenotypische species in de DNA-groepen :

Genomische species of DNA group	Species naam	Genomische species of DNA group	Species naam
1	<i>A. calcoaceticus</i>	10	
2	<i>A. baumannii</i>	11	
3		12	<i>A. radioresistens</i>
4	<i>A. haemolyticus</i>	13	
5	<i>A. junii</i>	14	
6		15	
7	<i>A. johnsonii</i>	16	
8	<i>A. lwoffii</i>	17	
9	Synoniem aan 8	18	

5. Fenotypische indeling

- Opstelling identificatie-schema van de *Acinetobacter* -species a.h.v. fenotypische kenmerken: groei op 37, 41 en 44 °C, gelatine hydrolyse, verzuring van glucose, hemolyse (schapebloed), assimilatie van trans-aconitaat, L-arginine, citraat, malonaat ... (14 verschillende substraten) (Bouvet & Grimont 1987)
- Vaststelling dat de voorgestelde identificatie-testen gevoelig zijn voor kleine afwijkingen van de basis-techniek, en bv. minstens 6 dagen incubatie vragen. Het voorgestelde schema is niet haalbaar voor routine-labo's.

6.

- Distributie van acinetobacters in de omgeving :

Bron	Frequentst aangetroffen species
Huid van gezonde personen (voorarm, voorhoofd, tussen tenen, e.a.)	8/9 (<i>A. lwoffii</i>) 15 (geen naam) 12 (<i>A. radioresistens</i>)
Gehospitaliseerde patiënten (huid, mucosa, andere gekoloniseerde geïnfecteerde organen)	2 (<i>A. baumannii</i>) 3 (geen naam) 13TU (geen naam)
Afvalwaters, omgevings-kweken,...	Divers, afhankelijk van de omstandigheden

De normale species van de huid zijn anders dan de nosocomiale stammen. De 'natuurlijke' econiche van nosocomiale stammen is niet gekend (Seifert e.a. 1997)

7.

- Ontstaan van de pragmatische benaming : **Acinetobacter baumannii-Acinetobacter calcoaceticus group** (genospecies 1,2,3 en 13TU): dit zijn de meest frequent geïsoleerde species in de ziekenhuis-omgeving, met uitzondering van *A.calcoaceticus* die nauwelijks voorkomt in klinische isolaten.
-

2.2.2. Bacteriologie en identificatie

Microscopie :

- *Acinetobacter* is nogal polymorf, de celvorm is staafvormig tot coccoïd, soms grotendeels in duplo-vorm voorkomend. Hoewel gram-negatief, laat deze bacterie zich in de praktijk soms minder goed ontkleuren.

Dit heeft voor gevolg dat in sommige omstandigheden *Acinetobacter* zich bij gram-kleuring aanbiedt als een *Neisseria*, een streptokok of zelfs een stafylokok, wat natuurlijk voor stammen die men via een vloeibare voedingsbodem detecteert, zoals hemokulturen (geen kolonie-uitzicht) verraderlijk kan zijn.

Kweek en identificatie :

- *Acinetobacters* groeien goed op de courante voedingsbodems, o.m. McConkey agar.
- *Acinetobacters* behoren tot de grote groep van de **non-fermenters**, maar laten zich door enkele kenmerken afzonderen van de meeste andere : **oxidase-negatief** en **onbeweeglijk**. Een aantal andere kenmerken kunnen nuttig zijn om andere, meer zeldzame non-fermenters uit te sluiten (aanwezigheid van pigment, negatieve reactie voor indol, esculine, nitraat en DNAse). Men kan een groep glucose-verzurende en een deel glucose-niet verzurende onderscheiden, maar dit komt niet overeen met 2 verschillende species. Meestal hebben *acinetobacters* een visgeur, maar dit is toch niet altijd een betrouwbaar kenmerk, en misschien moeten we ons niet meer veel toeleggen op het snuffelen aan voedingsbodems.

Zoals reeds vermeld is correcte identificatie van *acinetobacter* soorten met fenotypische technieken nauwelijks doenbaar, ook niet met commerciële systemen : in een studie over het gebruik van API 20NE werd slechts voor 50 % van de stammen een correcte species-naam bekomen (Bernards e.a. 1996)

2.2.3. Klinisch belang

- Acinetobacters komen dus voor op de normale huid, in de omgeving, en kunnen ook geïsoleerd worden van gehospitaliseerde patiënten (maar het betreft zoals reeds vermeld andere species).
- De klinisch meest belangrijke soorten, die ook de meeste outbreaks veroorzaken en in zekere mate clonaal zijn (Europese clones), zijn *Acinetobacter baumannii* (= genomisch species 2) en *Acinetobacter* genomisch species 3.
- *Acinetobacter* is na *P. aeruginosa* de meest voorkomende non-fermenter gevonden in klinische stalen.
- Veel stammen die men bij patiënten isoleert betekenen slechts kolonisatie, maar infecties komen voor, typisch met een opportunistisch karakter.
- In sommige omstandigheden zien we epidemische verheffingen, of kan een stam quasi-endemisch aanwezig zijn : belang van hand-hygiëne, antibioticum-druk, eventueel bestaan van gemeenschappelijke bron (besmet toestel, besmette vloeistof...)
- *Acinetobacters* overleven lange tijd droge omstandigheden (meerdere weken, *A. radioresistens* tot meer dan 160 dagen)

2.2.4. Antibiogram

Sommige 'wilde' stammen zijn gevoelig aan vele antibiotica, maar toch bijna steeds resistent aan ampicilline, de oude cefalosporines en chlooramfenicol. Hospitaal-stammen zijn berucht voor de resistentie die bij hen voorkomt : in recente jaren zijn stammen beschreven die aan alle klassieke antibiotica resistent zijn.

DNA-technieken

- *Acinetobacter* soorten kunnen efficiënt geïdentificeerd worden door middel van genotypische technieken zoals ARDRA (Vaneechoutte 1995, Dijkshoorn 1998) en tDNA-PCR (Ehrenstein e.a. 1996).

BESLUIT :

- De rondgestuurde stam is een *Acinetobacter* genomisch species 2 of *A. baumannii* strictu sensu (ARDRA)
- Theoretisch is een correcte fenotypische identificatie van de meeste acinetobacters tot species-niveau niet mogelijk.

G. CLAEYS
M. VANECHOUTTE
(Laboratorium voor bacteriologie en virologie UZ Gent)

REFERENTIES

1. Dijkshoorn L., B. van Harselaar, I. Tjernberg, P.J.M. Bouvet, & M. Vaneechoutte. 1998. Evaluation of amplified ribosomal DNA restriction analysis for identification of *Acinetobacter* genomic species. *System. Appl. Microbiol.* 21: 33-39.
2. Seifert H., L. Dijkshoorn, P. Gerner-Smidt, N. Pelzer, I. Tjernberg, & M. Vaneechoutte. 1997. Distribution of *Acinetobacter* species on human skin: comparison of phenotypic and genotypic identification methods. *J. Clin. Microbiol.* 35: 2819-2825
3. Vaneechoutte M., L. Dijkshoorn, I. Tjernberg, A. Elaichouni, P. De Vos, G. Claeys, & G. Verschraegen. 1995. Identification of *Acinetobacter* genomic species by amplified ribosomal DNA restriction analysis. *J. Clin. Microbiol.* 33: 11-15.
4. Bouvet P.J.M. & P.A.D. Grimont. 1987. Identification and biotyping of clinical isolates of *Acinetobacter*. *Ann. Inst. Pasteur/Microbiol.* 138 : 569 – 578.
5. Bernards A.T., J. van der Toorn, C.P.A. van Boven, L. Dijkshoorn. 1996. Evaluation of the ability of a commercial system to identify *Acinetobacter* genomic species. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 15 : 303 – 308.
6. Ehrenstein B., A.T. Bernards, L. Dijkshoorn, P. Gerner-Schmidt, K.J. Tower, P.J.M. Bouvet, F.D. Daschner & H. Grundmann. 1996. *Acinetobacter* species identification by using tRNA spacer fingerprinting. *J. Clin. Microbiol.* 34, 2414-2420.

2.3. Cultuur M/1711

geïsoleerd uit een bronchusaspiraats bij een patiënt onder kunstmatige beademing, is een *Alcaligenes faecalis*.

2.3.1. Taxonomie

Organismen van het genus *Alcaligenes* zijn niet vergistende gramnegatieve staafjes. Ze zijn beweeglijk en oxydase positief. Ze komen voor als saprofieten in water en bodem. Ze worden zelden geïsoleerd uit menselijke stalen van respiratoire of gastro-intestinale oorsprong. Volgens J.P.Steinberg en C.Del Rio (in Mandell 2000) zijn een drietal species klinisch relevant: *Alcaligenes faecalis* (andere naam: *Alcaligenes odorans* omdat sommige stammen een fruitgeur hebben), *Alcaligenes piechaudii* en *Alcaligenes xylosoxidans* waarvan 2 subspecies gekend zijn: *xylosoxidans* (vroeger *Achromobacter xylosoxidans*) en *denitrificans*. Volgens Murray onderscheidt men een asaccharolytische groep die *A. faecalis*, *Achromobacter piechaudii*, *Achromobacter xylosoxidans* subspecies *denitrificans* bevat en een saccharolytisch species *Achromobacter xylosoxidans* subspecies *xylosoxidans*. Blijkbaar zijn dus de 2 genera *Alcaligenes* en *Achromobacter* op fylogenetisch en biochemisch vlak nauw verwant en zijn ze verwant aan het genus *Bordetella*.

A. xylosoxidans is de klinisch meest belangrijke bacterie en is voornamelijk geassocieerd met nosocomiale infecties (waaronder sepsis) en met mucoviscidose. *A. faecalis* is eveneens geassocieerd met een hospitaalverblijf. Deze kiem werd geïsoleerd uit bloed, respiratoire secreties en urine. Buiten de bacteriëmieën is zijn pathogene rol onduidelijk.

2.3.2. Identificatie

De bacteriën van dit genus groeien op de klassieke voedingsbodems bij 35°C. Na een incubatie van 24 tot 48 uur vormen zij kleine opake en niet gepigmenteerde kolonies. *Alcaligenes faecalis* vormt kolonies met een smalle, onregelmatige rand met soms een spiegelei aspect (dens midden omringd met een onregelmatige doorschijnende zone). De groei is strikt aëroob. Op bloedagar zijn sommige stammen vergroenend. Ze groeien op een MacConkey agar. Ze reduceren geen nitraten tot nitrieten, maar reduceren wel nitrieten. Op een API 20NE galerij verkrijgt men het profiel 0000057 (*Alcaligenes faecalis* 1 %id. >98%).

2.3.3. Gevoeligheid voor antibiotica

A. faecalis stammen zijn gevoelig voor carbapenems, voor combinatiepreparaten met beta-lactamase remmers, voor piperacilline, voor trimethoprim-sulfamethoxazole en voor de meeste cefalosporines. De gevoeligheid ten opzichte van

fluorochinolones, aztreonam en aan aminoglycosiden is variabel.
De stammen zijn resistent tegen amoxicilline en ticarcilline

2.3.4. Opmerking

De verwarring omtrent de juiste benaming blijkt nog in een publicatie van 1997: de CDC benaming *Alcaligenes faecalis* type I zou synoniem zijn met *A. piedchaudii* en de CDC *Alcaligenes faecalis* type II zou overeenkomen met *Bordetella avium*. Om de zaken nog moeilijker te maken verscheen recent een publicatie van eigen bodem waarin via moleculaire technieken een reeks stammen van *Alcaligenes faecalis* - waaronder ook stammen uit klinische stalen - toegeschreven worden aan het genus *Ralstonia*. Fenotypisch zouden deze isolaten gekenmerkt worden door - onder andere - een negatieve nitrietreductie en een positieve malaatassimilatie (appelzuur): deze laatste test zit in de API 20NE galerij. Het opgestuurde isolaat geeft in een commerciële kit voor differentiatie van *Neisseria* spp. (Neisseria 4 H® Sanofi-Pasteur) geen reductie van nitriet en in de API galerij een positieve assimilatie van malaat. Waardoor de definitieve identificatie onzeker blijft.

I. SURMONT
(Heilig Hartziekenhuis-VZW Roeselare)
P. DE MOL
(CHU de Liège)

REFERENTIES

1. Murray P.R. et al. Manual of Clinical Microbiology. Seventh Edition. 1999. American Society for Microbiology. Washington D.C., p 545-546.
2. Mandell G.L. et al. Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. Fifth Edition. 2000. Churchill Livingstone, p. 2465-2466.
3. Bizet J. and Bizet C. Strains of *Alcaligenes faecalis* from Clinical Material. J. Infect. 1997, 35: 167-169.
4. Coenye T et al. Classification of *Alcaligenes faecalis*-like isolates from the environment and human clinical samples as *Ralstonia gilardii* sp. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. 1999, 49: 405-413.

2.4. Cultuur M/1142

afkomstig uit een hemocultuur van een patiënt met ernstige angina bevat een *Fusobacterium necrophorum*.

Dit is een didactisch monster.

2.4.1. Taxonomie

Het genus *Fusobacterium* bestaat uit obligaat anaërobe onbeweeglijke gram negatieve staven. Het belangrijkste eindproduct bij de afbraak van koolhydraten en peptone is boterzuur.

De bacteriën van de typische species, *F. nucleatum* zijn spoelvormig. Dit geldt niet voor alle species binnen het genus. Bacteriën van de species *F. necrophorum* zijn pleomorf. Er zijn meerdere species waarvan de bacteriën spoelvormig zijn, die niet behoren tot het genus *Fusobacterium*.

Binnen de species *F. necrophorum* worden twee subspecies onderscheiden. *F. necrophorum* subsp. *necrophorum* is lipase positief, produceert hemagglutinine en behoort tot biovar A. *F. necrophorum* subsp. *funduliforme* is lipase negatief, produceert geen hemagglutinine en behoort tot biovar B. *F. pseudonecrophorum* werd voorgesteld als biovar C maar wordt nu beschouwd als synoniem van *F. varium*. (1,2).

2.4.2. Klinische betekenis

Fusobacterium necrophorum behoort tot de normale flora van de orofarynx, de gastroïntestinale en de urogenitale tractus.(3)

Fusobacterium necrophorum is voornamelijk bekend als veroorzaker van anaërobe postangineuze sepsis beschreven door Lemierre in 1936. Het syndroom is gekenmerkt door pharyngotonsillitis en/of peritonsillaire infectie gevolgd door een unilaterale zwelling en pijn langs de m. sternocleidomastoïdeus ten gevolge van thrombophlebitis van de vena jugularis interna. Binnen een week kan de patiënt een ernstige sepsis ontwikkelen door *Fusobacterium necrophorum* met rillingen, hoge koorts en metastatische infecties van de longen en minder vaak van gewrichten, beenderen, lever of hersenen. Andere mogelijke primaire infecties zijn otitis, mastoiditis of infecties van de tanden.

De ziekte komt voornamelijk voor bij voordien gezonde kinderen en jonge volwassenen. De mortaliteit van de ziekte is 4 tot 18 %. Sinds het gebruik van antibiotica is de ziekte heel zeldzaam. Voor de periode 1990 – 1995 was de incidentie in Denemarken 0.75 per miljoen inwoners per jaar.(3,4)

Patiënten met sepsis door *F. necrophorum* zonder het syndroom van Lemierre hebben een andere primaire focus, bijvoorbeeld huid, gastroïntestinale of urogenitale tractus. Dit komt ongeveer evenveel voor als het syndroom van Lemierre. Meestal zijn er

voorbeschikkende factoren zoals kanker, diabetes of alcoholverslaving. De patiënten zijn ouder. De gemiddelde leeftijd is 60 jaar.(3,4,5)

Andere infecties, die door *F. necrophorum* kunnen worden veroorzaakt zijn endocarditis, meningitis, mastoïditis, chronische sinusitis en otitis.(3)

2.4.3 Kultuur en identificatie

F. necrophorum wordt geïsoleerd op universele voedingsbodems zoals Schaedler of Brucella agar met bloed in strikt anaërobe omstandigheden. *F. necrophorum* sterft heel snel na blootstelling aan zuurstof in de omgevingslucht. De petriplaten moeten snel anaëroob worden geïncubeerd (binnen 20 minuten).

Groei van anaërobe bloedkweken wordt gemiddeld na drie dagen incubatie gedetecteerd. Op bloedagar vormt *F. necrophorum* na 24 uur incubatie grijze, transluscente tot opake, ronde kolonies van 1 tot 2 mm diameter. De kolonies zijn convex of hebben een verheven centrum met een platte rand. De meeste stammen veroorzaken α of β hemolyse.

De gramkleuring toont gram negatieve pleomorfe bacteriën van 0.5 tot 0.7 (soms gezwollen tot 1.8) μm breed en tot 10 μm lang. De uiteinden zijn rond of afgeplat. De vorm varieert van coccoïd tot lange filamenten. Na kweek in vloeibare media ziet men meer lange filamenten met korrelige inclusies. In oude culturen en na groei op vaste bodems zijn staafjes de meest voorkomende vorm.(2)

Fusobacteria spp. worden geremd rond het schijfje 10 μg colistine en 1000 μg kanamycine en niet geremd rond het schijfje 5 μg vancomycine. Catalase en nitraat reductie zijn negatief. Ze hebben een typische ranzige geur door de productie van boterzuur.

F. necrophorum is indol positief. De meeste stammen worden geremd door gal en produceren lipase. Deze testen samen met de pleomorfe vorm op gramkleuring en hemolyse op bloedagar volstaan om de lipase positieve *F. necrophorum* subsp. *necrophorum* te identificeren. Om *F. necrophorum* subsp. *funduliforme* te onderscheiden van *F. varium* zijn bijkomende testen nodig.(1,2)

Snelle en betrouwbare definitieve identificatie is mogelijk met enzymatische commerciële systemen zoals RAPID ID 32 A en BBL Crystal Anaerobe of door middel van gaschromatografie.(1,2,6)

Species	Spoelvormig	Indol	Gal resistent	lipase
F. nucleatum	+	+	-	-
F. necrophorum	-	+	- ⁺	+ ⁻
F. varium	-	+ ⁻	+	V ¹

¹ kan positief worden na 5 tot 7 dagen incubatie

2.4.4 Gevoeligheid aan antibiotica

F. necrophorum is gevoelig aan metronidazole, clindamycine en penicilline. Macroliden hebben geen goede activiteit. Voorkeursbehandeling voor Lemierre's syndroom is metronidazole gecombineerd met penicilline gedurende meerdere weken . In geval van thrombophlebitis van de vena jugularis interna is chirurgie noodzakelijk.(3,4)

K. MAGERMAN
(Virga Jesseziekenhuis Hasselt)

REFERENTIES

1. Bacteroides, Porphyromonas, Prevotella, Fusobacterium, and Other Anaerobic Gram-Negative Rods and Cocci in : Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenoer FC, Tenover RH (eds.). Manual of Clinical Microbiology, 7th edition, American Society for Microbiology, Washington DC, 1999, pp 690-711
2. Summanen P, Baron EJ, Citron DM, Strong CA, Wexler HM, Finegold SM. Wadsworth anaerobic bacteriology manual, fifth edition, Star publishing Company, 1993
3. Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (Eds). Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases, fifth edition, Churchill Livingstone, 2000
4. L.H. Hagelskjaer, J. Prag, J. Malczynski, J.H. Kristensen: Incidence and Clinical Epidemiology of Necrobacillosis, including Lemierre's Syndrome, in Denmark 1990-1995. Eur. J. Clin. Microbiol. Inf. Dis., 1998, 17, 561-565
5. M. Ieven, K. Vael, M. De Mayer, A. De Schepper, S. Pattyn: Three Cases of *Fusobacterium necrophorum* Septicemia. Eur. J. Clin. Microbiol. Inf. Dis., 1993, 12, 705-706
6. J.J. Cavallaro, L.S. Wiggs, and J.M. Miller: Evaluation of the BBL Crystal Anaerobe Identification System. J. Clin. Microbiol 1997; 35: 3186-3191

III. RESULTATEN VAN DE IDENTIFICATIES (N=271)

3.1 Cultuur M/1670 *Streptococcus anginosus* (hemocultuur) N=271

<u>Streptococcus anginosus</u>	13	(4,8%)
* <u>Streptococcus intermedius</u>	21	(7,7%)
* <u>Streptococcus milleri</u>	66	(24,4%)
* <u>Streptococcus constellatus</u>	121	(44,7%)
A.baumannii + S. constellatus	1	
Streptococcus mitis	15	
Streptococcus oralis	1	
Streptococcus salivarius	1	
Streptococcus sanguis	2	
Streptococcus acidominimus	2	
Niet-hemolytische streptococcus	2	
Viridans streptococci	3	
Streptococcus sp	4	
Enterococcus faecalis	1	
Gemella haemolysans	2	
Gemella morbillorum	3	
Lactococcus cremoris	1	
Leuconostoc pseudomesenteroides	1	
Rhodococcus equi	1	
Aerococcus viridans	1	
Providencia stuartii	1	
Anaerobe gram+ coccen	1	
Gecontamineerd staal	1	
Geen groei	1	
Geen antwoord	5	

* Aanvaardbare benamingen cfr commentaar p. 2 en p. 4

3.2 Cultuur M/1871 *Acinetobacter baumannii* (urine) N=271

<u>Acinetobacter baumannii</u>	244	(90,0%)
* <u>Acinetobacter anitratus</u>	3	(1,1%)
** <u>Acinetobacter calcoaceticus</u>	16	(5,9%)
** <u>Acinetobacter sp</u>	6	(2,2%)
Chryseomonas luteola	2	

* Synoniem

** Aanvaardbare identificatie

3.3. Cultuur M/1672 *Alcaligenes faecalis* (bronchus aspiraats)
N=271

<u>Alcaligenes faecalis</u>	244	(90,0%)
* <u>Alcaligenes odorans</u>	13	(4,8%)
** <u>Alcaligenes sp</u>	1	(0,4%)
Alcaligenes xylooxidans	1	
Pseudomonas aeruginosa	2	
Pseudomonas alcaligenes	1	
Pseudomonas fluorescens	1	
Pseudomonas putida	2	
Pseudomonas sp	1	
Burkholderia cepacia	1	
Flavimonas oryzihabitans	1	
Oligella urethralis	1	
Oxidase + non fermenter	1	
Zonder antwoord	1	

* is een synoniem, zie pag 11

** Aanvaardbare identificatie

3.4 Cultuur M/1142 *Fusobacterium necrophorum* (hemocultuur)
N=271

<u>Fusobacterium necrophorum</u>	140	(51,7%)
Fersubacterium nicroforum	1	
F. necrophorum + Propionibacterium	1	
Fusobacterium nucleatum	1	
Fusobacterium varium	1	
Fusobacterium sp	32	
Porphyromonas sp	2	
Porphyromonas endodontalis	1	
Prevotella disiens	1	
Prevotella intermedia	7	
Prevotella sp	2	
Eubacterium	1	
Bacteroides corrodens	1	
Bacteroides sp	7	
Clostridium sp	1	
Corynebacterium CDC groep G2	2	
Clostridium	1	
Acinetobacter baumannii	1	
Acinetobacter sp	1	
Actinomycetales sp	1	
Enterobacter aerogenes	1	
Staphylococcus epidermidis	1	
Anaeroob gram+	2	
Anaeroob gram-	2	
Staaftjes gram-	2	
Gecontamineerd staal	1	

Geen groei
Geen antwoord

42
15

IV. ANTIBIOGRAM

Het type antibiogram werd opgemaakt door verschillende experten volgens de twee meest gebruikte methoden, die als referentie kunnen dienen : de schijfjesmethode volgens NCCLS en ROSCO (NEO-SENSITABS).

4.1 Cultuur M/1871 *Acinetobacter baumannii* (urine)

	Verwacht resultaat	S	I	R	Niet getest
cefazoline	R	0	1	261	9
fluorochinolone	S	261	2	0	8
ceftazidime	S	233	19	10	9
nitrofurantoïne	R	2	0	266	3

IV. PARASITOLOGIE

5.1. De monsters

Elke deelnemer ontving twee gefixeerde bloeduitstrijkjes, P/1396 en P/1834.

Het uitstrijkje P/1396 bevat jonge en oude trofozoïeten van *P. falciparum*. Ook zeldzame gametocyten van *P. falciparum* zijn aanwezig. De uitstrijkjes werden gemaakt in het malariareferentielaboratorium van de 'South African Institute for Medical Research', Johannesburg, in Zuid- Afrika. Als diagnose werd opgegeven: *P. falciparum*.

Parasitemie: ± 0.3 % van de rode bloedcellen zijn geïnfecteerd.

Het uitstrijkje P/1834 bevat jonge trofozoïeten en zeer zeldzame gametocyten van *P. falciparum*.

Parasitemie: $\pm 0,4$ % van de rode bloedcellen zijn geïnfecteerd.

5.2. De resultaten

P/1396

Volgende resultaten werden gerapporteerd:

Parasiet	Aantal labo's
<i>Plasmodium sp</i>	7
<i>Plasmodium sp</i> + <i>P.falciparum</i>	10
<i>P. sp</i> + <i>P.falciparum</i> + <i>P. malariae</i>	4
<i>P.sp</i> + <i>P.ovale</i>	1
<i>Babesia sp</i>	1
<i>Plasmodium falciparum</i>	122
<i>P.falicparum</i> + <i>P. malariae</i>	39
<i>P. falciparum</i> + <i>P.ovale</i>	2
<i>P.falciparum</i> + <i>P. vivax</i>	1
<i>P.malariae</i>	38
<i>P.malariae</i> + <i>P. vivax</i>	1
<i>P.ovale</i>	9
<i>P. vivax</i>	6
Totaal	241

Meerdere ontwikkelingsstadia werden vermeld; trofozoïeten, jonge schizonten, andere rijpe schizonten en gametocyten.

P/1834

Parasiet	Aantal labo's
<i>Plasmodium sp</i>	8
<i>Plasmodium sp+P.falciparum</i>	3
<i>P.falciparum</i>	206
<i>P.falciparum + P.malariae</i>	1
<i>P.falciparum + P.vivax</i>	1
<i>P.malariae</i>	18
<i>P.ovale</i>	1
<i>P. vivax</i>	7
Totaal	245

Hier ook werden meerdere ontwikkelingsstadia vermeld, maar vooral trofozoïeten en zeldzame gametocyten.

5.3. Bespreking

5.3.1 Uitstrijkje P/1396

De kwaliteit van deze uitstrijkjes was niet optimaal en waarschijnlijk is dit de hoofdoorzaak van de variëteit aan antwoorden.

In het referentielaboratorium van het Instituut voor Tropische Geneeskunde werden de uitstrijkjes door 4 verschillende medewerkers onderzocht. De diagnose *P. falciparum* werd vooral gebaseerd op:

1. Aanwezigheid van zeldzame gametocyten (typische bananen vorm).
2. Aanwezigheid van jonge en oude trofozoïeten (morfologisch lichtjes afwijkend als gevolg van partiële profylaxis of bloed dat reeds enkele uren oud was op het ogenblik dat de uitstrijkjes gemaakt werden).
3. De geparasiteerde rode bloedcellen zijn klein tot normaal.
Er is geen aanwezigheid van Schüffnerkorreling in de geparasiteerde rode bloedcellen.

5.3.2. Uitstrijkje P/1834

Deze uitstrijkjes zijn van een betere kwaliteit en de identificatie van de parasiet was gemakkelijker. Ook hier werden de uitstrijkjes in het referentielaboratorium van het Instituut voor Tropische Geneeskunde (ITG) door 4 medewerkers onderzocht en de diagnose *P. falciparum* werd vooral gebaseerd op:

1. aanwezigheid van zeer zeldzame gametocyten (typische bananen vorm).

2. aanwezigheid van meestal jonge trofozoïeten, met regelmatig meerdere parasieten per rode bloedcel; ook twee chromatinekorrels worden frekwent gevonden. De perifere of tegen de membraan gelegen trofozoïeten (accolé vormen), typisch voor *P. falciparum*, komen ook regelmatig voor.
3. de geparasiteerde rode bloedcellen zijn klein tot lichtjes vergroot.
4. Schüffnerkorreling is niet aanwezig (deze korreling zou men bij *P. vivax* en *P. ovale* toch meestal moeten kunnen terugvinden).

Dit uitstrijkje werd nog maar pas rondgestuurd als H 1833 in het kader van de externe kwaliteitsevaluatie hematologie; in de enquête 03/1999. 90 % van de deelnemende laboratoria hadden toen de malaria parasiet gevonden. Nu hebben alle deelnemende laboratoria in dit uitstrijkje malaria parasieten gezien.

5.3.3. ALGEMENE OPMERKINGEN

Voor het uitstrijkje P/1834 zijn er 26 (11%) en laboratoria van het uitstrijkje P/1396 zijn er 55 (22%) laboratoria die geen *P. falciparum* gevonden hebben. Dit kan belangrijke gevolgen hebben voor de behandeling. De behandeling van *P. falciparum* verschilt totaal van deze van de drie andere malaria soorten.

Schema's van behandeling vindt men o.a. in: "The Sanford Guide to Antimicrobial Therapy" (Belgian edition); ook kan een brochure aangevraagd worden bij het Instituut voor Tropische Geneeskunde, Polikliniek, Dienst Reisadvies.

We wijzen er nogmaals op dat het zeer belangrijk is bij de diagnose van malaria een onderscheid te maken tussen *P. falciparum* en de drie andere species vanwege de verschillende behandelingen. Daarenboven kan een infectie met *P. falciparum* levensbedreigend zijn, en moet de diagnose correct en snel gesteld worden. Voor een confirmatie van de species identificatie kan met steeds beroep doen op het referentielaboratorium voor malaria van het ITG. Het resultaat wordt steeds dezelfde dag bevestigd door een FAX of e-mail.

Voor identificatie stuurt men op:

- een niet gekleurde dikke druppel
- een gefixeerd niet gekleurd uitstrijkje
- 0.5 ml EDTA bloed
- 200 µl serum of plasma

EDTA bloed en serum worden gebruikt om eventueel de morfologische identificatie aan te vullen met een antigeen bepaling van *P. falciparum* of van de andere species en om eventueel een antistoftitratie met de verschillende plasmodia antigenen uit te voeren.

Formulieren voor het opsturen van monsters naar het referentielaboratorium kunnen verkregen worden bij het Wetenschappelijk Instituut Volksgezondheid-Louis Pasteur, Dienst Epidemiologie.

T. VERVOORT
(Instituut voor Tropische Geneeskunde Laboratorium Klinische Biologie)

Wij danken de Dr. Leigh Dini van de SAIMR, Johannesburg, RSA, voor het leveren van de gefixeerde bloeduisrijkjes.

VI. HEPATITIS B EN C SEROLOGIE

6.1. Beschrijving van de monsters

Twee gevriesdroogde plasmamonsters :

- S/2088 anti-HBs positief
- S/2089 anti HBs, anti-HBc en HCV ab positief

6.2. De deelnemers

In het totaal namen 250 laboratoria deel aan deze enquête.

6.3. Gebruikte reagentia

Volgende tabel geeft weer in aantal welke reagentia door de deelnemers gebruikt werden :

Methode	Fabrikant	AgHBs	Anti-HBs	Anti-HBc	HCVab
MEIA	Abbott	111	119	111	141
EIA	Abbott	8	6	7	5
	Ortho	4	5	2	3
	Roche	5	6	5	3
	DiaSorin	4	4	4	
	Sanofi Pasteur	17	15	14	20
	bioMérieux 999	2	1		1
ELISA	Dade	3	3	4	
	Organon	1	1	1	
	Ortho	2	1		17
	Roche	2	2	2	1
	bioMérieux	1	2	3	
	DiaSorin	8	4	8	
	Sanofi	2	2	1	5
	Abbott				1
	Innogenetics 999				7 3
ELFA	bioMérieux	35	34	41	
	Sanofi	1	1	1	1
LIA	DPC	3	3	2	
	999	1	1	1	1
RIA	Abbott	1			
	DiaSorin	12	11	11	
999	Abbott	1			
	Ortho	2	5	1	5
	Roche	14	2	12	
	Sanofi	2	1	1	3
?	Abbott	1	1	1	2
999	999	1	1	1	
?	?	1	8	16	31

999 = andere - ? = niet vermeld - LIA = Luminescence ImmunoAssay

6.4. Resultaten

6.4.1. Verdeling van de resultaten voor het monster S/2088 N=250

Resultaat	AgHBs	AntiHBs	AntiHBc	HCVab
Geen	3	20	15	31
+	0	229	8	4
+/-	1	0	16	1
-	246	1	211	214

Twijfelachtig resultaat voor agHBs met Abbott MEIA.

Negatief resultaat voor antiHBs met bioMérieux ELFA.

Positieve resultaten voor antiHBc ; 7 met Abbott MEIA en 1 met Dade Behring elisa.

Twijfelachtige resultaten voor antiHBc ; 15 met Abbott MEIA en 1 met Dade Behring elisa.

Positieve resultaten voor HCVab ; 1 met EIA en 1 met MEIA van Abbott, + 2 staalverwisselingen met S/2089

Twijfelachtig resultaat voor HCV ab met EIA van Ortho Diagnostics.

Index/DO van de resultaten bekomen met Abbott MEIA voor anti HBc

AntiHBc	Resultaat	Aantal resultaten	Max	Min	Med
	+	6	0,982	0,769	0,892
	+/-	15	1,091	0,945	0,995
	-	90	1,52	0,04	1,140

6.4.2. Verdeling van de resultaten voor het monster S/2089 N=250

Resultaat	AgHBs	AntiHBs	AntiHBc	HCVab
Geen	7	20	15	29
+	3	221	224	218
+/-	3	8	3	0
-	237	1	8	3

3 positieve resultaten voor agHBs met EIA en MEIA van Abbott.

3 twijfelachtig resultaten voor agHBs met MEIA en RIA van Abbott.

8 twijfelachtige resultaten voor antiHBs met DiaSorin, MEIA, EIA en RIA, met Sanofi Pasteur (2), met EIA van Dade Behring, en MEIA Abbott.

3 twijfelachtige resultaten voor antiHBc met DiaSorin, EIA, Elisa en RIA.

Negatieve resultaten voor antiHBC ; MEIA Abbott (8)

Negatieve resultaten voor HCVab; 1 met EIA Abbott en 2 staalverwisselingen met S/2088

Index/DO van de resultaten bekomen met Abbott, MEIA voor anti-HBc

AntiHBc	Resultaat	Aantal resultaten	Max	Min	Med
	-	8	0,122	0,05	0,09
	+	104	1,04	0,068	0,103

6.4.3. Weergave van de interpretaties voor S/2088

2 laboratoria gaven geen interpretatie

	Geen opmerking	Complementaire testen	Nieuwe afname > 3 weken	Geen confirmatie nodig
Negatief voor HepB	1	4	1	1
Negatief voor HepC	15	1	3	38
Acute of chronische Hep B			1	
Hep B immuniteit door vaccinatie	41	10	9	163
Hep B immuniteit door natuurlijke infectie	2	3		20
Hepatitis C	1	1		1

6.4.4. Weergave van de interpretaties voor S/2089
100 laboratoria gaven geen interpretatie

	Geen opmerking	Complementaire testen	Nieuwe afname > 3 weken	Geen confirmatie nodig
Negatief voor HepB		3		1
Negatief voor HepC	1			
Acute of chronische Hep B		4	1	
Hep B immuniteit door vaccinatie	2	1	1	2
Hep B immuniteit door natuurlijke infectie	20	88	5	64
Hepatitis C	19	115	11	46

6.5. Besluit

De klinische informatie voor het monster S/2088 specificeert dat het over een persoon gaat die zich prikte met een naald. De vraag is bijgevolg: is de persoon al of niet immuun voor hepatitis B (HBV). Indien de persoon immuun is voor HBV zijn er twee mogelijkheden: de persoon werd gevaccineerd of heeft vroeger een HBV infectie doorgemaakt. Bij een immuniteit door vaccinatie moet men de titer van de HBs antilichamen bepalen. Een immunocompetent persoon wordt geacht beschermd te zijn indien de anti-HBs titer > 10 UI/L bedraagt (een hogere titer wordt evenwel verkozen om een langerdurende bescherming te bereiken). Bij immuniteit door een vroeger doorgemaakte infectie, zal men naast anti-HBs antilichamen ook anti-HBc antilichamen terugvinden. Bij een chronische drager van het hepatitis B virus vinden we het HBs antigeen en de anti-HBc antilichamen terug. In het algemeen zijn de anti-HBs antilichamen negatief, soms kan een lage titer teruggevonden worden. Een chronische drager van het HBV loopt geen extra risico door de prik, ook al is hij/zij niet beschermd tegen hepatitis B.

Het serum S/2088 bevatte uitsluitend anti-HBs antilichamen, dit pleit voor een immuniteit te wijten aan een vaccinatie. Bij afwezigheid van vaccinatie dient men voorzichtig te zijn bij de interpretatie van deze test. Het kan gaan om een vals positief resultaat of om residuele antilichamen na verdwijning van anti-HBc.

Het serum S/2089 werd afgenomen bij een persoon met een chronische hepatitis. Een ongelukkige typefout zorgde voor een vraagteken na 'chronische hepatitis'. Het laboratorium voor virologie/serologie kan uiteraard niet uitmaken of een persoon chronische hepatitis heeft, maar kan

wel de oorzaak van de aandoening bepalen. Het hepatitis B en het hepatitis C virus (HCV) zijn twee virale oorzaken die in ons land frequent voorkomen als oorzaak van een chronische hepatitis. Bij chronische dragers van het hepatitis B virus, kunnen we het HBs antigeen en de anti-HBc antilichamen terugvinden in het serum.

Bij patiënten die lijden aan een chronische hepatitis C vinden we HCV antilichamen terug. In het serum S/2089 was de test voor de anti-HCV antilichamen positief. De patient vertoonde tevens een serologisch profiel dat wees op een vroeger doorgemaakte HBV infectie: een positieve anti-HBc en een positieve anti-HBs test. De aanwezigheid van HCV antilichamen betekent dat de chronische hepatitis zeer waarschijnlijk te wijten is aan een infectie met het HCV. De positieve predictieve waarde (PPW) van een test verschilt sterk van de pretestwaarschijnlijkheid van de aandoening of infectie. De PPW van een HCV antilichaamtest, die wordt aangevraagd in het kader van een diagnose van een chronische hepatitis, zal veel hoger zijn dan dezelfde test, aangevraagd in het kader van een routine screeningsprocedure zoals bijvoorbeeld bij bloedbanken. Omwille van het belang van een correcte diagnose zullen velen uit voorzorg verkiezen om de positieve test met behulp van bijkomende tests te laten bevestigen.

P. GOUBAU
(Cliniques Universitaires St Luc Bruxelles)