

I. ALGEMENE BEMERKINGEN

Voor de eerste evaluatie van het jaar 2001 (enquête 2001/1) werd volgend materiaal verzonden op 22 januari 2001.

- 1.1. **Drie gelyofiliseerde monsters** voor identificatie.
Het betrof 3 reïnculturen. Voor 1 monster werd het resultaat van de gevoeligheidstesten gevraagd.
- 1.2. **Drie microscoopplaatjes** voor Gram-kleuring.
Het betrof drie gefixeerde bacteriesuspensies voor Gram-kleuring en microscopisch onderzoek.
- 1.3. **Twee fecessuspensie in formol** voor parasitologisch onderzoek.
- 1.4. **Twee gelyofiliseerde plasmamonsters** voor het opsporen van antistoffen tegen CMV en EBV.

AANTAL DEELNEMERS

Het aantal evalueerbare antwoordbulletins bedroeg:

- | | |
|---------------------------------------|-----|
| 1. Voor identificatie en antibiogram: | 252 |
| 2. Voor parasitologie: | 229 |
| 3. Voor de serologie: | 241 |

II. IDENTIFICATIES

2.1 Cultuur M/762

Geïsoleerd uit een stoelgang afkomstig van een jonge man van 25 jaar. De patiënt reisde doorheen Noord-Afrika gedurende 6 maanden. Bij zijn terugkeer in België klaagt hij van buikkrampen en diarree.

2.1.1. Inleiding

Shiga kon in 1898 aantonen dat de later naar hem genoemde bacterie verantwoordelijk was voor de meeste gevallen van dysenterie. Bacillaire dysenterie is veel frequenter dan amoeben-dysenterie. Tijdens veel oorlogen (oa de Amerikaanse burgeroorlog, de Frans-Pruisische oorlog van 1870) zorgde de bacillaire dysenterie voor heel wat problemen en eiste een hoge tol aan mensenlevens (2).

2.1.2. Definitie

Men kent vier species van de *Shigella*-bacterie met elk verschillende serotypen.

1. *Shigella dysenteriae* met 12 (of 13 of meer) serotypen. De meest gekende zijn *S. dysenteriae* 1 of de bacil van Shiga, welke gekenmerkt wordt door de productie van een warmte-bestendige exotoxine inwerkend op de darm en het centrale zenuwstelsel, en *S. dysenteriae* 2 of de bacil van Schmitz. Vermoedelijk zullen er nog enkele serotypen bij komen (1).
2. *Shigella flexneri* met 6 serotypen.
3. *Shigella boydii* met 18 serotypen.
4. *Shigella sonnei* met één serotype en vier biotypen.

Volgens het jaarverslag van het Belgisch referentielaboratorium (6) waren er op een totaal van 500 stammen in 1999 3.0% *S. dysenteriae*, 20.0% *S. flexneri*, 4.2% *S. boydii* en 72.4% *S. sonnei*.

De *Shigella*-bacteriën zijn nauw verwant met *Escherichia coli*. Sommige stammen van *E. coli* (onder meer de entero-invasieve *E. coli* en *E. coli* O157:H7) veroorzaken een analoog ziektebeeld. *E. coli* O157:H7 produceert eveneens een Shiga-like toxine.

Shigella bacteriën zijn biochemisch relatief inactief. De vergisting van mannitol en de productie van indol zijn belangrijk voor de differentiatie. Alle *Shigellae* zijn in principe negatief voor lysinedecarboxylase en ornithinedecarboxylase. Zeldzame *S. boydii* (2%) en nagenoeg alle *S. sonnei* (98%) zijn echter positief voor ornithinedecarboxylase (3). De meeste *S. sonnei* (90%) stammen zijn ONPG positief (3). Deze stam was positief voor mannitol en ornithinedecarboxylase en negatief voor indol en in de ONPG-test. Aangezien *S. sonnei* de meest voorkomende soort is in ons land is

het redelijk om een specifiek antiserum in voorraad te hebben. Het is raadzaam om alle *Shigellae* of verdachte stammen door te zenden naar het referentielaboratorium (Belgisch Nationaal Centrum voor *Salmonella* en *Shigella*, Juliette Wytsmanstraat 14 te 1050 Brussel).

2.1.3. Pathogenese

Shigella spp. verwekken een waterige diarree met koorts. In de zware gevallen heeft men te maken met bacillaire dysenterie. Tengevolge van ulceraties en micro-abces-vorming in de dikke darm is de ontlasting vermengd met rode bloedcellen, mucus en etter. Sepsis is uitzonderlijk. De meeste patiënten genezen na een week spontaan, maar chronische vormen komen eveneens voor. Het hemolytisch uremisch syndroom (HUS) is een ernstige complicatie van shigellose.

2.1.4. Epidemiologie

Shigella spp. komen uitsluitend bij de mens voor maar werden eveneens beschreven bij mensapen. De overdracht gebeurt van mens tot mens via besmette handen, besmet voedsel en vliegen (*maladie des mains sales*). *Shigellae* zijn zeer besmettelijk; een honderdtal bacteriën volstaan om de infectie over te zetten. Het is de meest besmettelijke vorm van bacteriële diarree. Vooral kinderen jonger dan 10 jaar worden besmet. Shigellose is veel frequenter in de tropen en subtropen dan in onze gewesten. In België is enkel *S. sonnei* nog inheems. *Shigella* spp. zijn eveneens een belangrijke oorzaak van reiziger's diarree. De bacil van Shiga (*S. dysenteriae* 1) is na een afwezigheid van verschillende jaren sinds 1979 opnieuw verschenen in diverse tropische gebieden.

2.1.5. Behandeling

Fluoroquinolones zijn zeer actief op *Shigella* spp. (2, 4). De MIC50 voor ciprofloxacin is ≤ 0.015 mg/l (4). Voor een volwassene worden de fluoroquinolones aanzien als eerste keuze (2). De alternatieven (onder meer bij kinderen) zijn cotrimoxazole en ampicilline (2). Resistentie aan fluoroquinolones werd beschreven maar blijft (voorlopig) uitzonderlijk in ons land (4, 5, 6). Gezien de vrij frequente resistentie (2, 4, 6) aan zowel ampicilline (>25%) als cotrimoxazole (>50%) is vooral bij kinderen de behandeling niet altijd eenvoudig en zal men zich in deze gevallen richten naar het antibiogram. Mobiliteitsremmers worden afgeraden bij shigellose (2).

M. LONTIE (MCH-Leuven)

REFERENTIES

1. Coimbra R.S., Lenorman P., Grimont F. *et al.* 2001. Molecular and phenotypic characterization of potentially new *Shigella dysenteriae* serotype. *Journal of Clinical Microbiology*, 39:618-621.
2. Du Pont H.L. 2000. *Shigella* species (bacillary dysentery). In Mandell G. *et al.* (eds.). *Principles and practice of infectious diseases*. Churchill Livingstone, New York.
3. Farmer J.J. III. 1999. *Enterobacteriaceae*: Introduction and identification. p. 442-458. In Murray P.R. *et al.* (eds.), *Manual of Clinical Microbiology*, American Society for Microbiology, Washington DC.
4. Lontie M., Blanckaert H. & Chasseur-Libotte M.L. 1999. In vitro activity of gemifloxacin and other antimicrobials against recent isolates of *Salmonella* spp. and *Shigella* spp. from stool specimens. Poster 2297, 39th ICAAC, San Francisco.
5. Oonaka K., Fukuyama M., Tanaka M. *et al.* 1998. Mechanism of resistance of *Shigella flexneri* 2a resistant to new quinolone antibiotics. *Kansenshogaku Zasshi*, 72:365-370.
6. Wetenschappelijk Instituut voor de Volksgezondheid. 2000. *Salmonella* en *Shigella* stammen in België afgezonderd in 1999. Brussel.

2.2 Cultuur M/2625

Geïsoleerd uit een wonde tengevolge van een vingeramputatie. De amputatie geschiedde als gevolg van een ongeluk met een grasmaaier. Het betrof een didactisch monster.

2.2.1. Taxonomie

Pseudallescheria boydii (oude benaming *Petriellidium boydii* en *Allescheria boydii*) is een schimmel, die op basis van zijn sexuele vorm wordt ingedeeld bij de Ascomyceten, in de familie van de Microascaceae. De sexuele vorm komt tot stand door zelfbevruchting zonder koppeling aan een andere compatibele stam. Hij is met andere woorden homothallisch. Bij ongeveer 25 % van de stammen kan men een sexuele vorm bekomen op voorwaarde dat men de schimmel overent op een geschikte bodem zoals verdunde Sabouraud agar. De sexuele vorm is gekenmerkt door de vorming van vruchtlichamen, cleistotheca. Ze hebben het aspect van kleine bruine bolletjes (50 – 250 µm). Als ze rijp zijn gaan de cleistotheca open en komen de ellipsvormige koperkleurige ascosporen vrij (6-7 x 5-7 µm). Voor de externe kwaliteitscontrole werd de asexuele vorm, ***Scedosporium apiospermum*** (oude benaming *Monosporium apiospermum*) rondgestuurd.

2.2.2. Mycologie

S. apiospermum / *P. boydii* groeit vrij snel op Sabouraud agar. Na 7 dagen incubatie op kamertemperatuur ziet men volgende kenmerken:

- * Macroscopisch: De recto van de kolonies geënt op Sabouraud bestaat uit dichte myceliumdraden, wattig en donzig. Ze zijn eerst wit en worden donkerder tot grijsbruin naarmate de kweek langer instaat. De verso van de kolonies is bij het begin kleurloos en evolueert naar bruin.
- * Microscopisch: de myceliumdraden zijn smal (2 – 4 µm) en dragen bruinachtige, ovale conidia. De conidia ontstaan rechtstreeks op de myceliumdraden (sessiele conidia) of ontstaan op het uiteinde van conidiogene cellen, die fijn en lang zijn.

Sommige stammen (niet van toepassing op de opgestuurde stam!) vormen bundels van filamenten (***Graphium*** vorm) met aan het uiteinde een tros van conidia, die kleiner en hoekiger zijn dan de eerder beschreven conidia.

2.2.3. Voorkomen

S. apiospermum komt wereldwijd voor in de omgeving als saprofiet (exosaprofiet). Men vindt hem in een vochtig milieu zoals sloten, riolen, ...

2.2.4. Klinische betekenis

Het gaat hier over een rechtstreekse besmetting van een huidletsel. *S. apiospermum* / *P. boydii* werd eerst beschreven als verwekker van mycetoma in tropische landen. Dit is een chronische granulomateuze infectie van de huid, onderhuid en bot gekenmerkt door zwellingen, die fistuliseren. De aandoening komt het meeste voor ter hoogte van de voet. De besmetting gebeurt meestal na een verwonding waarbij de schimmel binnendringt door de huid. In de etter die uit de abscessen vrijkomt kan men microcolonies van de schimmel vinden.

In onze streken wordt *S. apiospermum* / *P. boydii* meestal geïsoleerd bij patiënten met ziektebeelden, die doen denken aan *Aspergillus* infecties. De besmetting gebeurt in deze gevallen meestal via inademing. *S. apiospermum* / *P. boydii* kan allergie van de luchtwegen, kolonisatie van de sinussen (eventueel met sexuele vorm in situ) en van de longen ("aspergilloma door *P. boydii*") veroorzaken. Bij gecompromiteerde patiënten (b.v. neutropenie) kan er ook een invasieve pulmonale infectie optreden met endocarditis, uitzaaiing naar de nieren, prostaat, milt, schildklier, hersenen, ...

2.2.5. Diagnose

De diagnose in het hier beschreven geval berust hoofdzakelijk op het microscopisch aantonen van de schimmel in weefsel (biopsie) en de kweek.

2.2.6. Behandeling

S. apiospermum / *P. boydii* is resistent aan 5-fluorocytosine, aan fluconazole, matig resistent aan amphotericine B en aan ketoconazole. Itraconazole is actief.

N.B. Binnen het geslacht *Scedosporium* komt nog een tweede species voor, ***Scedosporium prolificans*** (vroeger *Scedosporium inflatum*) waarvan geen sexuele vorm bekend is. Macroscopisch lijkt deze tweede soort op *S. apiospermum*. Bij microscopie vindt men bij de twee soorten dezelfde sessiele conidia maar *S. prolificans* heeft lange gezwollen – ampoelvormige conidiogene cellen en vormt nooit gebundelde filamenten (graphium vorm).

Fysiologisch onderscheiden de twee soorten zich door het feit dat *S. prolificans* in tegenstelling tot *S. apiospermum* kan groeien bij 45°C en gevoelig is aan actidione (cycloheximide) 0.5 g/l (*S. apiospermum* is resistent).

De eerste waargenomen gevallen van mycosen door *S. prolificans*, lieten vermoeden dat *S. prolificans* vooral verantwoordelijk is voor lokale aandoeningen (heel dikwijls osteomyelitis), maar recente literatuur toont aan dat hij bij gecompromitteerde patiënten gedissemineerde infecties kan veroorzaken. *S. prolificans* is bijzonder resistent aan antimycotica.

K. MAGERMAN (VIRGA JESSEZIEKENHUIS – Hasselt)
D. SWINNE (ISP-MYCOLOGIE, Bruxelles, IMT – MYCOLOGIE, Antwerpen)

REFERENTIES

1. J.C.Garcia-Ruiz et al. Clinical resolution of *Scedosporium prolificans* pneumonia associated with treatment with liposomal amphotericine B in a patient with acute leukaemia. Rev. Iberoam. Micol. 1998, 15: 158-159).
2. G. Cremer et P. Boiron. Epidemiology and Biology of *Scedosporium* species. J. Mycol. Med. 1996,6 :165-171
3. G.S. de Hoog et al. Ecology and physiology of the emerging opportunistic fungi *Pseudallescheria boydii* and *Scedosporium prolificans*. Mycoses 1994, 37 : 71-78

2.3. Cultuur M/2734

Geïsoleerd uit een hemocultuur van een bejaarde man gehospitaliseerd met een pneumonie was een *Streptococcus pneumoniae*.

2.3.1. Taxonomie en identificatie

S. pneumoniae behoort tot de α -haemolytische streptokokken. Het is een Gram-positieve kok dikwijls in duplo gelegen soms in korte ketens. Deze bacterie groeit goed op bloedagar met vorming van vergroenende gladde niet gepigmenteerde kolonies. Bij oudere kolonies treedt centrale autolyse op. Dit wordt verklaard door het ontbreken van katalase, waardoor de geproduceerde H_2O_2 lysis veroorzaakt. Indien de bacterie grote hoeveelheden polysacharide produceert (b.v. type 3 stammen) ontstaan grote slijmerige kolonies.

Behulpzaam bij de identificatie zijn vooral de gevoeligheid voor optochine en galzouten. De eerste test wordt dagelijks uitgevoerd in de meeste Belgische laboratoria. De galsolubilitestest is minder sterk ingeburgerd maar kan toch zeer nuttig zijn bij twijfelachtige inhibitiezones met een optochine test. De basis van de galsolubilitestest berust op het feit dat pneumokokken een autolytisch amidase hebben dat de peptidoglycaan structuur van hun celwand kan hydrolyseren. Dit enzym wordt geactiveerd door galzouten maar ook door detergenten zoals Dreft resulterend in lysis van bacteriën. De test kan uitgevoerd worden door het rechtstreeks druppelen van Dreft op een gegroeide kolonie waarmee de bloedagar geïncubeerd wordt op 35°C gedurende twee uren. Bij een positieve test zal de kolonie verdwenen zijn van de bloedagar.

De opgestuurde stam stelt geen problemen voor wat betreft zijn identificatie.

2.3.2 Klinische betekenis

S. pneumoniae kan bij 5 – 70% van de gezonde populatie vanuit het nasofaryngeale slijmvlies geïsoleerd worden. De frequentie van dragerschap is laag bij volwassenen zonder veelvuldig contact met kinderen ; is daarentegen hoog bij jonge kinderen en bejaarden. Tijdens de wintermaanden neemt dragerschap ook duidelijk toe.

De pneumokok is ook een belangrijke pathogeen. Het blijft de belangrijkste bacteriële verwekker van pneumonie, vooral wanneer de pneumonie buiten het ziekenhuis ontstaat. Predisponerende factoren zijn obstructieve chronische bronchitis, alcoholmisbruik, hart- en vaatziekten, diabetes mellitus en hypogammaglobulinemie. Met een Gram-kleuring van een sputum van goede kwaliteit kan

men volgens een recente studie met een sensitiviteit en specificiteit van 57% respectievelijk 97% de diagnose van een pneumokokkenpneumonie stellen. (1). De American Thoracic Society raadt daarentegen het systematisch uitvoeren van een Gram-preparaat niet langer aan. Bij 20% van de patiënten is de pneumokokkenpneumonie geassocieerd met bacteriëmie. Een recente studie uit Oxford wijst ook op een duidelijke onderschatting van het probleem van bacteriëmie bij zuigelingen tijdens het eerste levensjaar. In dit prospectief opgezet onderzoek vond men een incidentie van bacteriëmie in deze leeftijdscategorie van 37.1 tot 48.1/100.000. (2)

De globale mortaliteit van een invasieve pneumokokkeninfectie bedraagt minstens 10%, maar kan oplopen tot 30% bij patiënten ouder dan 75 jaar en/of bij aanwezigheid van onderliggende chronische pathologie. Voor België houdt men rekening met 20.000 patiënten per jaar met een pneumokokkenpneumonie en een mortaliteit van 10%.

Streptococcus pneumoniae is de laatste jaren, nu zuigelingen gevaccineerd worden met het geconjugeerd *Haemophilus influenzae* vaccin de tweede belangrijkste oorzaak van bacteriële meningitis. Pneumokokkenmeningitis is vooral frequent bij kinderen maar komt in alle leeftijdscategorieën voor en gaat vooral bij hoogbejaarde patiënten gepaard met een belangrijke mortaliteit.

Onder de meest voorkomende verwekkers van otitis media vinden we *Streptococcus pneumoniae* (25-50%) en niet omkapselde *Haemophilus influenzae* (20-30%).

2.3.3. Gevoeligheid voor antibiotica

Resistentie tegen penicilline en ander β -lactam antibiotica berust op een wijziging van de penicilline-bindende proteïnen (PBPs) waardoor een verminderde affiniteit voor de β -lactam antibiotica ontstaat. Men beschrijft zes verschillende PBPs (1a, 1b, 2a, 2b, 2x en 3). De affiniteit van de verschillende PBPs varieert voor de verschillende antibiotica. Verandering van PBP 2b is belangrijk voor de resistentie tegen penicilline, maar belemmert in geringe mate de activiteit van derde generatie cefalosporines. De PBPs 1a en 2x bepalen daarentegen wel de activiteit van deze cefalosporines.

Resistentie van pneumokokken tegen β -lactam antibiotica ontstaat progressief door transfer van genetisch materiaal uit andere resistente pneumokokken en tevens uit de groep van orale streptokokken (*S. oralis* en *S. mitis*).

In het nationaal referentielaboratorium wordt de evolutie van de gevoeligheid voor penicilline, erytromycine, tetracycline en ofloxacin opgevolgd van invasieve pneumokokken die door een

hondertal laboratoria ingestuurd worden. De gegevens voor de laatste jaren staan in tabel 1.

Tabel 1 uit verslag WIV vanaf 1991
Pneumokokken. Evolutie van antibiotica-resistentie*

Jaar	1991	1992	1993	1994	1995
Antibioticum	N=536	N=552	N=641	N=751	N=992
	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
Penicilline G**	17	22	15	57	70
	(3.2)	(4.0)	(2.3)	(7.6)	(7.1)
Tetracycline	77	85	81	112	157
	(14.4)	(15.4)	(12.6)	(14.9)	(15.8)
Ofloxacin					4
					(0.4)
Erytromycine	84	106	138	171	239
	(15.7)	(19.2)	(21.5)	(22.9)	(24.1)

Jaar	1996	1997	1998	1999	2000
Antibioticum	N=1289	N=1241	N=1205	N=1216	N=1218
	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
Penicilline G**	122	124	171	202	215
	(9.5)	(10)	(14.2)	(16.5)	(17.6)
Tetracycline	237	288	338	359	386
	(18.4)	(23.2)	(28.0)	(29.4)	(31.7)
Ofloxacin	0	3	2	6	4
	(0)	(0.2)	(0.1)	(0.5)	(0.3)
Erytromycine	334	355	374	425	445
	(25.9)	(28.6)	(31.0)	(34.8)	(36.5)

*volgens NCCLS-Criteria

**zowel intermediaire - als volledig resistente stammen

In 2000 vertoonden 215 (17.6%) van de 1218 pneumokokken een verminderde gevoeligheid voor penicilline. Een derde van deze 215 stammen hadden een MIC voor penicilline van meer dan 1 mg/L en behoorden dus tot de categorie van de 'echte resistentie'. Bij 70 van de 215 pneumokokken werd een MIC voor cefotaxime van meer dan 0.5 mg/L gevonden waarvan 8 stammen een MIC van meer

dan 1 mg/L vertoonden. Voor tetracycline en erytromycine bedroegen de resistentiepercentages 31.7% respectievelijk 36.5%. De resistentie tegen ofloxacin bedraagt daarentegen minder dan 1%.

In België volgen de meeste laboratoria de richtlijnen van de NCCLS (tabel 2, 3 en 4). Voor de bepaling van de gevoeligheid voor penicilline met de diskdiffusietechniek wordt het gebruik van een oxacilline schijfje met een lading van 1 µg (screeningstest) aanbevolen. De test wordt uitgevoerd op Mueller-Hinton agar met 5% schapebloed en geïncubeerd gedurende 20 – 24 uur bij 35°C onder 5% CO₂. Bij een inhibitiezone van minstens 20 mm kan men zeker zijn dat de pneumokok gevoelig is voor penicilline (MIC ≤ 0.06 mg/L) en alle overige penicillines en cefalosporines. Een diameter van minder dan 20 mm wijst op verminderde gevoeligheid maar laat niet toe onderscheid te maken tussen een intermediaire of een hoge resistentie tegen penicilline.

Indien de oxacilline screeningstest een diameter van < 20 mm oplevert moet voor invasieve infecties een MIC voor penicilline en derde generatie cefalosporines (cefotaxime of ceftriaxone) uitgevoerd worden. De NCCLS raadt de “broth microdilution” procedure aan in Mueller-Hinton Broth met 2 tot 5% gelyseerd paardenbloed. In de meeste West-Europese klinische laboratoria is men overgeschakeld op de meer gebruiksvriendelijke E-diffusietest (AB-Biodisk) die zeer betrouwbare resultaten oplevert op voorwaarde dat men rekening houdt met de richtlijnen van de producent.

Zie hier enkele van de belangrijke richtlijnen :

- strips worden met een steriele pincet op de bodem gelegd nadat het inoculum hierop reeds een tiental minuten werd aangebracht.
- strips mogen nooit verplaatst worden nadat ze in contact zijn geweest met de bodem. Diffusie van het antibioticum vindt immers ogenblikkelijk plaats.
- bij het aflezen mag men geen rekening houden met hemolyse maar uitsluitend met gegroeide kolonies.

Tabel 2 NCCLS-criteria (2001) voor *Streptococcus pneumoniae* in mg/L

Antibioticum	Gevoelig	Intermediair	Resistent
Penicilline G	≤0.06	0.12-1	≥2
Cefotaxime	≤0.5	1	≥2
Ceftriaxone	≤0.5	1	≥2
Imipenem	≤0.12	0.25-0.5	≥1
Erytromycine	≤0.25	0.5	≥1
Trimethoprim/sulfamethoxazole	≤0.5/9.5	1/19-2/38	≥4/76
Vancomycine	≤1		

Tabel 3 Diskdiffusie NCCLS-criteria (2001) voor *Streptococcus pneumoniae* in mm

Antibioticum	Gevoelig	Intermediair	Resistent
Oxacilline 1 µg (screening voor β-lactamgevoeligheid)	≥20		
Clindamycine	≥19	18-16	≤15
Erytromycine	≥21	20-16	≤15
Ofloxacine	≥16	15-13	≤12
Tetracycline	≥23	22-19	≤18
Trimethoprim/sulfamethoxazole	≥19	18-16	≤15
Vancomycine	≥17		

Tabel 4 Diskdiffusie Neo-Sensitabs volgens de NCCLS-criteria voor *Streptococcus pneumoniae* in mm

Antibioticum	Gevoelig	Intermediair	Resistent
Oxacilline 1 µg (screening voor β-lactamgevoeligheid)	≥20	≤19	≤19
Clindamycine	≥28	27-24	≤23
Erytromycine	≥28	27-24	≤23
Ofloxacine	≥20	19-17	≤16
Tetracycline 80µg	≥26	25-23	≤22
Tetracycline 10µg	≥18	17-15	≤14
Trimethoprim/sulfamethoxazole	≥32	31-27	≤26
Vancomycine 70µg	≥20		

Voor penicilline G werd na afronden tot een waarde op basis van de macht van het getal 2 (0.5, 1, 2, 4 ...) door de meerderheid van de deelnemers een MIC gevonden van 1 of 2 mg/l. Het betreft dus een pneumokok met een duidelijk verminderde gevoeligheid voor penicilline. Volgens een aanzienlijk aantal deelnemers zelfs (MIC 2 mg/l) een resistente stam. Dit toont de relativiteit van dit type onderzoek aan. Men kan immers moeilijk een verschil van één dilutie als een ernstige fout aanzien.

Voor de derde generatie cefalosporines werd na afronden tot een waarde op basis van de macht van het getal 2 (0.5, 1, 2, 4 ...) door de meerderheid van de deelnemers een MIC gevonden van 0.5 of 1 mg/l. Het betreft dus een pneumokok met een duidelijk verminderde gevoeligheid voor derde generatie cefalosporines.

Een opmerkelijke vaststelling is dat minder dan de helft van de laboratoria een MIC bepaling op deze stam hebben uitgevoerd, ondanks het feit dat de oxacilline disk duidelijke resistentie aangaf. Het valt bovendien aan te bevelen om stammen met verminderde gevoeligheid of resistentie voor penicilline te testen met een MIC

bepaling voor een derde generatie cefalosporine (cefotaxime of ceftriaxone). Tot hiertoe werd er geen pneumokok beschreven met een verhoogde MIC voor vancomycine. Dergelijke stammen worden best doorgezonden naar het referentielabo.

Er werd een grote verscheidenheid aan antibiotica getest. Waaronder antibiotica waarvan het testen weinig zinvol is of waarvoor geen enkele norm terug te vinden is. Het valt aan te bevelen om zich bij de keuze van de te onderzoeken moleculen te laten leiden door een bepaalde norm (NCCLS of andere).

J. VERHAEGEN (KU Leuven)
M. LONTIE (MCH-Leuven)

REFERENTIES

1. Rosón B, Carratalà J., Verdaguer R., Dorca J., Manresa F., and Gudiol F. Prospective Study of the Usefulness of Sputum Gram Stain in the Initial Approach to Community-Acquired Pneumonia Requiring Hospitalization, *Clin Infect Dis* 2000; 31:869-74.
2. Sleeman ., Knox K, George R, Miller E, Waight P, Griffiths D, Efstratiou A, Broughton K, Mayon-White R.T, Moxon E.R., Crook, D.W. Invasive Pneumococcal Disease in England and Wales: Vaccination Implications, *J Infect Dis* 2001; 183:239-46

2.4. De uitstrijkjes M/655, M/643, M/571

Gram-kleuring

De Gram-kleuring heeft een belangrijke plaats in de bacteriologie. Het is de kleuring die het meest wordt gebruikt voor het microscopisch onderzoek van klinische monsters. De Gram-kleuring wordt ook gebruikt voor de beoordeling van gekweekte bacteriën.

De Gram-kleuring laat toe epitheelcellen en ontstekingscellen te onderscheiden en kan dus gebruikt worden om de ernst van de ontsteking en de kwaliteit van het klinisch monster te beoordelen.

De eerste externe kwaliteitscontrole van de Gram-kleuring had als bedoeling de beoordeling van bacteriën na te gaan. Er werden draagglasjes rondgestuurd met uitstrijkjes van gekweekte bacteriën. Hierbij werd gevraagd door middel van lettercodes, kleur (Gram-positief of negatief), vorm en ligging van de bacteriën te beoordelen.

M/655: nrl (+ncb)

M/643: prn + pcb + pc

M/571: ncd (+nc)

K. MAGERMAN (VIRGA JESSEZIEKENHUIS-Hasselt)

M/655

Het preparaat toont Gram-negatieve staven met enkele coccoïde, korte vormen zonder bijzondere opstelling noch structuur.

Deze morfologie stemt overeen met die van Gram-negatieve bacillen in het algemeen. In deze categorie van kiemen kunnen de species echter zelden op basis van hun morfologie worden geïdentificeerd. Het beeld zou aanvankelijk dat van enterobacteriën kunnen oproepen, aangezien deze Gram-negatieve bacillen het meest voorkomen in de medische bacteriologie, maar ook andere genera en species kunnen er zo uitzien, zoals sommige non-fermenterende bacillen.

In onderhavig geval was het preparaat afkomstig van een enterobacterie en meer bepaald van een *Enterobacter aerogenes*, maar zoals eerder werd vermeld, kan de species niet door het beeld van de Gram-kleuring alleen worden geïdentificeerd.

M/843

Het preparaat bestaat uit twee uitstrijkjes van eenzelfde kiem, de ene uitgevoerd op basis van een jonge kweek (jonger dan 24 uur) en de andere op basis van een oudere kweek (meer dan twee dagen oud). Het preparaat aan de overzijde van de kant met het etiket (jonge kweek) toont Gram-positieve bacillen die niet vertakt zijn en waarvan de langgerekte vorm een

duidelijke bacillaire morfologie aantoont. Het preparaat aan de kant van het etiket (oudere kweek) toont Gram-positieve kiemen die erg kort zijn, coccoïd en nagenoeg vergelijkbaar met cocci. De tweevoudige, hetzij bacillaire morfologie van de jonge kweek en coccusvormige morfologie van de oudere kweek stemt overeen met wat de bacil-coccuscyclus wordt genoemd en het erfdeel is van sommige Gram-positieve bacillen die coryne- of nocardiovormig zijn. De cyclus is duidelijk zichtbaar bij de *Rhodococcus equi* die het voorwerp uitmaakte van dit preparaat, maar de cyclus kan ook worden vastgesteld bij corynevormige bacillen zoals *Brevibacterium*, *Arthrobacter* en andere.

M/571

Het Gram-gekleurde preparaat toont Gram-negatieve cocci waarvan de meeste in paren zijn gegroepeerd en het beeld van koffiebonen bieden. De grootte van de cocci loopt soms uiteen en sommigen zijn veel dikker dan het gemiddelde. Er worden ook minder sterk gekleurde cellen in ontbinding vastgesteld. Dit is het beeld van *Neisseria*. Andere Gram-negatieve en coccoïde kiemen, zoals *Acinetobacter*, zouden door hun morfologie kunnen worden verward met *Neisseria*. Een eenvoudig middel om de morfologie van de Gram-negatieve cocci te bevestigen, bestaat erin een schijfje van penicilline op de kweek te leggen en vervolgens een Gram-kleuring uit te voeren, dichtbij het schijfje of aan de rand van de inhibitiezone als er één is: bieden *Neisseria* het beeld van cocci, terwijl *Acinetobacter* een bacillair en vezelig beeld tonen. Er bestaan uiteraard ook biochemische tests, zoals oxidase, die het onderscheid kunnen maken.

Het intracellulair beeld van pathogene *Neisseria* kan slechts worden vastgesteld door rechtstreeks microscopisch onderzoek van de pathologische monsters. In de kweek bieden alle species van *Neisseria* (behalve *N.elongata* en *N.weaveri*) een identiek beeld. Het preparaat van de enquête had betrekking op *N.meningitidis* maar kon dus niet als dusdanig worden geïdentificeerd omdat de Gram-kleuring op basis van een kweek was uitgevoerd. Om deze te identificeren zouden kweek- en identificatiekenmerken moeten worden opgespoord.

G. WAUTERS (Universitair Ziekenhuis Saint Luc-Brussel)

III. RESULTATEN VAN DE IDENTIFICATIES (N=252)

De juiste identificaties zijn onderlijnd

3.1 Cultuur M/762 *Shigella sonnei* (feces) N=252

<u>Shigella sonnei</u>	236 (93,7%)
<u>Shigella sonnei groep D</u>	1 (0,4%)
*Shigella sp	3
Shigella flexneri	1
Salmonella sp	1
Escherichia coli	7
Zonder antwoord	3

*Aanvaardbare identificatie

3.2 Cultuur M/2625 *Pseudallescheria boydii* – *Scedosporium apiospermum* N=252

<u>Scedosporium apiospermum</u>	83 (32,9%)
<u>Pseudallescheria boydii</u>	38 (15,1%)
<u>Allescheria boydii</u>	4 (1,6%)
<u>Monosporium apiospermum</u>	1 (0,4%)
* <u>Petriellidium boydii</u>	3 (1,2%)
Allescheria sp	1
Acremonium sp	3
Blastomyces dermatitidis	8
Byssochlamys nivea	1
Chrysosporium sp	6
Cladosporium herbarum	1
Cladosporium sp	3
Dermatophyte	2
Epidermophyton floccosum	1
Fusarium sp	1
Gisten	1
Microïdes interdigitalis	1
Nocardia asteroïdes	2
Paecilomyces	1
Penicilium sp	1
Scedosporium prolificans	2
Scedosporium sp	35
Schimmel	39
Scopulariopsis sp	1
Sporotrichum schenkii	1
Syncephalastrum racemosum	1
Trichophyton mentagrophytes	1
Trichosporon cutaneum	1
Geen antwoord	9

*verouderde benaming

3.3 Cultuur M/2734 *Streptococcus pneumoniae* (hemocultuur)
N=252

<u>Streptococcus pneumoniae</u>	242 (96,0%)
* <u>Diplococcus pneumoniae</u>	2 (0,8%)
Streptococcus oralis	4
Geen groei	1
Zonder antwoord	3
*verouderde benaming	

Wij vragen de deelnemers om geen monsters van de externe kwaliteitsevaluatie naar de referentielaboratoria te sturen

3.4. Gram-kleuring

M/655 *Enterobacter aerogenes*

Gram-kleuring (aantal)	+ Morfologie	Aantal
Gram-negatief (200)	bacil	1
	coccobacil	46
	staaf	19
	gebogen staaf	9
	staaf in kettingen	4
	fusiforme staven	10
	lang-brede staven	84
	lang smalle staafjes	26
	diplokok	1
	Gram-positief (34)	coccobacil
kok		1
kok in ketting		1
diplokok		2
staaf		1
lang-brede staven		4
lang smalle staafjes		4
gebogen staven		1
sporulerende staven		17
Gram-labiel (32)	staven	3
	lang-brede staven	14
	lang smalle staafjes	15

M/643 *Rhodococcus equi*

Gram-kleuring (aantal)	+ Morfologie	Aantal
Gram-positief (367)	coccobacil	31
	kokken	99
	kokken in ketting	45
	diplokokken	30
	kokken in clusters	26
	kokken in tetraden	7
	staven	7
	staven in kettingen	5
	fusiforme staven	1
	lang-brede staven	47
	lang smalle staafjes	56
	gebogen staven	1
	vertakte staven	6
	sporulerende staven	6
	Gram-negatief (34)	kokken
coccobacil		8
gebogen staaf		3
lang-brede staven		5
lang smalle staafjes		11
diplokok		2
staaf		2
staaf in kettingen		1
Gram-labiel (17)	lang-brede staven	10
	lang smalle staafjes	7
Gisten		1
	gisten met knopvorming	1
Epitheelcel		1
Plaveisel epitheelcel		1
Celdebris		1

M/571 *Neisseria meningitidis*

Gram-kleuring (aantal)	+ Morfologie	Aantal
Gram-negatief (278)	diplokokken	197
	kokken	43
	coccobacil	35
	lang smalle staafjes	3
Gram-positief (27)	kokken	13
	kokken in clusters	5
	diplokokken	7
	coccobacil	2
Epitheelcel		2
Polymorfonucleairen		2
Debris		11
Nihil		3

IV. ANTIBIOGRAM

De gevoeligheidsbepaling werd gevraagd voor het monster M/2734 met identificatie *Streptococcus pneumoniae*. De keuze van de antibiotica en de methode (diffusie en/of dilutie) was vrij.

Tabel 1. Geeft weer welke antibiotica getest werden door de deelnemers.

ANTIBIOTICUM	AANTAL TESTEN
penicilline	220
oxacilline	158
ampicilline	27
amoxicilline	64
amoxicilline + clavulaanzuur	9
cefalosporine	1
cefalotine	3
cefazoline	6
cefaclor	1
cefuroxime	29
cefalosporine 3 ^o generatie	3
cefotaxime	107
ceftazidime	1
ceftriaxone	64
cefepime	1
ciprofloxacin	14
pefloxacin	1
ofloxacin	40
norfloxacin	1
levofloxacin	15
lincomycine	1
clindamycine	40
erytromycine	206
clarithromycine	9
azithromycine	2
roxithromycine	1
vancomycine	87
doxycycline	64
tetracycline	57
imipenem	13
meropenem	14
cotrimoxazole	44
sulfamethoxazole	13
trimethoprim	15
chloramfenicol	4
piperacilline	1
methicilline	1
rifampicine	3
novobiocine	1
amikacine	1
gentamycine	1

Tabel 2 Deze volgende tabellen geven de gebruikte methode per antibioticum weer.

methode	oxacilline	penicilline	erytromycine	cefotaxime	ceftriaxone
Papier schijfje becton dickinson	12	4	18	4	2
Papier schijfje bioMérieux	16	5	25	1	2
Papier schijfje Oxoid	4	1	2	1	
Papier schijfje andere	6	4	7		
Rosco tabletten	100	32	111	21	10
ATB	1	23	21	12	1
Vitek 1		1		1	1
Vitek 2		9	8	8	6
microdilutie		5			8
Agar dilutie					
E-test	8	113	4	49	30
Andere	1	4	1		2
Wordt doorgestuurd	3	13	2	7	1
totaal	151	214	199	104	63

methode	cefuroxime	doxycycline	tetracycline	vancomycine
Papier schijfje becton dickinson	0	6	5	10
Papier schijfje bioMérieux	1	3	13	8
Papier schijfje Oxoid	1	1	3	2
Papier schijfje andere	1	2	1	1
Rosco tabletten	16	47	27	38
ATB	3			16
Vitek 1	1			
Vitek 2	1		4	5
microdilutie				
Agar dilutie				
E-test	3	1	1	6
Andere	1	1		
Wordt doorgestuurd				
totaal	28	61	54	86

Tabel 3 De resultaten van de gevoeligheidstesten

	Diffusie			Dilutie		
	S	I	R	S	I	R
oxacilline		4	126	1	5	4
penicilline	4	11	28	2	94	54
vancomycine	58			39		
erytromycine	166			37		
tetracycline	49			5		
ofloxacine	17	2	1	17	1	
clindamycine	29			11		
cotrimoxazole	12	4	18	1		
cefotaxime	21	2	4	32	32	4
ceftriaxone	8	3	3	29	18	
cefuroxime	9	2	8	2	2	4
doxycycline	61			2		

Tabel 4 Inhibitiezones (mm) bekomen met de Rosco tabletten door de deelnemers voor de volgende antibiotica

	Aantal deelnemers	Mediane waarde	Range (min-max)
penicilline	25	18,0	10-37
oxacilline	52	9,0	9-20
vancomycine	38	24,5	18-34
erytromycine	106	34,0	18-46
tetracycline	27	32,0	25-56
ofloxacine	10	21,5	12-25
clindamycine	20	34,0	29-40
cotrimoxazole	23	30,0	18-38

Tabel 5 Inhibitiezones (mm) bekomen met de papieren schijfjes door de deelnemers voor de volgende antibiotica

	Aantal deelnemers	Mediane waarde	Range (min-max)
penicilline	9	21,0	18-27
oxacilline	18	6,0	5-19
vancomycine	20	23,0	18-30
erytromycine	49	28,0	21-36
tetracycline	20	28,0	22-38
ofloxacine	9	18,0	16-20
clindamycine	6	29,0	24-32
cotrimoxazole	3	6,0	6-7

Tabel 6 MIC resultaten (mg/l) gevonden door de deelnemers voor de volgende antibiotica

	0-0,06	0,06-0,125	0,125-0,25	0,25-0,5	0,5-1	1-2	2-4
Penicilline	1	2	6	4	31	55	28
Ceftriaxone	1	0	1	10	21	11	1
Cefotaxime	0	0	1	6	34	13	1

Een opmerkelijke vaststelling is dat minder dan de helft van de laboratoria een MIC bepaling op deze stam hebben uitgevoerd, ondanks het feit dat de oxacilline disk duidelijke resistentie aangaf.

V. PARASITOLOGIE

5.1. De monsters

Elke deelnemer ontving twee fecessuspensies in formol, P/2776 en P/2732

Voor beide monsters werden volgende gegevens verstrekt:

P/2732 “Belgische dame van 29 jaar verbleef 2 maanden in Senegal. Bij haar terugkeer in België klaagt zij van acute abdominale pijn en diarree.”

P/2776 “Echtgenoot van bovenvermelde patiënte verbleef eveneens 2 maanden in Senegal, heeft geen klachten.”

Het monster P/2732 bevatte cysten en trofozoïeten van *Giardia lamblia*.

In het monster P/2776 waren geen parasieten aanwezig.

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/2732 (aantal deelnemende laboratoria = 229)

Naam	Aantal antwoorden
(0) Afwezigheid van parasieten	1
(2) <i>Balantidium coli</i>	1
(5) <i>Chilomastix mesnii</i>	1
(6) <i>Cryptosporidium sp</i>	2
(7) <i>Cyclospora sp</i>	1
(9) <i>Endolimax nana</i>	2
(10) <i>Entamoeba coli</i>	1
(13) <i>Entamoeba histolytica</i>	2
(15) <i>Entamoeba polecki</i>	5
(17) <i>Giardia lamblia</i>	396
<i>Blastocystis hominis</i>	2
Totaal	414

Tabel 2. Resultaten voor monster P/2776
(aantal deelnemende laboratoria =229)

Naam	Aantal antwoorden
(0) Afwezigheid van parasieten	198
(6) <i>Cryptosporidium sp</i>	2
(9) <i>Endolimax nana</i>	1
(17) <i>Giardia lamblia</i>	2
(55) <i>Ascaris lumbricoïdes</i>	1
(86) <i>Fasciola hepatica</i>	1
<i>Blastocystis hominis</i>	14
Totaal	229

Tabel 3. Monster P/2732: volgende parasieten of combinaties van parasieten werden gevonden in dit staal

Parasieten	Aantal labo's
0	1
2/17	1
5/17	1
6/17	2
7/17	1
9/17	2
13/17	2
15	1
15/10	1
15/17	2
17	213
Blastocystis /17	2
Totaal	229

5.3. Bespreking van de resultaten

5.3.1. Monster P/2732

229 laboratoria stuurden een resultaat in. *Giardia lamblia* (alleen of in combinatie met andere parasieten) werd herkend door 227 (99.1%) van de laboratoria. De volgende ontwikkelingsstadia werden vermeld voor deze parasiet, cyste (219 deelnemers), volwassen vorm (1 deelnemer), vegetatieve vorm (73), oocyste (2), trofozoïet (100) en eieren (1).

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

5.3.2. Monster P/2776

229 laboratoria stuurden een resultaat in voor dit monster. 198 (86.5%) laboratoria vonden geen parasieten, en een totaal van 21 parasieten werden vermeld.

5.4. Bespreking van de *Giardia lamblia*

Giardia lamblia (synoniemen *Giardia duodenalis* en *Giardia intestinalis*) werd in 1681 beschreven door de uitvinder van de microscoop, de Nederlander Antonie van Leeuwenhoek. Hij ontdekte het protozoön in zijn eigen stoelgang. De trofozoïet (figuur 1) van *G. lamblia* heeft twee kernen en acht flagellen. De kleine ovale cyste bevat twee trofozoïeten en is de overlevingsvorm.

5.4.1. Pathogenese

De trofozoïet van *G. lamblia* interfereert met de integriteit van het *brush-border* epitheel van het bovenste deel van de dunne darm. Symptomatische patiënten vertonen een waterige, slechtriëkende diarree. De incubatie bedraagt 1 tot 3 weken. De acute fase duurt gewoonlijk 3 tot 4 dagen, vergelijkbaar met travellers-diarree. In sommige gevallen kan de diarree chronisch worden en leiden tot malabsorptie. De besmetting met *G. lamblia* kan eveneens symptomeloos zijn. Secretaire IgA-antistoffen helpen bij het controleren van een infectie maar het is niet duidelijk welke rol IgA-deficienties kunnen hebben (2).

5.4.2. Epidemiologie

G. lamblia is het meest voorkomend intestinaal protozoön en flagellaat bij de mens. De parasiet is kosmopoliet bij de mens en bij meer dan 40 diersoorten (honden, katten, muizen, schapen,...). Het belang van het dierlijk reservoir voor menselijke besmettingen lijkt echter zeer gering te zijn (4). De besmetting geschiedt door de overdracht van cysten van *G. lamblia* van persoon tot persoon (kan epidemisch zijn in kinderkribben), door het drinken van besmet drinkwater of door het eten van besmet voedsel. De cysten van *G.*

lamblia kunnen weerstaan aan lichte chlorering van het water. Homofielen hebben eveneens een groter risico op besmetting. Onder de niet virale oorzaken van diarree is *Giardia lamblia* het derde meest voorkomende agens in ons land na *Campylobacter* spp. en *Salmonella* spp.

5.4.3. Diagnose

De diagnose wordt gesteld door het aantonen van cysten in feces met een parasitologisch onderzoek of door antigeendetectie in feces. Uitzonderlijk kunnen ook trofozoiëten worden aangetroffen in feces. Aangezien de uitscheiding van de cysten niet constant is kunnen meerdere onderzoeken soms noodzakelijk zijn. Bij het begin van de symptomen kunnen de cysten nog ontbreken in de stoelgang (2). De differentiële diagnose dient te worden gesteld met onder meer *Cryptosporidium parvum* en *Cyclospora caeytanensis*.

5.4.4. Behandeling

Tinidazole (2g per os in een éénmalige dosis voor een volwassene) wordt aanzien als eerste keuze (1, 2, 3). Deze therapie heeft een kans op slagen van meer dan 85% (1). In geval van therapiefalen of hervallen: tinidazole 2g per dag gedurende drie dagen (voor een volwassene) (3). Alternatieven zijn mepacrine, paromomycine, metronidazole, furazolidone en albendazole (1, 3). Resistentie aan diverse anti-parasitaire middelen werd beschreven. Het bepalen van deze resistentie is echter geen routine-onderzoek (4). Ook asymptomatische dragers worden best behandeld (3).



Figuur 1: Trofozoiët van *Giardia lamblia* in feces. Noteer de twee kernen en de fijne flagellen (foto ML).

M. LONTIE (MCH-Leuven)

REFERENTIES

1. Gardner TB & Hill DR. 2001. Treatment of giardiasis. *Clinical Microbiology Reviews*, 14, 114-128.
2. Hill DR. 2000. *Giardia lamblia*. In Mandell G.L., Bennett J.E., Dolin R., eds. *Principles and practice of infectious diseases*. Philadelphia, Churchill Livingstone: 2888-2894.
3. Sanford *et al.* 2001. *The Sanford Guide to antimicrobial therapy*. Antimicrobial Therapy Inc., Vermont.
4. Upcroft P & Upcroft JA. 2001. Drug targets and mechanisms of resistance in the anaerobic protozoa. *Clinical Microbiology Reviews*, 14, 150-164.

VI. SEROLOGIE, opsporen van antistoffen CMV en EBV

6.1. Beschrijving van de monsters

Twee gevriesdroogde plasmamonsters werden uitgestuurd:

- S/2340 bevatte IgG en IgM antilichamen tegen CMV en IgG antilichamen tegen EBV
- S/2396 bevatte IgG en IgM antilichamen tegen CMV en IgG antilichamen tegen EBV

6.2. De deelnemers

In het totaal namen 241 laboratoria deel aan deze enquête.

6.3. CMV serologie

6.3.1. De gebruikte reagentia

De onderstaande tabel geeft de frequentie weer van de reagentiakit

Anti-lichaam	Fabrikant	Kit	Aantal S/2340	Aantal S/2396
Igtot N=8	Abbott	CMVTotal AbEIA	2	2
	Organon technika	Vironostika anti-CMV II	1	1
	Dade Behring	Enzygnost Anti CMV IgG + IgM	2	2
	Eurogenetics	CMV IgG/IgM Elisa	2	2
	Becton Dickinson	CMV Scan test kit	1	1
IgG N=231	Abbott	Axsym CMV IgG	87	87
		999 (oudere kit)	2	2
	bioMérieux	Vidas CMV IgG	86	86
	Eurogenetics	CMV IgG Elisa	3	3
	diaSorin	ETI CYTOK-G plus	17	17
	Bipharco-Socolab	999 (in ontwikkeling)	1	1
	DPC	Immulite CMV IgG	3	3
	Dade Behring	Enzygnost Anti CMV/IgG	18	18
	Biorad	Novum Cytomegalovirus IgG	10	10
	Roche	Cobas Core CMV IgG EIA	2	2
Home made		1	1	
999	999	1	1	
IgM N=235 (233)	Abbott	Axsym CMV IgM	74	74
		Imx CMV IgM	5	5
	bioMérieux	Vidas CMV IgM	99	97
	Organon technika	Vironostika anti-CMVII	2	2
	Eurogenetics	CMV IgM Elisa	1	1
	diaSorin	ETI CYTOK-M reverse plus	25	26
	Dade Behring	Enzygnost Anti CMV/IgM	20	20
	Roche	Cobas Core CMV IgM EIA	2	2
	Bipharco-Socolab	999 (in ontwikkeling)	1	1
	Biorad	Novum Cytomegalovirus IgM	1	1
Meridian	IgM IFA	2	2	

	Home made		2	2
	999	999	1	1
IgG aviditeit N=62 (61)	bioMérieux	Vidas CMV IgG avidity	50	49
	Biotest	IgG tegen proteïne B	1	1
	Dade Behring	Enzygnost Anti CMV/IgG avidity	8	8
	Home made		2	2
	999		1	1

Legende: 999 : andere, niet meegedeeld

6.3.2. Resultaten

Monster	IgG (N=231)				IgM (N=235, 233)				Totaal (N=8)	
	+	-	+/-	Z.R	+	-	+/-	Z.R	+	-
S/2340	221			10	228	1	3	3	8	
S/2396	215			16	189	10	30	4	7	

Z.R: zonder resultaat

De IgM negatieve en borderline resultaten werden voor de monsters S/2340 en S/2396 met de volgende reagentia bekomen

Monster	IgM negatief	IgM borderline
S/2340	Bipharco-Socolab (1)	Dade Behring, Enzygnost Anti CMV/IgM (1)
		Roche ,Cobas Core CMV IgM EIA (2)
S/2396	Dade Behring, Enzygnost Anti CMV/IgM (3)	Dade Behring, Enzygnost Anti CMV/IgM (12)
	Bipharco-Socolab (1)	Abbott, AxSYM CMV IgM (2)
	Biorad, Novum Cytomegalovirus IgM (1)	BioMérieux, Vidas CMV IgM (13)
	Home made (2)	Eurogenetics, CMV IgM Elisa (1)
	Roche ,Cobas Core CMV IgM EIA (2)	Meridian CMV IgM IFA (2)
	999 (1)	

Voor de IgM positieve resultaten werden volgende waarden, in functie van het reagens, bekomen;

		Aantal resultaten	Minimum	Maximum	Mediaan
S/2340	Abbott	71	1,820	3,940	2,700
	Dade Behring	12	0,184	0,527	0,270
	bioMérieux	61	0,920	1,860	1,460
	Diasorin	25	1,520	5,300	4,420
S/2396	Abbott	70	1,190	3,142	1,700
	Dade Behring	12	0,122	0,309	0,145
	bioMérieux	64	0,900	1,910	1,000
	Diasorin	24	0,588	2,080	1,810

De resultaten voor de bepaling van de IgG aviditeit waren als volgt:

Monster	IgG avidity			
	aantal	minimum	maximum	gemiddelde
S/2340	56	11,0%	45,0%	22,5%
S/2396	56	15,8%	63,0%	38,6%

De meeste laboratoria (232) bepaalden zowel IgG als IgM en 62 bepaalden de IgG aviditeit.

Het bepalen van enkel 'totaal antilichamen' werd toegepast door 6 laboratoria, allen bloedtransfusiecentra. Eén bloedtransfusiecentrum bepaalde enkel de IgG en 2 laboratoria enkel de IgM.

Distributie van de interpretatie

Serologie suggestief voor een primaire infectie	190
Serologie suggestief voor een oudere infectie	8
Serologie suggestief voor een primaire infectie of oudere infectie, afhankelijk van IgG aviditeit	1
Acute infectie maar geen primoinfectie	1
Serologie suggestief voor een primaire infectie of reactivatie	3
Einde van een recente infectie	1
Bloedtransfusiecentrum doet geen diagnostiek	1

6.4. EBV serologie

6.4.1. De gebruikte reagentia

De onderstaande tabel geeft de frequentie weer van de gebruikte reagentiakits voor beide monsters.

Anti-lichaam	Fabrikant	Kit	Aantal	
Igtot N=12	Organon technika	Monosticon Dri-dot	1	
	Biokit	Monolatex	3	
	Meridian	Monospot latex	1	
	Unipath	Clearview	4	
	Genbio	Immunodot	1	
	Sanofi	Paul-Bunnell	1	
	Immunostics	Monocol	1	
IgG N=224	Organon technika	Vironostika EBV VCA IgG	4	
		Vironostika EBV EBNA IgG	2	
	Biotest	Biotest EBNA IgGelisa	9	
		Biotest antiEBV EA IgG Elisa	4	
		999	1	
	diaSorin	ETI VCA-G	12	
		ETI-EA-G	2	
		Copalis EBV Multiplex	4	
	Euroimmun	Anti-EBV-CA Elisa IgG	21	
		Anti-EBNA IgG	4	
		Anti-EBV-EA	2	
	Trinity Biotech	Captia EBV IgG	3	
	Biognost	999	3	
	Meridian/Gull	EBV IgG IFA	28	
		EBV IgG EIA	23	
		EBV EA IFA	3	
		EBNA-1 IgG EIA	3	
		Monolert	4	
		Merifluor EBV IgG	1	
		999	1	
		Biorad	Novum Epstein Barr virus VCA IgG	2
			Platelia Epstein Barr virus EA IgG	1
		Dade Behring	Enzygnost Anti-EBV IgG	60
	BMD	Immunodot-Mono G test	7	
		EBNA IgG	1	
		EBV VCA IgG	1	
	Forlab	VCA IgG IFA	5	
	Virion	Epstein Barr Virus VCA IgG	1	
	Sigma diagnostics	EBV IgG	1	
		EBNA IgG	1	
	MRL	EBV EA IgG	1	
	BMD	Immunoconcepts IFA	3	
	GAMAA belgium	Epstein Barr virus Elisa IgG	1	
999		5		
IgM N=203	Organon teknika	Vironostika EBV VCA IgM	4	
	Biotest	Biotest Anti EBV EA IgM Elisa	8	
	diaSorin	ETI EBV M Reverse	8	
	BMD	Immunodot-Mono M test	7	

	VCA IgM	1	
	Immunowell	1	
	Immunofluorescentie	3	
Virion/Serion	EBV VCA IgM	1	
Euroimmun	Anti-EBV-CA Elisa IgM	21	
Biognost	999	3	
Trinity Biotech	Captia EBV IgM	3	
Meridian	EBV IgM IFA	30	
	EBV IgM EIA	30	
	Monolert	3	
Gull	Merifluor EBV IgM	1	
Biorad	Novum EpsteinBarr virus VCA IgM	1	
	Platelia EBV EA IgM	1	
Dade Behring	Enzygnost Anti-EBV IgM	60	
MRL diagnostic	VCA RIFA IgM	5	
	EBV VCA IGM	2	
GAMAA belgium	Epstein Barr virus Elisa IgM	1	
Sigma	EBV VCA IgM	2	
Oxoid	Clearview	2	
999	999	5	
IgG aviditeit N=9	diaSorin	ETI VCA G	3
	Euroimmun	EBV CA avidity test	3
	Dade Behring	Enzygnost Anti-EBV IgG/avidity	2
	999	999	1

Legende: 999 : andere

6.4.2 De resultaten

Monster	IgG (N=224)				IgM (N=203)				Totaal (N=9)	
	+	-	+/-	Z.R	+	-	+/-	Z.R	+	-
S/2340	218	6			10	188	5			9
S/2396	218	5	1		11	188	4			9

Z.R: zonder resultaat

De 6 negatieve IgG resultaten voor het monster S/2340 werden bekomen met de opsporing voor de anti EA IgG antilichamen.

De 5 negatieve en 1 borderline IgG resultaten voor het monster S/2396 werden bekomen voor de opsporing van de anti EA IgG antilichamen.

Voor beide monsters werden de anti EA IgG antilichamen door 13 laboratoria bepaald, waarvan dus 7 een positief resultaat verkregen.

De positieve IgM resultaten werden bekomen met Biotest, Anti EBV EA IgM Elisa (6), Trinity Biotech Captia EBVVCA IgM (1), Meridian EBV IgM IFA 1 positief en 2 borderline resultaten, Meridian monolert (1), Genbio Immunodot Mono M test (2), Biorad Platelia EBV EA IgM (1) en 1 ongekend reagens.

De resultaten voor de bepaling van de IgG aviditeit waren als volgt:

Monster	IgG avidity			
	aantal	minimum	maximum	gemiddelde
S/2340	4	38%	87%	55,0%
S/2396	4	40%	86%	58,5%

Distributie van de interpretatie voor EBV

Serologie suggestief voor een oudere infectie met CMV	1
Serologie negatief voor CMV	1
Serologie suggestief voor een oudere infectie met EBV	180
Serologie negatief voor EBV	6
Geen acute EBV infectie	1
Complementaire test nodig om primaire infectie uit te sluiten	1
Secundaire reactivatie te wijten aan een andere infectie	3

6.5 Bespreking CMV en EBV antistoffen

6.5.1. Inleiding

Het Cytomegalovirus en het Epstein Barr virus maken deel uit van de groep van de herpesvirussen.

De diagnostiek van herpesvirusinfecties via serologische technieken is niet eenvoudig. Herpesvirussen hebben namelijk de eigenschap om na een primaire infectie latent in het lichaam van de patiënt aanwezig te blijven. Deze latent aanwezige virussen kunnen opnieuw reacteren en een infectie veroorzaken al of niet met klinische symptomen.

Bij een primaire infectie met een virus van de herpesgroep zal de patiënt zowel IgG als IgM antistoffen aanmaken. De serologische status van de patiënt zal wijzigen (seroconversie: IgG gaat van negatief naar positief). Na het doormaken van de infectie zullen de IgM antistoffen negativeren en blijven de IgG antistoffen levenslang positief.

Bij een reactivatie van het herpesvirus kan het serologisch antwoord van de patiënt sterk verschillen: de patiënt kan een stijging van IgG vertonen zonder stijging van de IgM antistoffen; de patiënt kan een stijging van zowel IgG als IgM antistoffen vertonen; de patiënt kan een onveranderde titer van de IgG antistoffen vertonen. Dit heeft tot gevolg dat de diagnose van een primaire infectie met een herpesvirus enkel met zekerheid kan worden gesteld als we een seroconversie (IgG negatief naar IgG positief) kunnen vaststellen in twee opeenvolgende serumstalen.

De aanwezigheid van IgM antistoffen bij herpesvirussen wijst dus niet noodzakelijk op een primaire infectie. In sommige gevallen kan het van belang zijn om een onderscheid te maken tussen een primaire infectie en een reactivatie. In de afwezigheid van een seroconversie (in IgG) is dit in de meeste gevallen onmogelijk.

Daarom werd in de keuzemogelijkheden voor de antwoorden geopteerd voor de antwoorden “serologie suggestief voor.....” De serologie suggereert dat het kan gaan om een recente infectie, maar er zijn te weinig elementen om het echte bewijs ervan te leveren. De interpretatie zal dan gebeuren in functie van de klinische symptomatologie en de resultaten van eventueel andere testen.

6.5.2. Onderzochte stalen

De klinische informatie voor de twee monsters specificieert dat de patiënt de volgende klachten vertoont: vermoeidheid en aanwezigheid van klieren. Men vraagt de bepaling van serologie tegen EBV en CMV antistoffen en een interpretatie van de resultaten: voor beide parameters kan worden gekozen uit de volgende opties:

- 1) is de serologie suggestief voor een primaire CMV (resp. EBV) infectie;
- 2) is de serologie suggestief voor een vroeger doorgemaakte CMV (resp. EBV) infectie;
- 3) de serologie is negatief voor CMV (resp. EBV).

De twee serumstalen waren afkomstig van een patiënt met een seroconversie voor CMV. De twee serumstalen werden afgenomen resp. 7 en 11 weken na het begin van de symptomatologie.

De twee monsters die werden opgestuurd bevatten positieve IgG en IgM antistoffen voor CMV; en positieve IgG antistoffen voor EBV.

6.5.3. Bespreking CMV serologie

Geen enkel labo had problemen met de IgG bepaling.

Voor wat betreft de IgM bepaling hadden sommige labo's wel problemen: het eerste staaltje werd afgenomen 7 weken na het begin van de symptomatologie. Van de 237 labo's die een antwoord hebben ingestuurd voor CMV IgM, hebben er 3 een borderline resultaat gevonden en 1 een negatief resultaat. Het negatief resultaat werd gevonden met een kit die nog in ontwikkeling was en nog niet op de markt is (Bipharco-Socolab). Mogelijk heeft deze kit een te lage gevoeligheid voor IgM. Van de 3 labo's die slechts een borderline positief IgM resultaat vonden, waren er twee borderline positief met de Cobas Core CMV IgM EIA (2 op 2 gebruikers) en 1 was borderline positief met de Dade Behring, Enzygnost Anti CMV IgM (1 op 20 gebruikers).

Het tweede staaltje werd afgenomen 11 weken na het begin van de symptomatologie. Van de 235 labo's die een antwoord hebben gegeven voor IgM antwoordden er 191 positief, 30 borderline positief, en 10 negatief. De verdeling van de negatieve resultaten was als volgt: Bipharco-Socolab (1 op 1 gebruiker); Roche Cobas

Core CMV IgM EIA (2 op 2 gebruikers); Dade Behring, Enzygnost Anti CMV IgM (3 op 20 gebruikers), Biorad, Novum CMV IgM (1 op 1 gebruiker) home made (2 op 2 gebruiker) en 1 niet gespecificeerd.

Na analyse van de IgM resultaten van deze twee stalen kunnen we besluiten dat bij sommige kits de CMV IgM's sneller negativeren dan bij andere kits. Gezien deze conclusies werden getrokken op stalen afkomstig van slechts één patiënt is het voorbarig om te stellen dat deze kits minder doeltreffend zijn dan de andere. Een nazicht kan uitsluitel geven.

6.5.4. Juiste antwoorden voor CMV serologie

Daar er in de twee staaltjes die werden opgestuurd geen seroconversie aangetoond kon worden is een onderscheid tussen primaire infectie en reactivatie niet mogelijk en worden de volgende antwoorden goedgekeurd

Serologie suggestief voor een primaire infectie met CMV (190 labo's)

Serologie suggestief voor een primaire infectie of reactivatie met CMV (3 labo's)

Einde van een recente infectie (1 labo)

6.5.5. Foutieve antwoorden voor CMV serologie

Serologie suggestief voor een oudere infectie (8 labo's)
(Aanwezigheid van IgM zal steeds de mogelijkheid openlaten van een primaire infectie of een reactivatie.)

Acute infectie maar geen primoinfectie (1 labo)

(Onmogelijk te stellen dat het geen primoinfectie was –zie hoger))

Serologie suggestief voor een primaire infectie of oudere infectie afhankelijk van de aviditeit: (1 labo)

6.5.6. Bespreking EBV serologie

De serologische diagnose van herpesvirussen wordt bemoeilijkt door hun onderlinge kruisreacties. Een infectie met een bepaald type herpesvirus kan een stimulatie van de immunitaire respons met zich meebrengen en de antilichamen t.o.v. andere Herpesvirussen doen stijgen. Vooral IgM bepalingen zijn onderhevig aan dergelijke kruisreacties.

Bepaalde testen zijn gevoeliger aan dit soort kruisreacties. Het is dus noodzakelijk dat het laboratorium kennis heeft van de graad van kruisreacties waaraan zijn test onderhevig is.

Het tweede objectief van deze kwaliteitscontrole was dan ook nagaan of de gebruikte IgM techniek van het labo aanleiding geeft

tot kruisreacties met andere herpesvirussen. Om dit na te gaan werd gevraagd om op dezelfde stalen EBV IgG en IgM te testen.

6.5.7 IgM antistoffen tegen EBV

De patiënt had reeds IgG antilichamen tegen EBV van een vroeger doorgemaakte EBV infectie.

Nochtans vonden 6 labo's een negatieve of borderline positieve IgG titer. Deze labo's hadden IgG bepaald tegen het early antigen (EA). Van de 13 labo's die IgG tegen EA hadden getest vonden slechts 7 een positieve IgG. Opsporen van IgG antistoffen tegen het EA is geen goede techniek om een na te gaan of de patiënt reeds een infectie met het EBV virus heeft doorgemaakt. Immers de EA antilichamen stijgen kort na de infectie maar worden negatief enkel maanden na de acute infectie. Bij reactivaties, en bij EBV geassocieerde neoplasieën (Burkitt lymfoom, nasofaryngeaal carcinoom) kunnen ze opnieuw gedetecteerd worden. Het bepalen van IgG antistoffen tegen het VCA antigen is aangewezen voor het nagaan van vroeger doorgemaakte EBV infecties.

6.5.8 IgM antistoffen tegen EBV

188 labo's vonden geen kruisreactie met de aanwezige CMV IgM antistoffen.

Positieve of borderline positieve IgM resultaten werden bekomen door 15 (7,4%) labo's en dit op de 2 serumstalen. Deze kruisreacties werden gevonden door: Biotest (6 op 8 gebruikers), Trinity Biotech (1 op 3 gebruikers), Meridian IFA (3 op 30 gebruikers), Meridian monolert (1 op 4 gebruikers), BMD immunblot tets (1 op 7 gebruikers), biorad platelia (1 op 1 gebruiker), en 1 met ongekend reagens.

Een kruisreactie is geen onoverkomelijk probleem in zoverre men een positieve test steeds confirmeert. Confirmatie kan gebeuren door gebruik te maken van een andere techniek, of door een bijkomende serologische parameter te bepalen. Het bepalen van EBNA IgG antistoffen in geval van een positief EBV IgM resultaat kan gebruikt worden om een EBV IgM serologie te confirmeren. EBNA antistoffen beginnen te stijgen 2 à 3 maand na een primaire EBV infectie en bereiken een piek na 7 à 8 maand. Ze blijven levenslang positief. Een positieve EBNA IgG serologie sluit een primaire EBV infectie uit.

Indien de EBV IgM test gebeurt op een staal afgenomen op het moment van de klinische symptomen, kan het percentage kruisreactie hoger zijn dan de hier gevonden 7,5%. Het is aangewezen dat ieder labo de gebruikte techniek evalueert en nagaat of confirmatietesten noodzakelijk zijn of niet.

6.5.9. Juiste antwoorden voor EBV serologie

Serologie suggestief voor een oudere infectie met EBV (180 labo's)
Geen acute EBV infectie (1 labo)
Secundaire reactivatie te wijten aan een andere infectie(3 labo's)

6.5.10. Foutieve antwoorden voor EBV serologie

Serologie suggestief voor een oudere infectie met CMV (1 labo)
Serologie negatief voor CMV (1 labo)
Serologie negatief voor EBV (1 labo)
Complementaire test nodig om primaire infectie uit te sluiten. (1 labo)
(Indien het labo een test gebruikt die onderhevig is aan kruisreacties moet het labo zelf in staat zijn de complementaire tests uit te voeren)

A. NAESSENS (UZ – Jette)