

## I. ALGEMENE BEMERKINGEN

Voor de derde evaluatie van het jaar 2000 (enquête 2000/3) werd volgend materiaal verzonden op 06 oktober 2000.

### 1.1. Drie gelyofiliseerde monsters voor identificatie.

Het betrof 2 reïnculturen en 1 mengcultuur. Voor 2 monsters werden de resultaten van de gevoeligheidstesten tegen respectievelijk 3 en 9 antibiotica gevraagd.

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

### 1.2. Twee fecessuspensie in formol voor parasitologisch onderzoek.

### 1.3. Twee vloeibare serummonsters voor het opsporen van antistoffen tegen HIV.

#### AANTAL DEELNEMERS

Het aantal evalueerbare antwoordbulletins bedroeg:

- |                                       |     |
|---------------------------------------|-----|
| 1. Voor identificatie en antibiogram: | 263 |
| 2. Voor parasitologie:                | 245 |
| 3. Voor HIV antistoffen:              | 252 |

## II. IDENTIFICATIES

### 2.1 Cultuur M/2591

Bevatte een mengsel van viridans streptokokken en *Streptococcus pyogenes*. De klinische betekenis en de taxonomie van *S. pyogenes* werden in het rapport 99/1 uitvoerig beschreven.

#### 2.1.1. Identificatie

De identificatie van *S. pyogenes* stelde weinig problemen zoals blijkt uit de zeer goede score (97%).

De kolonies (1 à 2 mm) vertoonden een duidelijke  $\beta$ -hemolyse. Er was geen inhibitiezone rond een schijfje met 0,04 IE bacitracine, maar een positieve test voor pyrrolidonyl aminopeptidase en het groep-A antigeen was aanwezig. Andere  $\beta$ -hemolytische streptokokken, die kleinere kolonies vormen, kunnen eveneens het groep A antigeen bevatten. Zij behoren tot de "Anginosus-groep" en zijn zeldzaam. Het onderscheid kan worden gemaakt op basis van een negatieve test voor pyrrolidonyl aminopeptidase (positief voor *S. pyogenes*, negatief voor de "Anginosus-groep") (4).

#### 2.1.2. Gevoeligheid voor antibiotica

Zowel de NCCLS als ROSCO (Tabel 1) hebben specifieke normen opgesteld voor de diskdiffusie met streptokokken andere dan *Streptococcus pneumoniae* (2, 3).

*S. pyogenes* is steeds gevoelig voor penicilline-G, de andere  $\beta$ -lactam antibiotica en vancomycine. Er werden stammen beschreven met tolerantie voor penicilline-G (6). De NCCLS acht het routinematig testen van *S. pyogenes* met penicilline-G niet nodig. Wel worden er criteria opgegeven, die kunnen gebruikt worden voor epidemiologische surveillance. De NCCLS beveelt aan om alle "niet-penicilline-gevoelige" stammen door te zenden naar een referentielabo (in ons land: Prof. Dr. H. Goossens, UIA, Microbiologie, Wilrijkstraat 10 in 2650 Edegem).

Resistentie aan andere antibiotica nam de laatste jaren aanzienlijk toe. Tetracyclineresistentie is geen zeldzaamheid. Aangezien macroliden steeds aanzien worden als alternatieven voor  $\beta$ -lactam antibiotica is het vooral deze vorm van resistentie die veel aandacht geniet. Het oudst gekende resistentie mechanisme aan macroliden bij *S. pyogenes* is de resistentie, die veroorzaakt wordt door methylering van de receptor. Deze vorm van resistentie (MLS<sub>B</sub>-fenotype genaamd) zorgt ervoor dat er geen binding meer optreedt tussen het macrolide en de receptor en treft zowel de macroliden met een ring structuur met 14 atomen (clarithromycine, dirithromycine, erythromycine, roxithromycine), de macroliden met een ring structuur met 15 atomen (azithromycine), de macroliden met een ring structuur met 16 atomen (miocamycine en spiramycine), de lincosamides (clindamycine en lincomycine) en de streptogramine B antibiotica. Deze resistentie kan constitutioneel (meeste gevallen) of inductief (enkel de moleculen met een ring structuur met 14 of 15 atomen zijn inductoren) zijn. Een tweede resistentie-mechanisme (M-fenotype) is het gevolg van een verhoogde efflux en

verleent enkel resistentie aan de moleculen met een ring structuur met 14 of 15 atomen. Stammen met deze laatste vorm van resistentie vertonen gewoonlijk lagere MIC-waarden dan deze met het MLS<sub>B</sub>-fenotype.

Volgens de NCCLS is het resultaat van erythromycine predictief voor azithromycine, clarithromycine en dirithromycine. Door het simultaan uittesten van erythromycine met clindamycine kan men in veel gevallen het resistentiemechanisme vermoeden: M-fenotype (erythromycine R en clindamycine S) en constitutief MLS<sub>B</sub>-fenotype (erythromycine R en clindamycine R). Induceerbare macrolideresistentie vertaalt zich door een deuk (*blunting*) in de zone rond clindamycine in de nabijheid van het erythromycine schijfje (5). In ons land komt bij *S. pyogenes* het M-fenotype meer voor dan het MLS<sub>B</sub>-fenotype. Het MLS<sub>B</sub> fenotype schijnt echter aan belang te winnen (1). De ketoliden (telithromycine en anderen) zijn actief op de stammen met het M-fenotype en op de meeste stammen met het MLS<sub>B</sub> fenotype (1).

Ook de Belgische *Infectious Diseases Advisory Board* (5) stelt voor om gezien de toename van resistentie bij *S. pyogenes* de gevoeligheid voor macroliden na te gaan met de dubbele disk methode (erythromycine en clindamycine).

M. LONTIE (MCH-Leuven)

Tabel 1. Zone diameters voor streptokokken andere dan *Streptococcus pneumoniae*

	NCCLS (2)(mm)			ROSCO (3)(mm)			MIC-breekpunten (mg/l)	
	R	I	S	R	I	S	R	S
Ampicilline*	18	19-25	26	20	21-29	30	8	0,25
Erythromycine	15	16-20	21	23	24-27	28	1	0,25
Clindamycine**	15	16-18	19	23	24-27	28	1	0,25
Tetracycline***	18	19-22	23	22	23-25	26	8	2
Vancomycine****	-	-	17	-	-	20	-	1

\* Geldt enkel voor  $\beta$ -hemolytische streptokokken, niet voor viridans streptokokken.

ROSCO ampicillineschijfje met een lading van 33  $\mu$ g

\*\* ROSCO clindamycine schijfje met een lading van 25  $\mu$ g

\*\*\* ROSCO tetracyclineschijfje met een lading van 80  $\mu$ g.

\*\*\*\* ROSCO vancomycineschijfje met een lading van 70  $\mu$ g.

## **REFERENTIES**

1. Descheemaeker P, Chapelle S, Lammens C. *et al.* 2000. Macrolide resistance and erythromycin resistance determinants among Belgian *Streptococcus pyogenes* and *Streptococcus pneumoniae* isolates. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 45:167-173.
2. NCCLS. 2000. M2-A7. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard-Seventh Edition.
3. ROSCO. 2000. User's Guide: Neo-Sensitabs, Susceptibility Testing.
4. Ruoff KL, Whiley RA & Beighton D. 1999. *Streptococcus*, p. 283-296. *In* Murray PR *et al.* (ed.), *Manual of Clinical Microbiology*, American Society for Microbiology, Washington DC.
5. The IBAD Guide to Extended Susceptibility Testing : Indications, Methods, and Interpretation. 2000. The Infectious Diseases Advisory Board.
6. Van Asselt GJ, Mouton RP & van Boven CP. 1996. Penicillin tolerance and treatment failure in group A streptococcal pharyngotonsillitis. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 15:107-115.

## 2.2 Cultuur M/2423

Geïsoleerd uit een cervicaal uitstrijkje bij een vrouw met matige klachten van vaginale afscheiding, dysurie en lichte intermenstruele bloeding is voor een deel van de laboratoria *Neisseria gonorrhoeae* en voor een ander deel *Neisseria lactamica*.

### 2.2.1. Taxonomie

Het genus *Neisseria* bestaat uit strikt aërobe gramnegatieve boonvormige diplokokken, waarvan de tegenover liggende zijden afgeplat zijn. Een uitzondering is *N. elongata* die staafvormig is. *Neisseria spp.* zijn met uitzondering van *N. elongata* allemaal positief voor catalase en oxidase.

Er zijn verschillende species bij mensen en dieren beschreven. De meeste soorten behoren tot de normale flora. De pathogene species zijn *N. gonorrhoeae* en *N. meningitidis*. De twee pathogene species zijn genetisch sterk verwant.

### 2.2.2. Klinische betekenis

Alle stammen van *N. gonorrhoeae* worden als pathogeen beschouwd. Ze veroorzaken infecties van de slijmvliezen van de genitale tractus, anus, orofarynx en ogen. Infecties kunnen asymptomatisch verlopen. 1 tot 3 % van de patiënten met gonorrhoe ontwikkelen veralgemeende gonokokken infectie, waarbij typisch huidletsels en arthritis voorkomen. Uitzonderlijk wordt *N. gonorrhoeae* geïsoleerd bij patiënten met endocarditis of meningitis.

Het aantal isolaties door de peillaboratoria is laag (179 gevallen in België in 1999). Sinds 1997 is er een lichte toename.

*N. lactamica* is een frequente commensaal van de nasofarynx vooral bij jonge kinderen. Uitzonderlijk wordt hij gevonden als commensaal van de vagina. In zeldzame gevallen wordt hij als opportunistisch pathogeen geïsoleerd bij patiënten met meningitis en sepsis. Het is belangrijk *N. lactamica* te onderscheiden van de verwante *N. meningitidis*.

### 2.2.3. Microbiologie

*N. gonorrhoeae* is de moeilijkst te kweken soort binnen het genus. Het is best de monsters onmiddellijk te enten en te incuberen in een vochtige atmosfeer met 5 % CO<sub>2</sub> op 35 tot 37°C. Vooral een CO<sub>2</sub> rijke atmosfeer is belangrijk voor het overleven van de kiem. Als stammen moeten worden opgestuurd dan worden de media vooraf 18 tot 24 uur geïncubeerd. De stammen mogen niet langer dan 48 uur onder weg zijn.

Voor de isolatie van *N. meningitidis* en *N. gonorrhoeae* uit monsters met mogelijk normale flora worden selectieve en niet selectieve media gebruikt. Als selectief medium voor pathogene *Neisseria spp.* wordt bijvoorbeeld Thayer-Martin op basis van vancomycine, colistine en nystatine gebruikt.

Op deze selectieve media groeien ook bepaalde niet pathogene soorten zoals *N. lactamica* en *Kingella dinitrificans* en sommige stammen van *N. subflava*, *N. cinerea*, *N. polysaccharea* en *B. catarrhalis*.

Sommige gonokokken groeien niet op de selectieve media, vandaar het belang ook niet selectieve media te gebruiken.

Chocolade agar heeft de voorkeur als niet selectieve voedingsbodem aangezien niet alle gonokokken op bloedagar groeien.

Na 24 uur incubatie ziet men bij *N. gonorrhoeae* verschillende kolonietypes van 0.5 tot 1 mm groot. Na langer incuberen worden de kolonies iets groter en lijken ze meer op elkaar. *N. lactamica* vormt zoals *N. meningitidis* iets grotere kolonies van 1 mm doormeter. *N. lactamica* kan een licht geel pigment vormen. Op basis van het kolonietype kan men *N. lactamica*, *N. cinerea*, *N. polysaccharea*, *N. kochii* en *K. dinitrificans* niet onderscheiden van *N. meningitidis* en *N. gonorrhoeae*. De andere *Neisseria spp.* vormen wel andere kolonies.

Identificatie gebeurt in de eerste plaats op basis van gramkleuring (onderscheid met *K. dinitrificans*), positieve katalase en oxidase. Identificatie van de species is gebaseerd op groei op selectieve media voor pathogene *Neisseria spp.* en biochemische testen. Voor het uitvoeren van de biochemische testen wordt meestal gebruik gemaakt van commerciële systemen zoals API NH, Crystal, ROSCO Diagnostic Tablets, ... De commerciële systemen zijn betrouwbaar. Houd er wel rekening mee dat de reacties soms moeilijk af te lezen zijn en dat de test eventueel moet worden herhaald. Soms moeten bijkomende testen worden uitgevoerd.

*N. lactamica* onderscheidt zich van de andere soorten door een positieve ONPG test.

*N. gonorrhoeae* moet worden opgestuurd naar een referentielaboratorium. De diagnose heeft belangrijke implicaties voor de patiënt en zijn of haar partner. Een verkeerde diagnose moet zeker worden vermeden.

#### 2.2.4. Gevoeligheid

*N. gonorrhoeae* is de enige soort binnen het genus waarvoor de NCCLS criteria heeft opgesteld voor disk diffusie en MIC bepaling. Een  $\beta$ -lactamase door middel van een nitrocefine-test wordt steeds uitgevoerd.

K. MAGERMAN (Virga Jesseziekenhuis-Hasselt)

## **REFERENTIES**

1. Neisseria en Branhamella in: MurrayPR, Braon EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Yolken RH (eds.). Manual of Clinical Microbiology 7<sup>th</sup> edition, American Society for Microbiology, Washington DC, 1999, pp 586 – 603.
2. Centers for Disease Control and Prevention. 1998. *Identification of Neisseria and Related Species*. Electronic publication (<http://www.cdc.gov/ncidod/dastlr/gcdir/Neldent/Index.html>). Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Ga.
3. Surveillance van Infectieuze Aandoeningen door een Netwerk van Laboratoria voor Microbiogje 1999, Ministerie van Sociale Zaken, Volksgezondheid en Leefmilieu, Wetenschappelijk Instituut Volksgezondheid – Louis Pasteur, G. Ducoffre.



### 2.3. Cultuur M/2387

Is een *K. pneumoniae*, die geen identificatie-problemen oplevert maar waarvan het antibiogram tot complicaties leidt. Oorzaak van dit probleem is de aanwezigheid van een resistentie-plasmide met meerdere resistentie-genen, onder meer een 'extended spectrum'  $\beta$ -lactamase of ESBL. Er is zeer veel informatie over ESBLs, en het is niet eenvoudig om een beknopt overzicht te maken.

#### ESBLs zijn geëvolueerde $\beta$ -lactamasen :

- oorspronkelijk waren het chromosomaal gecodeerde  $\beta$ -lactamasen (SHV  $\beta$ -lactamasen komen uit *K. pneumoniae*, van TEM  $\beta$ -lactamasen is de oorsprong niet gekend)
- de betreffende genen zijn losgekomen uit het chromosoom en zijn aanwezig op mobiele erfelijke elementen (transposons en de grotere eenheden plasmiden) : de genen kunnen dus naar andere stammen en species worden overgedragen, wat we frequent in patiënten-materiaal kunnen waarnemen
- onder selectiedruk van antibioterapie worden mutanten uitgeselecteerd die hogere MICs veroorzaken voor  $\beta$ -lactam antibiotica : het spectrum van de  $\beta$ -lactamasen wordt dus uitgebreider

Als gevolg van de verhoogde MICs zien we dat de ESBL producer voor een deel van de  $\beta$ -lactam antibiotica als resistent of intermediair gevoelig wordt afgelezen bij het uitvoeren en interpreteren van een antibiogram. Voor een aantal  $\beta$ -lactams blijft de verhoogde MIC nochtans onder de klassieke breakpoints.

Belangrijk is nu dat geleidelijk aan de visie meer en meer veld gewonnen heeft dat dergelijke stammen ook niet zo vlot reageren op therapie met dergelijk antibioticum. Dit betekent ook dat er richtlijnen en technieken beschreven zijn om dergelijke stammen te ontdekken (Expertsystemen), en bij aanwezigheid van een ESBL het oorspronkelijk, 'ruw' antibiogram-resultaat aan te passen (Resistent rapporteren of een opmerking toevoegen).

#### Variatie

- Er zijn heel wat verschillende ESBLs beschreven, reeds minstens 87 TEM-derivaten, een 20-tal SHV afgeleiden, en een klein aantal anderen : na een verwarrende literatuur is er nu een goede systematiek beschikbaar, gebaseerd op de fylogenetische oorsprong : TEM-3, TEM-4,... en SHV-3, SHV-4,...
- Gezien de grote variatie in soorten ESBLs, maar ook in de expressie ervan is er heel wat variatie te zien in de antibiogrammen van ESBL-stammen. Bij een deel van de stammen de MICs van ceftazidime, cefotaxim, ... dicht bij elkaar zijn : antibiogram patronen van dergelijke stammen lijken op die van 'geïnduceerde' enterobacteriaceae (*Enterobacter sp.*, *Citrobacter sp.*,...) (stam M2387 heeft dit fenotype), en bij een ander deel is er een zeer hoge MIC voor ceftazidime (64 of hoger) terwijl de MIC voor cefotaxim laag blijft (MIC 1- 2, of zelfs lager) : deze stammen zijn relatief gemakkelijk te ontdekken (CAZ-R / CTX-S fenotype).
- Eigenlijk zijn er geen strikte definities van wat een ESBL is.

### Gevoeligheid voor $\beta$ -lactamase-remmers :

- Belangrijk kenmerk van de meeste ESBLs is dat ze geblokkeerd worden door  $\beta$ -lactamase-remmers, en dat clavulaanzuur, tazobactam... de gevoeligheid voor ampicilline, piperacilline... herstellen. Mede op deze synergie steunen een deel van de technieken van ESBL detectie.
- Sommige stammen met ESBL zijn echter niet gevoelig voor Augmentine® e.d. ..., ondanks de synergie

### Andere kenmerken

ESBL's zijn aanwezig op plasmiden : dit heeft als gevolg dat de geïnfecteerde stammen ook andere R-genen bezitten, en ook vaak resistent zijn aan tetracycline, chloramfenicol, sulfonamiden en/ of trimetoprim en aan één of meerdere aminosiden.

Een ander gevolg is dat het resistentie pakket kan worden doorgegeven aan andere stammen van dezelfde species en andere species.

Om een niet duidelijke reden komen de betreffende plasmiden en ESBL-genen vooral voor in *K. pneumoniae* stammen en er zijn veel epidemieën beschreven met dit species. Vanuit deze epidemische stammen wordt af en toe een *E. coli* of *K. oxytoca* geïnfecteerd.

### Screening en detectie :

Er bestaan hiervoor verschillende manieren van aanpak

- a. testen steunend op de synergie tussen het  $\beta$ -lactamproduct en clavulaanzuur
  - de dubbele disk test (disk approximation) : een schijfje clavulaanzuur, of amoxicilline + clavulaanzuur wordt op het diffusie-antibiogram tegenover een schijfje cefotaxim, aztreonam, en of ceftazidime : tussen de schijfjes ziet met vervorming van de remmingzone (synergie-patronen) en/of spookzones. Bij sommige ESBL's ontdekt men dit fenomeen slechts door de afstand tussen de schijfjes te variëren. Bij stam M/2387 is de synergie slechts te zien bij bepaalde combinatie van gebruikte schijfjes, spreiding ervan op agarbodem en afstand (bij de aanbevolen 2.5 cm meestal niet !!!) (zie illustr.1)
  - Vergelijkende MIC bepaling tussen ceftazidime met en zonder clavulaanzuur, cefotaxim met en zonder clavulaanzuur : dit kan o.m. gebeuren door gebruik van een speciale E-test strip. Indien het verschil tussen beide resultaten met minstens factor 4 verschilt duidt dit op een ESBL. (Bij stam M/2387 is de verhouding slechts 3 - 4, bij veel stammen is de verhouding veel groter).
  - naar analogie kan men ook combi-schijfjes gebruiken : de remmingzone vergelijken rond een gewone ceftazidime disk en een schijfje ceftazidime + clavulaanzuur (idem voor cefotaxim en cefotaxim + clavulaanzuur) : een verschil van 5 mm is indicatief voor aanwezigheid van een ESBL (voor stam M/2387 is de test echter negatief).
  - andere ...

- b. steunend op populatie-resistentie : de normale *E. coli*, *K. pneumoniae* stammen hebben een lage MIC/ brede remmingzone voor de 3<sup>de</sup> generatie-cefalosporines en aztreonam : ESBL producers hebben een duidelijk verhoogde MIC / kleinere remmingzone

Disk diffusie ALARM ZONES	zone STAM 2387	MIC ALARM	waarde STAM 2387
cefpodoxime < 22 mm	<u>19</u>	cefpodoxime > 2 g/m	2
ceftazidime < 22 mm	<u>18</u>	ceftazidime > 2 g/ml	<u>4</u>
aztreonam < 27 mm	<u>23</u>	aztreonam > 2 g/ml	NT
cefotaxime < 27 mm	<u>26</u>	cefotaxime > 2 g/ml	<1
ceftriaxone < 25 mm	<u>23</u>	ceftriaxone > 2 g/ml	NT

Hoe meer van deze producten er getest worden hoe meer ESBL's men kan detecteren; cefpodoxime en ceftazidime zijn echter de producten waarmee, alleen gebruikt, de meeste stammen worden gevonden.

Bij een positief sreenings-resultaat moet men verder aantonen dat er een ESBL aanwezig is met de technieken vermeld in a.

Met geen enkele van deze technieken detecteert men alle ESBL's, men moet daarvoor eigenlijk meerdere testen combineren.

Hierboven beschreven we de NCCLS aanbevelingen, die relatief laat werden beschreven, maar in ieder geval heel concreet zijn. Volgens NCCLS moet de aanpassing van het antibiogram niet gebeuren als er ondanks de overschreven alarmzones geen ESBL wordt aangetoond.

Bij gebruik van de criteria van andere comités, bij gebruik van recente 'automaten' komen we eventueel tot andere resultaten.

Andere breakpoints :

- Engelse, Scandinavische; Nederlandse breakpoints : voor ceftazidime varieert de breakpoint voor gevoelig tussen 1 en 8 (veel stammen met een ESBL zullen dus automatisch als R afgelezen worden bij gebruik van sommige van die breakpoints).

Andere expert-regels :

- In Frankrijk bv. bestaat er een belangrijke traditie voor het opsporen van R-fenotypes, en zijn er ook reeds lange tijd expert-regels uitgewerkt
- In nieuwe antibiogram-automaten en systemen (SIRSCAN, Phoenix, Vitek 2...) is er steeds duidelijker aanwezigheid van expert-regels : die zijn echter niet (i.t.t. NCCLS) beperkt tot ESBL's, of zelfs tot de categorie van de  $\beta$ -lactams. Door sommige expertsytemen wordt bijvoorbeeld ook aangekondigd dat stam M/2387 niet amikacine S of X is maar moet worden afgelezen als R, omwille van de aanwezigheid van een enzyme AAC (6').

Resistentie profiel :

- oorspronkelijk en klassiek zijn ESBL producers nog gevoelig aan inhibitorremmers (amoxicilline/clavulaanzuur en piperacilline/tazobactam) en ook aan de (cefoxitin/ cefotetan) maar sommige ESBL's breken deze antibiotica toch af en sommige stammen zijn eventueel om andere redenen niet zeer gevoelig.

- temocilline en de carbapenems worden nauwelijks afgebroken door ESBL's, maar het eerstgenoemde is misschien niet meer zo'n goede keuze voor ernstige infecties.
- er ontstaat ook gemakkelijk verdere resistentie, vooral door een verminderde permeabiliteit.

#### ESBL in andere species, breedspectrum-lactamases die geen 'ESBL's zijn.

ESBL's in andere species : ESBL's kunnen ook aanwezig in andere species (*Proteus mirabilis*, *P. aeruginosa*, *Enterobacter*, *Citrobacter* en *Serratia spp.*, en in exotische landen ook in *Salmonella*, *B. pseudomallei* etc...) in vele ziekenhuizen is *E. aerogenes* de frequentste 'drager' van ESBL geworden : vele van deze ESBL's producers leveren geen problemen op wat hun antibiogram betreft, omdat ze door bv. hyperproductie van amp-C  $\beta$ -lactamase reeds als resistent afgelezen worden op het antibiogram.

Andere  $\beta$ -lactamases : recent zijn ook heel wat andere  $\beta$ -lactamases beschreven : ze zijn geen TEM- of SHV derivaten; ze zijn vaak ook niet neutraliseerbaar door clavulaanzuur.

Ook *E. coli* en *K. oxytoca* stammen die hun eigen chromosomaal  $\beta$ -lactamase gaan hyperproduceren worden talrijker (de eerstgenoemde heeft dan een antibiogram-resultaat voor ceftazidime dat boven de alarmdrempel komt (MIC >2, diameter < 22), maar een negatieve dubbel-disk test; bij de laatstgenoemde is de alarm-drempel voor cefotaxim overschreden, niet die voor ceftazidime; en de dubbel-disk test is positief).

Voor dergelijke stammen raadt NCCLs niet aan het ruw antibiogram te modifieren, de expertsystemen doen dat wel. We zijn hier dus nog in het gebied van de discussie (wie aanvaardt welke expert-regel, in welke omstandigheden), maar het is duidelijk dat expertsystemen in de toekomst een essentieel onderdeel gaan uitmaken van het bacteriologisch onderzoek.

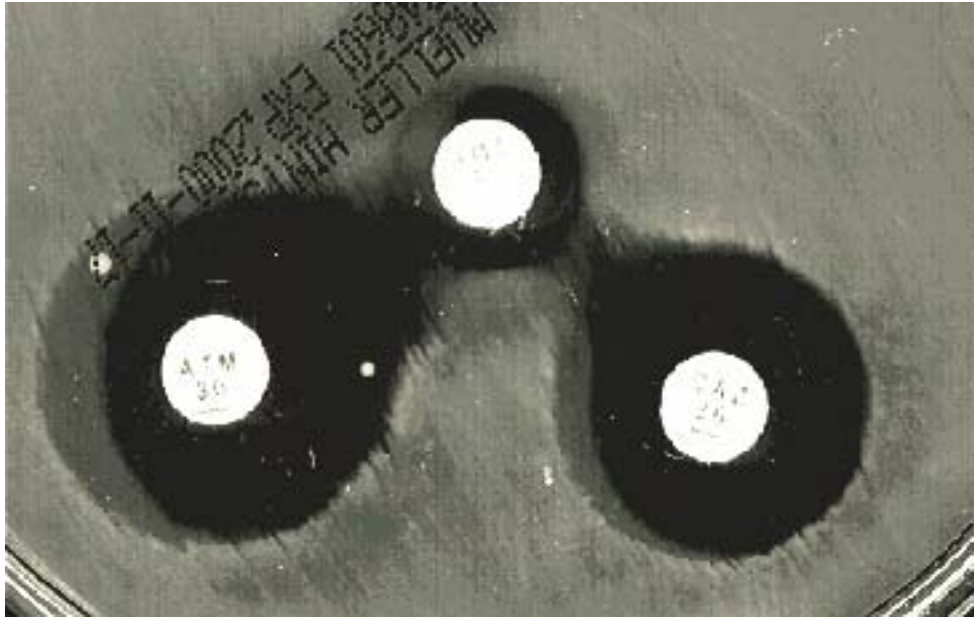
#### Aanpak van infecties met ESBL producers

- antibioticatherapie : gebruik van  $\beta$ -lactam die werkzaam blijven (na uittesten van gevoeligheid : amoxicilline/clavulaanzuur of andere inhibitor-combinatie, temocilline, cefoxitine/cefotetan : maar oppassen voor verdere resistentie-ontwikkeling) – of een carbapenem. Of natuurlijk een antibioticum uit een andere categorie.
- volgens sommigen is deze vorm van resistentie alleen van klinisch belang bij ernstige infecties (blijft dus toch een beetje een bron van discussie, zoals alles wat met breakpoints te maken heeft).
- hospitaal-hygiënische maatregelen : opgepast voor overdracht (hygiëne, isolatie...)

Besluit : Stam M/2387 is een ESBL producerende *K. pneumoniae*; niet zo eenvoudig te detecteren, maar via Expertsystemen en alarm-zones komen we op het spoor. Klinische microbiologie wordt, in sommige van haar aspecten, steeds ingewikkelder en meer dan ooit is er diversiteit in technieken en opvattingen.

G. CLAEYS (UZ-GENT)

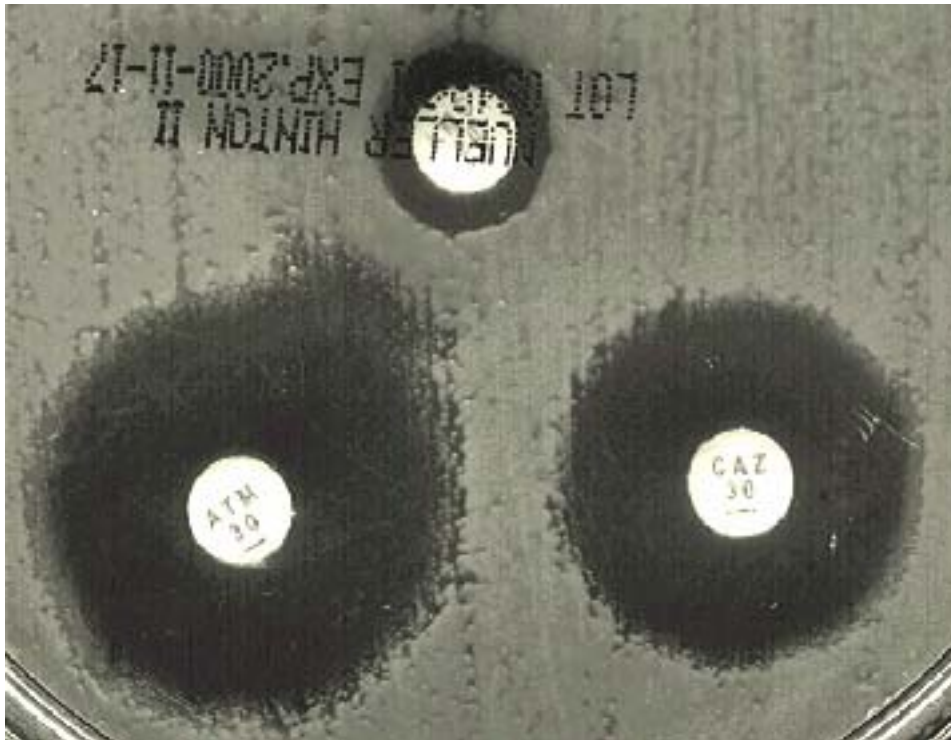
A



B



C



Illustratie 1

Diffusieantibiogram met ceftazidime (CAZ30), aztreonam (ATM30) en augmentine (AMC30) Te zien is o.m. een sterk inoculum-effect (in A/ groot inoculum en kleine diameters) en synergistische zones met verschil in duidelijkheid naargelang inoculum, afstand tussen de schijfjes en het betreffende antibioticum (bij ceftazidime geen effect te zien bij C/)

## REFERENTIES

1. K. Bush and G. Jacoby. Nomenclature of TEM  $\beta$ -lactamases. 1997. J. Antimicrob. Chemother. 39 : 1-3.
2. K. Bush, G.A. Jacoby, and A.A. Medeiros. 1995. A functional classification scheme for  $\beta$ -lactamases and its correlation with molecular structure. Antimicrob. Agents Chemother. 39 : 1211-33.
3. Livermore, D. M. 1995.  $\beta$ -Lactamases in laboratory and clinical relevance. Clin. Microbiol. Rev. 8 : 557-84.
4. Ambler, R.P., A.F.W. Coulson, J.-M. Frère, J.-M. Ghuyssen, B. Joris, M. Forsman, R.C. Levesque, G. Tiraby, and S.G. Walley. 1991. A standard numbering scheme for the class A  $\beta$ -lactamases. Biochem. J. 276 : 269-72.
5. Jacoby GA, Medeiros AA More extended-spectrum beta-lactamases. 1991. Antimicrob Agents Chemother35(9): 1697-704
6. Sirot D Extended-spectrum plasmid-mediated beta-lactamases. 1995 J Antimicrob Chemother36 Suppl A: 19-34
7. Philippon A, Arlet G, Lagrange PH 1994Origin and impact of plasmid-mediated extended-spectrum beta-lactamases. Eur J Clin Microbiol Infect Dis.; 13 Suppl 1: S17-29
8. G.Claeys  $\beta$  lactamasen een overzicht. 2000. Tijdschrift voor geneeskunde, 56 :773-82
9. G.Claeys. Resistentiemechanismen tegen  $\beta$ -lactam antibiotica. 1995. Tijdschrift voor geneeskunde 51:1560-70
10. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1999. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. NCCLS approved standard M100-S9. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA

Laboratory Detection of Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases (ESBLs)  
<http://www.cdc.gov/ncidod/hip/Lab/FactSheet/esbl.htm>

### III. RESULTATEN VAN DE IDENTIFICATIES (N=263)

De juiste identificaties zijn onderlijnd

#### 3.1 Cultuur M/2591 *Streptococcus pyogenes* (keeluitstrijkje) N=263

<u>Streptococcus pyogenes</u>	225 (85,6%)
<u>Streptococcus groep A</u>	30 (11,4%)
*Streptococcus pyogenes + S. mitis	1
*Streptococcus pyogenes + S. viridans	1
Streptococcus agalactiae	1
Streptococcus sanguis	1
Arcanobacterium haemolyticum	1
Zonder antwoord	3

\*Enkel de pathogene kiem diende te worden vermeld

#### 3.2 Cultuur M/2423 GROEP 1 *Neisseria lactamica* (cervicaal monster) N=135

<u>Neisseria lactamica</u>	111 (82,2%)
N. gonorrhoeae + N.lactamica	2
Neisseria Beta-lactamase negatief	1
Neisseria gonorrhoeae	19
Geen groei	1
Geen antwoord	1

#### GROEP 2 *Neisseria gonorrhoeae* (cervicaal monster) N=128

<u>Neisseria gonorrhoeae</u>	109 (85,2%)
N. gonorrhoeae + N.lactamica	1
Neisseria lactamica	8
Neisseria cinera	3
Neisseria sp	3
Neisseria sicca	2
Mengflora-dysbiosis	1
Geen antwoord	1

#### 3.3. Cultuur M/2387 *Klebsiella pneumoniae* (urine) N=263

<u>Klebsiella pneumoniae</u>	205 (78%)
<u>Klebsiella pneumoniae (ESBL)</u>	58 (22%)



#### 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).

Cultuur M/2591

	Verwacht resultaat	S	I	R	Totaal
erythromycine	R	6	3	249	258
clindamycine	R	12	3	236	251
tetracycline	S	228	3	1	232

Enkele deelnemers antwoordden het gebruik van de Vitek voor de gevoeligheidsbepaling van *S. pyogenes*. De "Vitek" (zowel I als II) bezit echter geen gepaste kaart voor deze gevoeligheidsbepaling. De deelnemers antwoordden gevoelig voor de 3 antibiotica of intermediair gevoelig voor erythromycine.

Cultuur M/2387

	Diffusie			Dilutie		
	S	I	R	S	I	R
ofloxacin	1	38	71	0	19	58
ciprofloxacin	22	78	54	4	41	50
norfloxacin	8	57	93	2	29	52
amoxicilline + clavulaanzuur	9	35	141	4	13	74
cefuroxime	0	33	146	24	20	54
cefotaxime	112	5	25	49	12	16
ceftriaxone	76	6	17	15	5	18
ceftazidime	90	32	47	40	12	23
cefepime	88	9	11	42	10	15

De Vitek en ATB methoden werden opgenomen onder "dilutie".

Er zijn 62 laboratoria die melding hebben gemaakt van de aanwezigheid van een ESBL. Deze pasten hun resultaten aan: ze gaven R door voor de cefalosporines of voegden een commentaar bij het resultaat.

In totaal waren er echter 106 laboratoria die gevoelig als resultaat gaven bij de gevoeligheidstest tegen ceftazidime zonder enig bijkomend commentaar of de melding van een ESBL.

## V. PARASITOLOGIE

### 5.1. De monsters

Elke deelnemer ontving twee fecessuspensies in formol, P/1575 en P/2590.

Voor beide monsters werden volgende gegevens verstrekt:

P/1575 “ Feces van een jongen van 8 jaar afkomstig uit Paraguay met volgende klachten: lichte buikloop en vage buikkrampen.”

P/2590 “Feces van een meisje van 14 jaar afkomstig uit Haïti met volgende klachten: diarree, gewichtsverlies en buikkrampen.”

P/1575 bevatte eieren van *Hymenolepis nana*. In monster P/2590 waren oocysten van *Cyclospora cayetanensis* aanwezig alsook *Blastocystis hominis*.

### 5.2. De resultaten

De resultaten van de kwaliteitsevaluatie vinden we terug in de onderstaande tabellen. De codes bij de naam van de parasieten verwijzen naar de parasitologie tabellen van het WIV-LP, dienst klinische biologie en zijn eveneens terug te vinden op de website: <http://www.iph.fgov.be>

Tabel 1. Volgende parasieten werden teruggevonden in het monster P/1575 (aantal deelnemende laboratoria = 245)

Naam	Aantal antwoorden
(0) Afwezigheid van parasieten	1
(6) <i>Cryptosporidium sp</i>	1
(7) <i>Cyclospora sp</i>	1
(9) <i>Endolimax nana</i>	2
(66) <i>Onchocerca volvulus</i>	1
(67) <i>Strongyloides fulleborni</i>	1
(79) <i>Hymenolepis diminuta</i>	13
(80) <i>Hymenolepis nana</i>	230
(81) <i>Taenia saginata</i>	1
<b>Totaal</b>	<b>252</b>

Tabel 2. Resultaten voor monster P/2590  
(aantal deelnemende laboratoria = 239)

Naam	Aantal antwoorden
(0) Afwezigheid van parasieten	18
(6) <i>Cryptosporidium sp</i>	3
(7) <i>Cyclospora sp</i>	192
(9) <i>Endolimax nana</i>	7
(10) <i>Entamoeba coli</i>	3
(12) <i>Entamoeba hartmanni</i>	14
(13) <i>Entamoeba histolytica</i>	2
(22) <i>Microsporidia</i>	2
(55) <i>Ascaris lumbricoïdes</i>	5
(68) <i>Strongyloïdes stercoralis</i>	1
(84) <i>Dicrocoelium dendriticum</i>	2
<i>Blastocystis hominis</i>	13
<b>Totaal</b>	<b>262</b>

Tabel 3. Monster P/1575 : volgende parasieten of combinaties van parasieten werden gevonden in dit staal

Parasieten	Aantal labo's
0	1
6/9	1
66	1
67	1
7/80	1
79	11
79/80	2
80	225
80/81/82	1
9	1
<b>Totaal</b>	<b>245</b>

Tabel 4. Monster P/2590 : volgende parasieten of combinaties van parasieten werden gevonden in dit staal

Parasieten	Aantal labo's
0	18
10	2
10/13	1
12	11
55	2
6	2
6/7/22	1
68	1
7	76
7/13	1
7/22	1
7/55	3
7/9/98	1
7/98	8
84	1
9	2
9/12	3
9/84	1
98	4
<b>Totaal</b>	<b>239</b>

### 5.3. Bespreking van de resultaten

#### 5.3.1. Monster P/1575

245 Laboratoria stuurden een resultaat in. *Hymenolepis nana* (alleen of in combinatie met andere parasieten) werd herkend door 230 (93,9%) van de laboratoria. De volgende ontwikkelingsstadia werden vermeld voor deze parasiet, cyste (6 deelnemers), volwassen vorm (1 deelnemer), niet vermeld (1 deelnemer) en eieren (222 deelnemers).

Tabel 3 toont in detail de andere parasieten of combinatie van parasieten die gevonden werden in dit fecesmonster.

#### 5.3.2. Monster P/2590

239 Laboratoria stuurden een resultaat in voor dit monster. *Cyclospora sp* werd herkend door 192 (80,3%) deelnemers met de volgende ontwikkelingsstadia : eieren (4), niet vermeld (1), cyste (39), sporocyste (2), oocyste (146). *Blastocystis hominis* werd vermeld door 13 (5,4%) laboratoria. Tabel 4 toont in detail de andere parasieten of combinatie van parasieten die gevonden werden in dit fecesmonster.

## 5.4. Bespreking van de parasieten

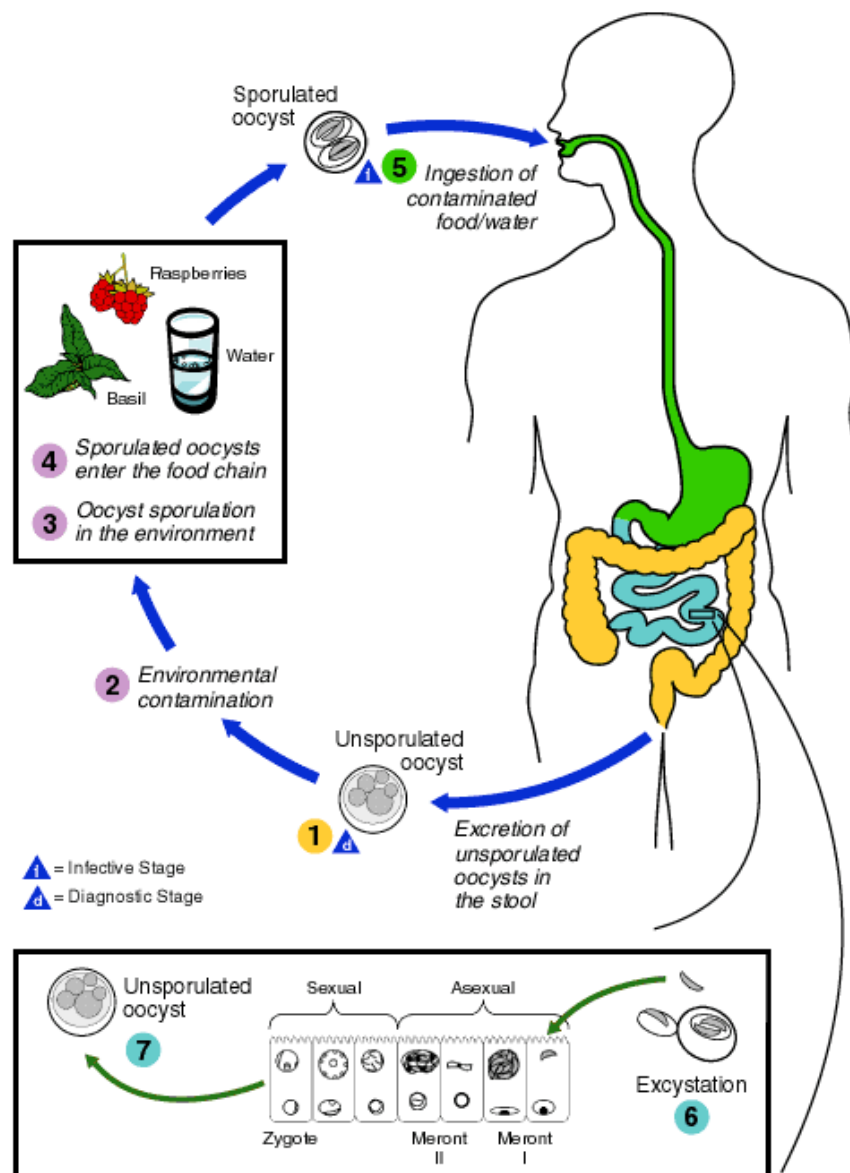
### 5.4.1. Hymenolepis nana

Deze parasiet werd uitvoerig beschreven in het globaal rapport 3/1999.

### 5.4.2. Cyclospora cayetanensis

*Cyclospora cayetanensis* werd voor het eerst geïntroduceerd in de eerste EKE ronde van 1997. We verwijzen dan ook naar het desbetreffende globaal rapport voor de beschrijving van deze parasiet. Inmiddels werd de parasiet grondig bestudeerd en zijn enkele vraagstukken zoals de levenscyclus opgehelderd.

#### 5.4.2.1 Levenscyclus (1)



Wanneer de verse oocysten met het feces in de buitenwereld terechtkomen, zijn deze niet gesporuleerd en dus niet infectieus, een directe faeco-orale transmissie is in tegenstelling tot *Cryptosporidium* niet mogelijk. De sporulatie grijpt plaats in de buitenwereld, na enkele dagen of weken bij temperaturen van 26 tot 30 graden . Er ontstaan twee sporocysten die elk twee lange sporozoieten bevatten. Daar fruit, groenten of water besmet kunnen zijn, kunnen de aldus gesporuleerde oocysten worden opgenomen. In de gastrointestinale tractus komen de sporozoieten vrij en dringen in de epitheliale cellen van de dunne darm. In deze cellen gaan ze zich asexueel en sexueel vermenigvuldigen en worden rijpe oocysten uitgescheiden met de stoelgang.

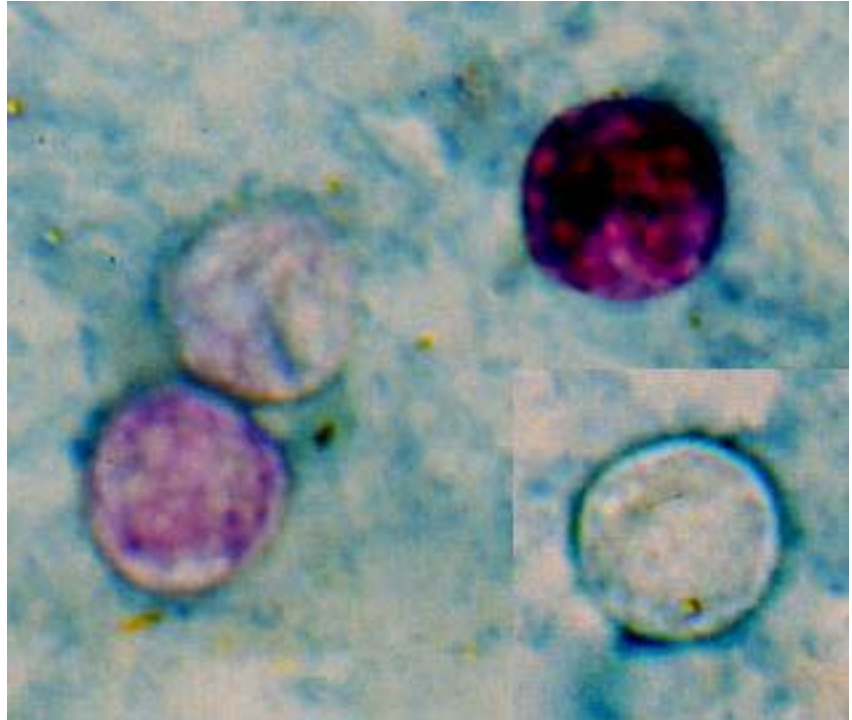
#### 5.4.2.2. Laboratoriumdiagnose

Cyclospora zijn zichtbaar in rechtstreeks microscopisch onderzoek van stoelgang. Het zijn sferische organismen met een diameter van 8 tot 10 µm en een dubbele membraan waarvan de buitenste vrij dik is. Daar cyclospora sterke gelijkenissen vertoont met cryptosporidium ( 4 tot 6 µm) wordt er sterk aangeraden de oocysten te meten om duidelijk de 2 protozoa te onderscheiden in het rechtstreeks microscopisch onderzoek.

De oocysten gaan autofluoresceren wanneer ze bekeken worden onder UV licht.



Met een zuur-vaste kleuring worden de oocysten variable gekleurd, gaande van kleurloos naar donker purper. De afmetingen zijn identiek aan deze van het rechtstreeks onderzoek, maar vertonen een minder perfecte ronde vorm.



#### 5.4.2.3. Behandeling

De meeste acute infecties zijn zelf-genezend, sommige kunnen langer dan 1 maand aanhouden en andere vertonen geen symptomen.

De aangewezen behandeling is cotrimoxazole, 2 x per dag, gedurende 7 dagen.

Bij HIV positieve patienten kan een hogere dosis en een langere behandeling aangewezen zijn, 4 x per dag, gedurende 10 dagen gevolgd door een profylaxis van 3x/week.

T. CRUCITTI (WIV-Brussel)

#### REFERENTIES

1. <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx>

## VI. SEROLOGIE, opsporen van antistoffen tegen HIV

### 6.1. Beschrijving van de monsters

Twee vloeibare geïnactiveerde en getrombineerde plasmamonsters werden uitgestuurd :

- S/ 2607 : is een positief plasma
- S/2609 : is een positief plasma

### 6.2. De deelnemers

In het totaal namen 252 laboratoria deel aan deze enquête.

### 6.3. Gebruikte reagentia

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

Fabrikant	Reagens	aantal S/2607	aantal S/2609
Abbott	Imx HIV-1/HIV-2 IIIpl	4	4
	Prism HIV1/HIV2	1	1
	Prism HIV 0 plus	1	1
	HIV 1/2g0 EIA	5	5
	Axsym HIV 1/2gO	107	105
	Determine HIV1/2	4	4
	Murex HIV 1.2.0	6	6
	Niet vermeld	1	1
bioMérieux	Vidas HIV duo	86	85
	HIV 1 p24 antigen II	1	1
DadeBehring	Enzygnost anti HIV 1/2	4	4
	Enzygnost HIV integral	8	8
BoehringerMannheim	Enzymun test HIV 1+2 3	2	2
Innogenetics	Innotest HIV ab 1.0.2	1	1
	Inno-LIA HN confirmation	1	1
Roche	Cobas Core anti HIV 1/2	3	3
Organon	Vironostika HIV uni-for	9	9
Biotest	Biotest HIV tetra kit	7	7
Sanofi Pasteur	Genscreen HIV 1/2	3	3
	Genelavia mixt 1/2	1	1
	Access HIV 1/2 new	18	18
Fujirebio	Serodia HIV 1/2	4	4
Ortho	HIV 1/HIV 2 Ab-capture	3	3
	Vitros immunodiagn	8	8



#### **6.4. Resultaten**

Twee labo's verkregen voor beide positieve monsters negatieve resultaten. Eén labo antwoordde voor beide monsters negatief, maar meldde ons inmiddels wel dat het om een transcriptie fout ging. De resultaten bekomen met de Axsym waren wel degelijk positief. Het laboratorium onderneemt corrigerende maatregelen om zulke fouten in de toekomst te vermijden. Het andere negatief resultaat voor beide HIV-monsters werd bekomen voor het opsporen van p24 antigenen.

#### **6.5. Besluit**

De bekomen resultaten zijn goed behalve voor twee laboratoria. Een overschrijffout is even erg als een technische fout. De EKE evalueert niet de reagentia maar de kwaliteit van de laboratoria. De uit te voeren testen zijn antistofbepalingen en geen antigenbepalingen. Voor beide laboratoria zou het misschien nuttig zijn de laboschriften, de encoding en de weergave van de resultaten na te kijken.

Vier laboratoria gebruikten de HIV kit "Serodia HIV1/2" van Fujirebio . Dit is een kit die niet aanbevolen is in België voor het opsporen van HIV antilichamen. De lijst van HIV kits beschikbaar in België kan worden geraadpleegd op het volgende adres : <http://www.iph.fgov.be/ClinBiol/NL/>. Kits die niet voldoen aan de gestelde eisen zijn hierop aangeduid in het rood.

## VII. VARIA

In het globaal rapport 2000/2 werd een beschrijving gegeven van de opgestuurde *Salmonella* stam.

Enkele deelnemers antwoordden *Salmonella* groep A, gebaseerd op het API resultaat. Sommige van deze deelnemers bevestigde het resultaat met een serumagglutinatie test, Pasteur OMA.

Dit serum is echter een polyvalent serum dat de agglutinines van de volgende groepen bevat : groep A; groep B; groep D; groep E en groep L.

Een confirmatie van groep A enkel op basis van dit serum is dus niet mogelijk.