

FEDERALE OVERHEIDSDIENST
VOLKSGEZONDHEID, VEILIGHEID VAN DE VOEDSELKETEN EN LEEFMILIEU
COMMISSIE VOOR KLINISCHE BIOLOGIE
DIENST LABORATORIA VOOR KLINISCHE BIOLOGIE
COMITE VAN DESKUNDIGEN

EXTERNE KWALITEITSEVALUATIE
VOOR ANALYSEN KLINISCHE BIOLOGIE

GLBAAL RAPPORT

MICROBIOLOGIE / SEROLOGIE / PARASITOLOGIE

ENQUETE 01/2003

Microbiologie (identificaties)

Enterococcus faecium
Neisseria gonorrhoeae
Bacillus cereus
Salmonella berta

Parasitologie

Loa loa

Serologie

CMV
EBV
Toxoplasma

COMITE VAN EXPERTEN VOOR MICROBIOLOGIE / SEROLOGIE

WIV-LP (secretariaat) : 02/642.55.21 - FAX : 02/642.56.45
Dr Kris VERNELEN : 02/642.55.29 - FAX : 02/642.56.45
E-mail : Kris.Vernelen@iph.fgov.be

Dr BODEUS Monique : 02/764.34.20 - FAX :
E-mail : bodeus@mblg.ucl.ac.be

Dr CLAEYS Geert : 09/240.36.45 - FAX : 09/240.36.59
E-mail : geert.claeys@rug.ac.be

Dr CROKAERT Françoise : 02/541.37.00 - FAX : 02/541.32.95
E-mail : fcrokaer@ulb.ac.be et nathalie.cardinal@bordet.be

Apr CRUCITTI Tania : 03/247.65.52 - FAX : 03/247.64.40
E-mail : tcrucitti@itg.be

Dr DE BEENHOUWER Hans : 02/582.76.27 - FAX : 053/72.42.72
E-mail : hans.de.beenhouwer@olvz-aalst.be

Dr DE GHELDRE Yves : 081/42.32.00 - FAX : 081/42.32.04
E-mail : yves.degheldre@mont.ucl.ac.be

Dr DEDISTE Anne : 02/538.54.21 - FAX : 02/535.45.30
E-mail : anne_dediste@stpierre-bru.be

Dr DELFORGE Marie-Luce : 02/555.34.53 - FAX : 02/555.64.59
E-mail : mdelforg@ulb.ac.be

Dr JADIN Jean-Marie : 064/23.40.81 - FAX : 064/23.38.47
E-mail :

Apr LONTIE Marc : 016/31.01.72 - FAX : 016/31.01.88
E-mail : marc_lontie@mchlvwo.be

Dr LUYASU Victor : 010/43.74.63 - FAX : 02/653.91.20
E-mail : v.luyasu@interweb.be

Dr MAGERMAN Koen : 011/30.97.40 - FAX : 011/30.97.50
E-mail : koen.magerman@virgajesse.be

Dr NAESENS Anne : 02/477.50.02 - FAX : 02/477.50.15
E-mail : anne.naessens@az.vub.ac.be

Dr VAN RANST Marc : 016/34.79.08 - FAX : 016/34.79.00
E-mail : marc.vanranst@uz.kuleuven.ac.be

Dr VERHAEGEN Jan : 016/34.70.73 - FAX : 016/34.79.31
E-mail : jan.verhaegen@uz.kuleuven.ac.be

Dr VERVOORT Tony : 03/247.64.36 - FAX : 03/247.64.40
E-mail : tvervoort@poliklin.itg.be

Dr ZISSIS Georges : 02/535.45.30 - FAX : 02/535.46.56
E-mail : georges_zissis@stpierre-bru.be

I. ALGEMENE BEMERKINGEN

Voor de eerste evaluatie van het jaar 2003 (enquête 2003/1) werd volgend materiaal verzonden op 20 januari 2003.

- 1.1. Vier gelyofiliseerde monsters voor identificatie.
Voor 1 monster werden de resultaten van de gevoeligheidstesten gevraagd.
- 1.2. Twee bloeditstrijkjes voor parasitologisch onderzoek.
- 1.3. Drie gevriesdroogde plasmamonsters voor het opsporen van antistoffen tegen EBV, CMV en Toxoplasma.

AANTAL DEELNEMERS

Het aantal evalueerbare antwoordbulletins bedroeg :

- | | |
|--|-----|
| 1. Voor identificatie en antibiogram : | 216 |
| 2. Voor parasitologie : | 208 |
| 3. Voor de serologie : | |
| CMV: | 206 |
| EBV: | 190 |
| Toxoplasma: | 206 |

II. IDENTIFICATIES

2.1. Cultuur M/4086 was een vancomycine-resistente *Enterococcus faecium*

I. Identificatie van enterokokken : cfr rapport EKE 01/2002

II. Antibiogram voor enterokokken :

1. Bodem : Muller-Hinton II zonder toevoeging van bloed
2. Incubatie : 35°C, omgevingsatmosfeer, 16 tot 18h maar 24h voor vancomycine.
3. Inoculum : 0.5 McFarland
4. Stammen voor de kwaliteitscontrole:
S. aureus ATCC 25923
E. faecalis ATCC 29212 (gevoelig)
E. faecalis ATCC 51299 (resistent)
5. Bepaalde vormen van resistentie komen in vitro weinig of niet tot uiting en zijn moeilijk aan te tonen via de diffusiemethode of met automaten ; het is daarom noodzakelijk de MIC waarden te bepalen via de verdunningsmethode of via de E-test® om de gevoeligheid voor deze antibiotica na te gaan.

Hoewel wilde enterokokken stammen gevoelig zijn aan ampicilline, zijn ze intrinsiek resistent aan vele andere antibiotica (cf. tabellen 1 en 2). Sinds enkele jaren hebben sommige enterokokken mechanismen verworven die leiden tot een high level resistentie (met name tegen penicillines, glycopeptiden en aminoglycosiden) (cf. tabel 3). Daarom is het noodzakelijk een antibiogram uit te voeren bij ernstige infecties. We dienen nochtans aan te stippen dat het verwerven van deze multiresistentie de kiemen niet pathogener maakt.

Tabel 2.1.1. Intrinsieke resistentie gemeenschappelijk voor alle species van het genus *Enterococcus* :

Antibioticum	Commentaar
Aminoglycosiden	Low level resistentie MIC: 4 tot 250 µg/ml
Cefalosporines	Alle generaties
Clindamycine	Uitgezonderd <i>E.faecium</i> , <i>E.durans</i> , <i>E.hirae</i> (die echter wel een verworven resistentie kunnen vertonen)
Co-trimoxazole	Nochtans is de succesvolle behandeling van urinaire infecties beschreven.
Oxacilline	

Deze antibiotica dienen niet getest worden en mogen niet als gevoelig geantwoord worden. De aminoglycosiden mogen niet met de gebruikelijke concentraties getest worden.

Tabel 2.1.2. Intrinsieke resistentie specifiek voor bepaalde *Enterococcus* species :

Species	Antibioticum	Resistentiemechanisme
<i>E. faecium</i>	Alle aminoglycosiden (high level resistentie) behalve gentamicine en streptomycine	[AAC(6')-1] = acetyltransferase
<i>E. gallinarum</i> , <i>E. casseliflavus</i>	Vancomycine : low level resistentie	Van C. Chromosomale resistentie via een operon(niet transfereerbare transcriptie-eenheid). Wijziging van de target
<i>E. faecalis</i>	Quinupristine - Dalfopristine	Natuurlijke resistentie tegen streptograminen A (Dalfopristine)

Tabel 2.1.3. Belangrijkste verworven resistenties :

Species	Antibioticum	Resistentiemechanisme	MIC
Alle	Ampicilline low level R	Productie van PBP-5 met zwakke affiniteit	
<i>E. faecalis</i> (zeer zeldzaam)	Ampicilline	Productie van β -lactamase	MIC Ampic : = 8 $\mu\text{g/ml}$ maar kan >100 $\mu\text{g/ml}$ zijn bij een belangrijk inoculum
<i>E. faecium</i> vooral	Ampicilline	Hyperproductie PBP-5 Gewijzigde PBP-5	MIC Ampic : 8 à 32 $\mu\text{g/ml}$
Alle	Ampicilline high level R	\downarrow affiniteit van PBP voor Ampic	MIC Ampic : > 128 $\mu\text{g/ml}$
<i>E. faecium</i> >> <i>E. faecalis</i>	Vancomycine Teicoplanine	Van A	Vanco $\mu\text{g/ml}$ 64 à 1000 Teico $\mu\text{g/ml}$ 16 à 512
<i>E. faecium</i> >> <i>E. faecalis</i>	Vancomycine	Van B	4 à 1000 0.5 à 1(dwz S)
Alle	Aminoglycosiden	Plasmide dat codeert voor een enzyme dat het antibioticum inactieveert*	MIC Gent. : >500 $\mu\text{g/ml}$

*Testen van de high level aminoglycoside resistentie :

De high level aminoglycoside resistentie komt in vitro enkel tegen gentamicine tot uiting (eventueel tegen streptomycine of kanamycine). Tegen amikacine en netilmicine wordt ze in vitro niet aangetoond.

De bepaling wordt uitgevoerd volgens het onderstaande schema via MIC -bepaling of via de diffusie-techniek met papieren schijfjes of ROSCO tabletten . Aanbevelingen volgens de normen van 2002 :

Test	Lading ($\mu\text{g/ml}$)	S	I	R
Gentamicine (High Level Resistance)				
MIC (NCCLS)		$\leq 500 \mu\text{g/ml}$		$> 500 \mu\text{g/ml}$
NCCLS	120	$\geq 10 \text{ mm}$	7-9 mm	6 mm
SFM	500	$\geq 17 \text{ mm}$		$\leq 11 \text{ mm}$
ROSCO	250			$< 14 \text{ mm}$

In geval van high level gentamicine resistentie bestaat er geen synergie meer met penicilline, ampicilline en vancomycine.

Resistentie tegen glycopeptiden :

De eerste glycopeptide resistente enterokokken (VRE) werden in 1986 beschreven in de VS. Sindsdien is de frequentie van VRE stelselmatig toegenomen ($>20\%$ in 1998) zodat ze een majeur probleem wordt voor zowel de nosocomiale transmissie als de behandeling, vooral in de VS en Canada. In Europa blijft de frequentie van VRE $<10\%$. Surveillance studies bij gehospitaliseerde patiënten in 1995 en 1996 hebben in België een kolonisatie van 3.5% en 5.7% aangetoond. Dit percentage is gedaald sinds het verwijderen van Avoparcine als groeipromotor uit de diervoeding in 1997. Er zijn in België slechts enkele gevallen van infectie met VRE beschreven.

De meeste van de in de VS geïsoleerde VRE vertonen eveneens een high level resistentie tegen ampicilline en de aminoglycosiden, wat niet het geval is in Europa.

Resistentie van Enterokokken tegen glycopeptiden

	species	Resistentietype	Resistentiemechanisme
Van A	<i>E. faecium</i> >> <i>E. faecalis</i> >> andere species	Verworven high level resistentie Vanco R Teico R	Induceerbare meestal plasmidaire R door wijziging van de target der glycopeptiden
Van B	<i>E. faecium</i> >> <i>E. faecalis</i>	Verworven resistentie van variabel niveau Vanco R Teico S (deze stammen kunnen echter een resistentie tegen Teico verwerven)	Induceerbare R meestal chromosomaal, maar op transposon, dus transfereerbaar R door wijziging van de target der glycopeptiden
Van C	<i>E. gallinarum</i> , <i>E. casseliflavus</i>	Intrinsieke low level resistentie Vanco R Teico S	Niet transfereerbare low level R door wijziging van de target der glycopeptiden
Van D	<i>E. faecium</i> (zelden beschreven)	Verworven resistentie van variabel niveau Vanco R Teico limiet S	Chromosomale niet transfereerbare R
Van E	<i>E. faecalis</i> (zelden beschreven)	Intrinsieke low level resistentie Vanco R low level Teico S	Gelijkaardig aan Van C

Er bestaan verschillende moleculair biologische methoden die toelaten de resistentiegenen aan te tonen. Deze worden in de referentielaboratoria uitgevoerd.

Diffusietesten : aanbevelingen volgens de normen van 2002

Vancomycine		S	I	R
Lading ($\mu\text{g/ml}$)				
MIC (NCCLS)		$\leq 4 \mu\text{g/ml}$		$\geq 32 \mu\text{g/ml}$
NCCLS	30	$\geq 17 \text{ mm}$	15-16 mm	$\leq 14 \text{ mm}$
SFM	30	$\geq 17 \text{ mm}$		-
ROSCO	5	$\geq 15 \text{ mm}$	13-14 mm	$\leq 12 \text{ mm}$

Teicoplanine		S	I	R
Lading ($\mu\text{g/ml}$)				
MIC (NCCLS)		$\leq 8 \mu\text{g/ml}$		$\geq 32 \mu\text{g/ml}$
NCCLS	30	$\geq 14 \text{ mm}$	11-13 mm	$\leq 10 \text{ mm}$
SFM	30	$\geq 17 \text{ mm}^*$		-*
ROSCO	60	$\geq 16 \text{ mm}$	14-15 mm	$\leq 13 \text{ mm}$

* SFM : als diameter < 17 mm : MIC bepalen

Screening van de resistentie van enterokokken tegen glycopeptiden: er bestaan verschillende commerciële media van het type Vanco Screen agar[®] die een snelle detectie van VRE toelaten.

A. Dediste, CHU ST-Pierre, Bruxelles

REFERENTIES

1. Manual of Clinical microbiology. Murray P. et al. 7th ed.1999. ASM Press.
2. Précis de bactériologie clinique. Freney J., Renaud F., Hansen W., Bollet C. 3^{ème} éd 2000. Editions Alexandre Lacassagne.
3. NCCLS. Performance standards for Antimicrobial susceptibility Testing ; 12th Informational Supplement. M100-S12. January 2002
4. Comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie. Recommandations 2002.
<http://www.sfm.asso.fr>
5. User's guide Neosensitabs. 2002. 15th edition.
<http://www.rosco.dk>
6. Y. Cetinkaya et al. Vancomycin-Resistant Enterococci. Clinical Microbiology Reviews. 2000. 13(4) ; 686-707.
7. B.Gordts et al. Vancomycin-resistant enterococci colonizing the intestinal tract of hospitalized patients. JCM. 1995 ; 33 :2842.
8. M.Kanchana et al. Cost-Effective Algorithm for Detection and Identification of Vancomycine-Resistant Enterococci in Surveillance Cultures. Eur. J. Clin.Microbiol. Infect. Dis. 2000 ; 19 : 366-9.
9. Leclercq R. Faut-il identifier les entérocoques et comment ? La lettre de l'infectiologue. sept. 2001. XVI(7) ; 217-221.

2.2. Cultuur M/4181 *Neisseria gonorrhoeae*

Geïsoleerd uit het vaginale uitstrijkje van een jonge vrouw met klachten van vaginale afscheiding en dysurie is een *Neisseria gonorrhoeae*. De stam produceert een β -lactamase en is resistent tegen penicilline (MIC >32 $\mu\text{g/ml}$), tetracycline (MIC = 64 $\mu\text{g/ml}$) en ciprofloxacine (MIC >32 $\mu\text{g/ml}$) en gevoelig voor ceftriaxone (MIC = 0.012 $\mu\text{g/ml}$).

Na een daling van het aantal gevallen van gonorroe midden jaren 80 zien we terug een toename van de incidentie sinds 1997, die vooral te wijten is aan een toename van het aantal infecties bij mannen.

Het genus *Neisseria* bestaat uit Gramnegatieve diplokokken (met uitzondering van *N. elongata* die coccobacillair is) die aëroob groeien bij een optimale temperatuur van 35-37°C en waarvan de groei bevorderd wordt door CO_2 . Voor de groei van *N. gonorrhoeae* is CO_2 noodzakelijk. *Neisseria* species zijn oxidase positief en met uitzondering van *N. elongata* ook katalase positief.

Indien men *N. gonorrhoeae* wil kweken uit genitale monsters, waarin normale flora aanwezig is, gebruikt men een selectief medium, type Thayer Martin of New York City agar, die vancomycine, colistine, nystatine of amfotericine B en trimethoprim bevatten. Vermits vancomycine en trimethoprim de groei van gonokokken kunnen onderdrukken, ent men ook een niet-selectieve chocolade-agar.

Na 24 uur incubatie zijn kolonies van gonokokken 0.5-1 mm groot en niet-hemolytisch.

Identificatie tot op genusniveau gebeurt met Gramkleuring, oxidase en katalase en eventueel de groei op een niet-verrijkte bodem (TSA).

De identificatie op speciesniveau gebeurt op basis van hun productie van zuur uit suikers. Vermits *Neisseria* sp. suikers oxidatief en niet fermentatief verwerken

gebruikt men best een gevoelig medium zoals CTA met fenolrood als indicator. Als men de buizen dik genoeg ent, suikerschijfjes gebruikt (stabielere dan suikeroplossingen) en de buizen incubeert in de luchtbroedstoof en niet in de CO₂-broedstoof dan geeft deze methode weinig problemen.

Bevestiging van de identificatie kan gebeuren met een latextest type Phadebact Monoclonal GC Test (Boule Diagnostics).

	TM ¹	TSA	pigm ²	glu	mal	lac	suc	fruc	NO ₃	tribu	DNase	Kat
<i>N. gonorrhoeae</i>	+	0	0	+	0	0	0	0	0	0	0	+
<i>N. meningitidis</i>	+	+/-	0	+	0	0	0	0	0	0	0	+
<i>N. lactamica</i>	+	+	+	+	+	0	0	0	0	0	0	+
<i>N. polysacch.</i>	0	+	0	+	+	0	0	0	+	0	0	+
<i>N. subflava</i>	0	+	+	+	+	0	-/+	-/+	0	0	0	+
<i>N. sicca</i>	0	+	0	+	+	0	+	+	0	0	0	+
<i>N. mucosa</i>	0	+	0	+	+	0	+	+	+	0	0	+
<i>N. denitrificans</i>	0	+	0	+	0	0	+	+	0	0	0	+
<i>N. flavescens</i>	0	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0	+
<i>N. cinerea</i>	v	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+
<i>N. elongata</i>	0	+	0	0 ³	0	0	0	0	0	0	0	0 ³
<i>M. catarrhalis</i>	0	+	0	0	0	0	0	0	+	+	+	+

¹. Thayer Martin; ². geel pigment; ³. *N. elongata* subspecies glycolytica is glu + en katalase +.

Gevoeligheidsbepaling

Productie van het plasmide-gemedieerde enzyme β -lactamase wordt nagegaan aan de hand van de nitrocefinetest. De aanwezigheid van dit enzyme wijst op resistentie tegen penicilline met hoge MIC-waarden. In praktijk is er dan meestal ook een hoog-niveau resistentie tegen tetracycline, die ook plasmide-gemedieerd is.

Laag-niveau chromosomale resistentie tegen penicilline en tetracycline is wijd verspreid. Zij is het gevolg van puntmutaties. Bij penicilline leidt dit tot een afname van de affiniteit van de PBP's (Penicillin Binding Proteins) voor dit antibioticum. Deze vorm van resistentie is specifiek voor penicilline of tetracycline of kan pleiotroop zijn, afhankelijk van welke puntmutatie optreedt. Het effect van deze mutaties is additief (meertrapsmutaties).

Mutaties die resulteren in aminozuurveranderingen in de subunits A en B van het DNA gyrase (*GyrA* en *GyrB*) en in de *ParC* subunit van het topoisomerase IV leiden tot verminderde gevoeligheid aan of resistentie tegen fluorochinolones. Stammen met mutaties in beide subunits zijn gekenmerkt door hoge MIC waarden voor de fluorochinolones (MIC $\geq 2.0 \mu\text{g/ml}$), stammen met één enkele in *GyrA* zijn matig resistent (MIC 0.06-0.5 $\mu\text{g/ml}$).

Tot op heden zijn er nog geen problemen met ceftriaxone-resistentie. Wel hebben de fluorochinolone-resistente gonokokken significant hogere MIC's voor cefalosporines dan de verminderd gevoelige en gevoelige gonokokken.

Gevoeligheidsbepalingen kunnen uitgevoerd worden met de agar diffusiemethode op een GC-agar met 1% Isovitalax. Er zijn NCCLS-criteria opgesteld¹.

In geval van een fluorochinolone-resistente stam vraagt men hoe langer hoe meer naar de gevoeligheid aan azithromycine. Dit antibioticum is niet opgenomen in de NCCLS-criteria. Er zijn wel MIC-waarden beschreven in de literatuur².

Resistentie tegen azithromycine is reeds beschreven. Alle stammen van *N. gonorrhoeae*, ook de gevoelige, moeten opgestuurd worden naar het referentielaboratorium. Hiertoe ent men de stam op een chocolade-agar, incubeert men hem overnacht op 35-37°C in 5% CO₂ en stuurt men hem daags nadien, indien groei is opgetreden, met de post op waarbij men er op let dit zo te organiseren dat de stam bij voorkeur de dag nadien en zoniet twee dagen later op het referentielaboratorium aankomt, dus niet versturen op donderdag, vrijdag of voor een feestdag.

M. Van Esbroeck, ITG , Antwerpen

REFERENTIES

1. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Approved standard M100-S11. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Eleventh informational supplement. Wayne, PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2001.
2. Dillon JR, Rubabaza J-PA, Benzaken AS, et al. 2001. Reduced susceptibility to azithromycin and high percentages of penicillin and tetracycline resistance in *Neisseria gonorrhoeae* isolates from Manaus, Brazil, 1998. *Sex Transm Dis* (28):521-526.

2.3 Cultuur M/4229 is een *Bacillus cereus*

2.3.1. Kenmerken *B. cereus*

In het kader van de enquête, werd vermeld dat het staal een neusuitstrijkje was dat werd afgenomen bij een bioterroristische aanslag. Hierdoor moest er gedacht worden aan *Bacillus anthracis* en diende de differentieel diagnose gesteld te worden met aanverwante species.

B.cereus, behoort net als *B.anthraxis* tot de groep van sporenvormende bacillen met grote vegetatieve cellen ($\geq 1,3\mu\text{m}$) en niet deformerende sporen (endosporen). Deze groep omvat eveneens *B.thurigiensis* en *B.mycoides*, die sterk verwant zijn met *B.cereus* net zoals *B.megatherium*. De talrijke andere species van *Bacillus* waarvan sommige momenteel geklasseerd worden in andere genera: *Paenibacillus*, *Brevibacillus*, etc ... vertonen smallere cellen ($0.7 - 0.9\mu\text{m}$); enkele ontkleuren gemakkelijk waardoor ze op gram negatieve bacillen lijken en vele species vertonen deformerende ronde of ovale sporen. Er bestaat dus maar weinig kans dat deze species verward worden met *B.anthraxis*.

Het is in de eerst genoemde groep met grote cellen dat het onderscheid gemaakt dient te worden. *B.megatherium* is strikt aëroob daar waar het complex *cereus - anthracis* facultatief anaëroob is en glucose vergist. *B.mycoides* vormt kolonies met een rizoïde onregelmatige rand, die de agar invaderen. *B.thurigiensis* is een insectenpathogeen, dat zeer sterk op *B.cereus* lijkt.

Het is dus vooral tussen *B.cereus* en *B.anthraxis* dat de differentieel diagnose gesteld dient te worden. Op de gebruikelijke cultuurbodems,

zoals bloedagar, vormen beide species snel niet deformerende (meestal subterminale) sporen (endosporen). Vaak is er een rangschikking in ketens. Dit is vooral duidelijk bij rechtstreeks onderzoek van pathologische producten waarin *B.anthraxis* lange « paternosters » vormt waarvan de elementen als het ware in een rechte hoek afgesneden zijn en omgeven zijn door een kapsel, dat gevisualiseerd kan worden door de methode van M'Fadéyan.

De kolonies van *B.cereus* zijn groot (2 of meer mm diameter), met regelmatige of gekartelde randen; het algemeen uitzicht is meestal droog en mat, zelden glad en vochtig. Ze zijn duidelijk β -hemolytisch op bloedagar. De kolonies van *B.anthraxis* lijken hierop; ze zijn grijsachtig, meestal iets kleiner en vertonen geen hemolyse; indien deze hemolyse toch voorkomt, is ze beperkt en niet te vergelijken met deze van *B.cereus*. *B.cereus* is beweeglijk terwijl *B.anthraxis* onbeweeglijk is. De beweeglijkheid van een stam laat toe *B.anthraxis* uit te sluiten, doch onbeweeglijkheid volstaat niet om te besluiten dat het om een *B.anthraxis* gaat. Het is inderdaad zo dat bepaalde beweeglijke *Bacillus* stammen hun beweeglijkheid kunnen verliezen; daarenboven is *B.mycoïdes* onbeweeglijk maar, zoals hoger vermeld, volstaat het rizoïde invaderende aspect van zijn cultuur om verwarring te vermijden.

De virulente *B.anthraxis* stammen ontwikkelen een omvangrijk kapsel, samengesteld uit polypeptiden. Dit kapsel wordt gevormd in een proteïnerijk milieu en een eenvoudig middel om ze aan te tonen bestaat erin om de stam te enten in een klein volume serum gedurende enkele uren op 37°C, en ze vervolgens te kleuren met Oost-Indische inkt (kleuring M'Fadéyan)

Tot slot is *B.anthraxis*, tenzij in zeldzame gevallen, gevoelig aan penicilline terwijl *B.cereus* β -lactamasen ontwikkelt en resistent is.

Samengevat kan om de differentieel diagnose *B.cereus* - *B.anthraxis* te stellen, en dus het vermoeden van antrax al dan niet te bevestigen, volgende weg gevolgd worden:

1. Situeren van de stam in de groep *B.anthraxis* - *B.cereus* : grote gram positieve bacillen, duidelijk groter dan 1 μm , die niet deformerende sporen (endosporen) vertonen, die grote, matte ronde tot onregelmatige kolonies vormen, facultatief aëroob-anaëroob zijn en glucose vergisten.
2. Vermoeden van *B.anthraxis*: onbeweeglijke, niet (of slechts zeer gering) hemolytische stam, die gevoelig is aan penicilline, en omvangrijke kapsels vormt in serum.

G. Wauters, UCL, Bruxelles

2.3.2. Staalbehandeling in routine

Alhoewel *Bacillus anthracis* tot risicoklasse 3 behoort en als dusdanig niet mag gemanipuleerd worden in de meeste laboratoria is het steeds mogelijk dat een dergelijke stam zou worden geïsoleerd in de routine, zoals trouwens ook andere microorganismen behorend tot risicoklasse 3 (*Mycobacterium tuberculosis*, *Salmonella typhi*, *Shigella dysenteriae* type 1, *Histoplasma capsulatum*, ...). Verdachte culturen zullen met de nodige voorzichtigheid behandeld worden. Een veiligheidskabinet is ongetwijfeld nuttig en aanbevolen. De medische ethiek vraagt anderzijds om een zeer vlugge aanpak en het is dan ook belangrijk om *Bacillus anthracis* zeer snel te kunnen herkennen. Verdachte culturen kunnen worden bevestigd door het referentielabo:

CODA (Centrum voor Onderzoek in Diergeneeskunde en Agrochemie)

Groeselenberg 99

1180 Ukkel

Tel.: 02/ 379 04 00

Fax: 02/ 379 04 01

E-mail: info@var.fgov.be

Website: <http://www.var.fgov.be>

We danken Prof. G. Wauters voor het opstellen van dit rapport.

M. Lontie, MCH, Leuven

2.1.3. Behandeling van stalen in het kader van een bioterroristische aanslag

Controlestam M/4229 betrof een *Bacillus cereus*. U kreeg als klinische inlichting "neuskweek afgenomen bij een patiënt mogelijk blootgesteld aan bioterroristische aanslag".

Voor het onderzoeken van klinische monsters en omgevingsmonsters heeft de federale regering een richtlijn opgesteld die kan worden geconsulteerd op internetadres www.health.fgov.be/biotox. In deze richtlijn wordt gesteld dat verdachte monsters onmiddellijk moeten worden opgestuurd naar een referentielaboratorium met biosafety level 3. In deze richtlijn wordt ook uitgelegd hoe dit moet gebeuren.

Deze richtlijn verschilt van de richtlijn van de CDC (www.bt.cdc.gov) waarbij klinische laboratoria van level A (voldoen aan biosafety level 2) wel verdachte klinische stalen kunnen enten en de aanwezigheid van *B. anthracis* uitsluiten. Bij vermoeden van *B. anthracis* moeten ze de stam onmiddellijk doorsturen naar een laboratorium van level B of level C. Zelf bijkomende testen uitvoeren wordt afgeraden omdat dit voor onnodig tijdverlies en risico's zorgt. Laboratoria van level A mogen geen omgevingsstalen analyseren.

Als we de Belgische richtlijn strikt hadden toegepast dan hadden we deze stam niet mogen rondsturen. Omwille van didactische redenen vonden wij het echter wel zinvol om enkele aspecten te belichten.

Neuswissers worden volgens de richtlijn van de CDC afgeraden voor de diagnose van anthrax, om te bepalen of profylaxe moet worden toegediend of kan worden gestopt, of als bijkomend onderzoek voor de omgeving.

Neuswissers kunnen wel nuttig zijn om een zone van blootstelling te definiëren en om vast te stellen bij een geval van anthrax waar en wanneer de patiënt zou zijn blootgesteld.

De sensitiviteit van de neuskweek neemt af in de tijd. Wissers moeten worden afgenomen voor 7 dagen na de blootstelling.

CDC raadt voor het uitvoeren van een kweek van *Bacillus anthracis* aan:

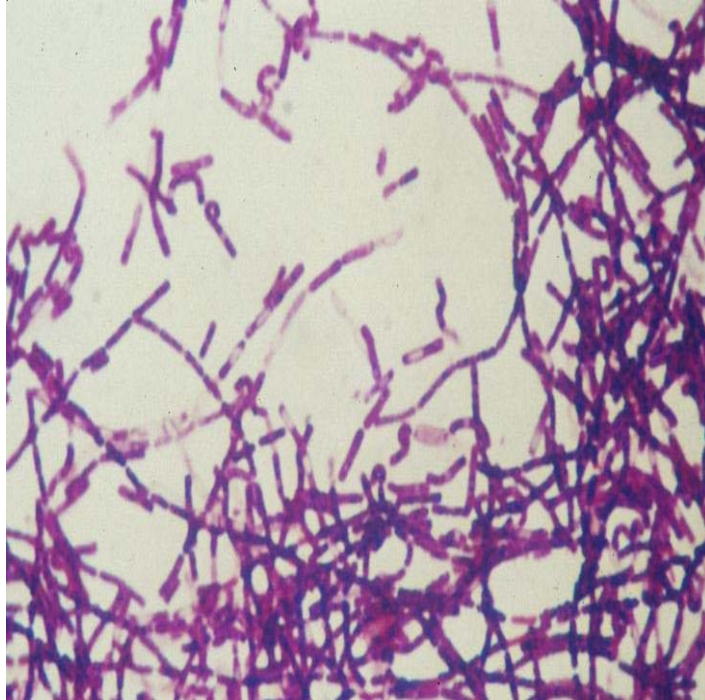
- gebruik een veiligheidskabinet
- gebruik handschoenen
- voorkom aërosolvorming
- handen wassen
- aangezichtsscherm indien nodig

K. Magerman, Virga Jesse ziekenhuis,
Hasselt

REFERENTIES

1. Richtlijnen in verband met opzettelijke verspreiding van anthrax. TECHNISCHE FICHE - WIV/ISP, beschikbaar op www.health.fgov.be/biotox
2. Level A lab procedure for identification of *Bacillus anthracis* beschikbaar op www.bt.cdc.gov/agent/anthrax/lab-testing
3. Biosafety in the Laboratory beschikbaar op www.cdc.gov
4. Large-Scale screening of Nasal Swabs for *Bacillus anthracis* : Descriptive Summary and Discussion of the National Institute of Health's Experience, P Kiratisin et al. , Journal of clinical Microbiology, Aug. 2002, p. 3012-3016
5. Laboratory Response to Anthrax Bioterrorism, New York City, 2001, M.B. Heller et al., Emerging Infectious Diseases, Vol. 8, No. 10, Oct 2002, p. 1096-1102
6. Bioterrorism - A Perspective for the Community Hospital, J.M. Miller, Clinical Microbiology Newsletter, Vol. 23, No. 23, Dec. 2001, p. 179-185
7. Bioterrorism: Implications for the Clinical Microbiologist, W.F. Krietmann and K.L. Ruoff, Clinical Microbiology Reviews, Vol. 14, No. 2, Apr. 2001, p. 364-381
8. Interim Guidelines for Investigation of and Response to *Bacillus Anthracis* Exposures, MMWR, Vol. 50, No. 44, Nov. 2001, p. 987-990

Fig. 2.3.1. Microscopisch aspect van *B. anthracis* met sporen (in cultuur)



2.4. Cultuur M/4063 *Salmonella Berta*

De kiem werd geïsoleerd uit de stoelgang van een man van 40 jaar met diarree na terugkeer uit een Zuid-Europees land.

Net zoals bij de enquêtes 02/2000 (cultuur M/903) en 02/2002 (cultuur M/3093), werd een externe kwaliteitsevaluatie uitgevoerd om de identificatie en de gebruikte terminologie die na te gaan. De kiem was een *Salmonella enterica*, subspecies *enterica*, serovar Berta met volgende antigene formule :

$1,9,12 : [f],g,[t] : -$.

Voor de nomenclatuur en de te gebruiken isolatiemilieus verwijzen we respectievelijk naar de rapporten van de enquêtes 02/2000 en 02/2002.

Algemeen gesproken identificeren de laboratoria *Salmonella* tot op genus of speciesniveau (*enterica* of *bongori*) met biochemische testen en bevestigen de diagnose met een serologische test (meestal polyvalente sera of zeldzamer sera met de frequentste serotypes: O:4,5 (B) - O:6,7,8 (C₁,C₂,C₃) - O:9 (D₁) (ongeveer 90% van de stammen van menselijke oorsprong). De bepaling van het serovar of serotype op basis van het Kauffmann-White schema berust dan bij het Nationaal Referentiecentrum.

Fenotypische basis van de identificatie :

Salmonella bezit de typische karakteristieken van enterobacteriaceae : rechte, gramnegatieve, vaak beweeglijke bacillen, die op de gewone aërobe en anaërobe voedingsbodems groeien, glucose vergisten vaak met gasproductie, oxidase negatief zijn en nitraten naar nitrieten reduceren.

De grote meerderheid (99,8%) van de *Salmonellastammen*, die bij de mens en warmbloedige dieren geïsoleerd worden behoren tot subspecies I, die volgend biochemisch profiel heeft :

- lactose⁻, ONPG⁻, H₂S⁺, gas (glucose)⁺ ;
- LDC⁺, ODC⁺, ADH⁻, urease⁻, TDA⁻, indol⁻, gelatinase⁻, DNase⁻ ;
- afwezigheid van acetoinproductie (Voges-Proskauer test⁻), MR⁺, Simmons-citraat⁺, adonitol⁻, glycerol⁻, galacturonaat⁻.

ONPG	: orthonitrofenyl-β-D-galactopyranoside
ADH	: arginine-dihydrolase
LDC	: lysine-decarboxylase
TDA	: tryptofaan-desaminase
ODC	: ornithine-decarboxylase
RM	: methylrood

Er bestaan nochtans belangrijke uitzonderingen : het serovar Typhi decarboxyleert geen ornithine, groeit niet op Simmons-citraat, produceert geen gas en produceert slechts sporen van H₂S ; het serovar Paratyphi A produceert geen H₂S, decarboxyleert geen lysine en groeit niet op Simmons-citraat.

Van serovar Berta zijn sommige isolaten H₂S⁻ (zoals het geval was bij **cultuur M/4063**) zodat ze op de isolatiebodems op basis van ijzercitraat en natriumthiosulfaat (vb. : XLD, DCLS, Hektoen, SS) geen zwart centrum vertonen. De serovars Choleraesuis en Gallinarum (vogels), zijn eveneens H₂S⁻.

De genera waarmee *Salmonella* verward kan worden zijn *Citrobacter* (lysine en vaak ornithine decarboxylase negatief, vergist 2-ketogluconaat) en *Hafnia* (H₂S⁻, ONPG⁺, VP⁺ en citraat⁻ op 20-30°C). Een typisch probleem treedt op bij de API 20 E galerij, geïncubeerd bij 37°C, waarbij men bij *Hafnia alvei* negatieve ONPG et VP testen aantreft.

Voorafgaand aan de identificatie met dergelijke galerij (vb. : API 20 E), is het dus nuttig oriëntatietesten uit te voeren op de verdachte kolonies:

- Kligler-Hajna of TSI
- Ureum indol van Fergusson (elimineert *Proteus* dat een positieve urease reactie vertoont na 2 uur en *Edwardsiella* dat indol⁺ is)
- Lysine decarboxylase
- Reagens om β -galactosidase op te sporen

Antigene identificatie:

De bepaling van het *Salmonella* serotype gebeurt door bepaling van de somatische O, flagellaire H en oppervlakte (Vi) antigenen volgens het schema van Kauffmann en White. Het Vi antigen wordt enkel aangetroffen bij Typhi, Paratyphi C en zeldzame gevallen van Dublin. De grote meerderheid van de H antigenen komen onder een bifasische vorm voor, d.w.z. dat ze twee verschillende antigenen specificiteiten vertonen. Sommige belangrijke serovars zoals Enteritidis (1, 9,12 : g,m : -) zijn monofasisch. De antigenen, die door mutatie gemakkelijk variëren, worden tussen haakjes geplaatst en zij, die een faag of plasmide determinisme hebben, worden onderlijnd (zij kunnen op elk ogenblik verworven worden of verloren gaan).

In sommige gevallen kan de bijkomende factor O (tussen rechte haakjes geplaatst) opgespoord worden om de antigenen variëteit te specificeren.

vb. : de aanwezigheid van factor O:5 laat toe om serovar Typhimurium op te splitsen in

Typhimurium = 1,4,[5],12 : i : 1,2 of

Typhimurium var. Copenhagen = 1,4,12 : i : 1,2

Resultaten : Cultuur M/4063 (stoelgang)

<u>Salmonella groep D</u>	74
<u>Salmonella groep D (niet S. Typhi)</u>	8
<u>Salmonella groep D (niet S. Enteritidis)</u>	1
<u>Salmonella Berta</u>	1
<u>Salmonella enterica O:9</u>	3
<u>Salmonella groep O:9</u>	2
<u>Salmonella groep OMA*</u>	2
<u>Salmonella enteritidis</u>	19
<u>Salmonella groep B</u>	1
Niet uitgevoerd in laboratorium	1

* OMA omvat de agglutinines voor de factoren 1, 2, 3, 4, 5, 9, 10, 12, 15, 19, 21 en 46 overeenkomend met groepen A, B, D, E, L

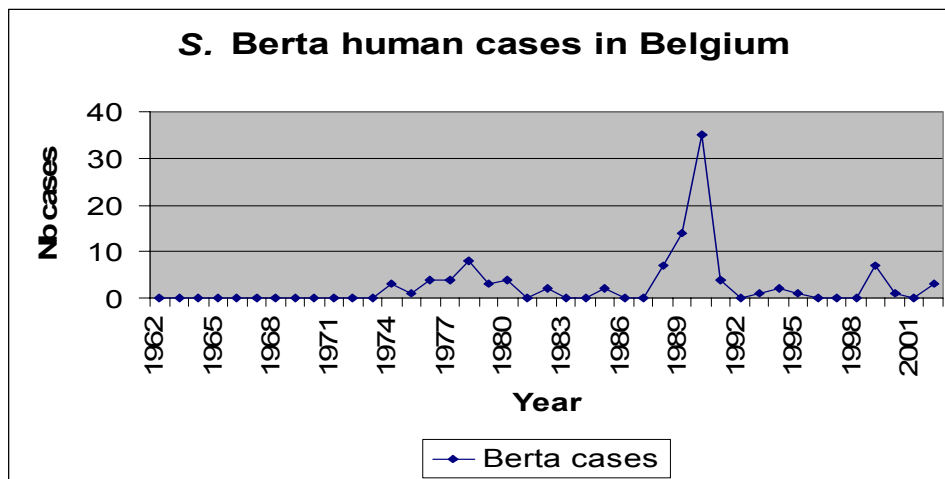
Opmerking: het H₂S negatieve karakter van de stam werd door 12 laboratoria vermeld; 8 bij de identificatie *Salmonella* sp. en 4 bij de identificatie *Salmonella* groep D.

De meerderheid van de deelnemers hebben een correct antwoord gegeven (onderlijnde antwoorden), één laboratorium antwoordde zelfs het correcte serotype. Daarentegen antwoordden 19 laboratoria *Salmonella* Enteritidis (1, 9, 12 : g, m : -), serovar van dezelfde groep (O:9, voorheen aangeduid door de letter D₁) die een antigene formule vertoont gelijkaardig aan serovar Berta (1, 9, 12 : [f], g, [t] : -). Inderdaad enkel de formule van de fase H1 is verschillend, met daarenboven nog een gemeenschappelijk antigeen (g). De stam geïsoleerd uit cultuur M/4063 agglutineerde met de sera H:f, H:g,m en H:t en agglutineerde niet met de sera H:m en H:s, vanwaar de fase H1:f,g,t. Bovenop de aanwezigheid van H:f, sloot de afwezigheid van agglutinaties met H:m de serovar Enteritidis uit en sloot de afwezigheid van agglutinaties met H:s een *Salmonella* van de subspecies II (S. II 9,12 : g,s,t : e,n,x) uit, vermits geen enkele omkering van de fase gerealiseerd werd (fase H2 is afwezig bij de serovar Berta).

Twaalf laboratoria vermelden tevens dat de stam H₂S negatief is.

De serovar Berta is een serovar die slechts zeer weinig voorkomt in ons land, behalve in 1990 wanneer 35 gevallen gemeld werden (Fig. 2.4.1). De toename van deze serovar in Engeland en Wales wordt toegeschreven aan uit Denemarken ingevoerde vogelkadavers. Een epidemie van *S. Berta* werd eveneens gerapporteerd in Canada in 1994 tengevolge van het verbruik van een zachte kaas. Recent werden er geen specifieke rapporten gepubliceerd over de aanwezigheid van deze serovar in Zuid-Europese landen. In het onderhavige geval was de associatie met een reis naar het buitenland niet bepalend maar 10 laboratoria hebben om deze reden de aanwezigheid van *S. typhi* opgespoord en uitgesloten gezien de symptomen niet vermeld waren.

Fig. 2.4.1 : Aantal gevallen van *Salmonella Berta* bij de mens in België, vastgesteld door het Nationaal Referentiecentrum voor *Salmonella* en *Shigella* sinds 1962.



**Aanbevelingen van het Nationaal Referentiecentrum
voor *Salmonella* en *Shigella*:**

Elke isolatie van *Salmonella* bij de mens dient naar dit centrum verstuurd te worden op het volgende adres :

Nationaal Referentiecentrum voor *Salmonella* en
Shigella
Afdeling Bacteriologie
Wetenschappelijk Instituut voor Volksgezondheid
J. Wytmanstraat 14
B-1050 Brussel

De moleculaire typering (PFGE) wordt uitgevoerd op hetzelfde adres (Tel. : Dr S. Bertrand op 02/642 50 82).

Het formulier met de inlichtingen over de stam en de epidemiologie moet hierbij gevoegd worden. De reeds opgespoorde antigene kenmerken dienen eveneens vermeld te worden. In geval van epidemie of collectieve voedselintoxicatie, moeten slechts enkele stammen van verschillende patiënten verstuurd worden met de vermelding dat het een epidemie betreft en vermelding van het totaal aantal vastgestelde gevallen.

Het verzenden der culturen dient te gebeuren op een bewaarbodem in rechte, gesloten tubes waarbij de verpakking conform aan de internationale reglementering dient te zijn.

Dr J.-M. Collard
Directie van het Nationaal Referentiecentrum
Afdelingschef

REFERENTIES

1. A community outbreak of *Salmonella* berta associated with a soft cheese product. *Epidemiol Infect.* 1998 Feb;120(1):29-35.
2. Grimont P.A.D., Grimont F., et Bouvet P.J.M. *Salmonella*. 2000. *In Précis de Bactériologie clinique.* Ed. J. Freney, F. Renaud, W. Hansen, C. Bollen. Eska, Paris, pp. 557-568.
3. Grimont P.A.D., Grimont F., et Bouvet P.J.M. *Salmonella*. 1994. *In Manuel de Bactériologie clinique.* Vol. 2. Ed. Freney J., Renaud F., Hansen W. et Bollet C., Elsevier, Paris. pp. 1017-1042.
4. Kaufmann F. *The bacteriology of Enterobacteriaceae.* 1966. Munksgaard, Copenhagen.
5. Le Minor L. et Richard C. *Méthodes de laboratoire pour l'identification des entérobactéries.* 1993, Ed. Institut Pasteur, Paris, pp. 217.
6. Popoff M.Y. *Formules antigéniques des serovars.* 2001. 8^{ème} éd. Institut Pasteur de Paris, WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*.
7. Threlfall EJ, Hall ML, Ward LR, Rowe B. Plasmid profiles demonstrate that an upsurge in *Salmonella* berta in humans in England and Wales is associated with imported poultry meat. *Eur J Epidemiol.* 1992 Jan;8(1):27-33.

III. RESULTATEN VAN DE IDENTIFICATIES (N=)

De correcte of aanvaardbare resultaten zijn onderlijnd.

3.1. Cultuur M/4086 *Enterococcus faecium* (hemocultuur) N = 216

<u>Enterococcus faecium</u>	159 (73,6 %)
<u>Enterococcus species</u>	6 (2,8 %)
Enterococcus gallinarum	22
Enterococcus casseliflavus	12
Streptococcus faecium	9
Enterococcus avium	2
Leuconostoc species	2
Enterococcus faecalis	1
Enterococcus hirae	1
Streptococcus casseliflavus	1
Niet uitgevoerd in labo	1

3.2. Cultuur M/4181 *Neisseria gonorrhoeae* (vaginaal uitstrijkje) N = 216

<u>Neisseria gonorrhoeae</u>	202 (93,5 %)
Neisseria species	3
Neisseria meningitidis	2
Brucella species	1
Enterococcus durans	1
Moraxella species	1
Neisseria cinerea	1
Geen groei	3
Geen pathogeen	1
Niet uitgevoerd in labo	1

3.3. Cultuur M/4229 *Bacillus cereus* (neuskweek)

N = 216

<u>Bacillus cereus</u>	147 (68,0%)
<u>Bacillus non anthracis</u>	41 (19,0%)
<u>Bacillus cereus /thuringiensis</u>	1 (0,5%)
<u>Afwezigheid van Bacillus anthracis</u>	1 (0,5%)
<u>Geen pathogeen</u>	3 (1,4%)
<u>Negatief</u>	1 (0,5%)
Bacillus species	11
Bacillus thuringiensis	5
Bacillus pseudo anthracis	1
Bacillus mycoides	1
Oerskovia xanthineolytica	1
Neusflora	1
Geen antwoord	1
Niet uitgevoerd in labo	1

3.4. Cultuur M/4063 *Salmonella berta* (feces)

N = 216

<u>Salmonella species</u>	102 (47,2%)
<u>Salmonella species (niet S. typhi)</u>	1 (0,5%)
<u>Salmonella species (niet S. typhi of paratyphi)</u>	1 (0,5%)
<u>Salmonella groep D</u>	74 (34,2%)
<u>Salmonella groep D (niet S. typhi)</u>	8 (3,7%)
<u>Salmonella groep D (niet S. enteritidis)</u>	1 (0,5%)
<u>Salmonella berta</u>	1 (0,5%)
<u>Salmonella enterica O:9</u>	3 (1,4%)
<u>Salmonella groep O:9</u>	2 (0,9%)
<u>Salmonella groep OMA*</u>	2 (0,9%)
Salmonella enteritidis	19
Salmonella groep B	1
Niet in toepassingsgebied	1

* OMA omvat de agglutinines voor de factoren 1, 2, 3, 4, 5, 9, 10, 12, 15, 19, 21 en 46 overeenkomend met groepen A, B, D, E, L

Opmerking: het H₂S negatieve karakter van de stam werd door 12 laboratoria vermeld; 8 bij de identificatie *Salmonella* sp. en 4 bij de identificatie *Salmonella* groep D.

IV. ANTIBIOGRAM

Het type antibiogram is gebaseerd op de resultaten zoals die bekomen werden tijdens de EARRS studie, waarin deze stam eveneens rondgestuurd werd.

4.1. Cultuur M/4086

Aantal deelnemers= 216

Sommige deelnemers bepaalden de gevoeligheid met meer dan 1 methode. Per laboratorium wordt in onderstaande tabel 4.1.1. slechts 1 resultaat weergegeven. In de meeste gevallen werd met verschillende technieken door eenzelfde laboratorium eenzelfde resultaat bekomen voor eenzelfde antibioticum. Slechts in 3 gevallen werd bij vancomycine een verschillend resultaat tussen twee technieken vastgesteld: 2 maal werd met de diffusiemethode het resultaat 'intermediair' bekomen en met de MIC het resultaat 'resistent'; 1 maal werd het resultaat 'intermediair' bekomen met de E-test en 'resistent' met de 'Vancoscreen agar'. Deze 3 laboratoria werden voor vancomycine in onderstaande tabel als 'R' gerangschikt.

Tabel 4.1.1. Resultaten der laboratoria voor de antibiogrammen

Antibioticum	Verwacht resultaat	S	I	R
Amoxicilline	R	2	2	92
Ampicilline	R	1	1	200
Gentamicine ¹	R	9	1	191
Vancomycine	R	18	3	189
Teicoplanine	S	153	1	3

¹ Twee laboratoria vermeldden de noodzaak tot testen van «High level gentamicine», doch verklaren hierover niet te beschikken in hun laboratorium.

Eén laboratorium testte de gevoeligheid voor amoxicilline en ampicilline (beide waren resistent) en verklaarde voor de overige 3 antibiotica de stalen in routine door te sturen naar een referentie laboratorium. Vijf laboratoria vermeldden: Van B positief; één Van C positief.

Niet alle deelnemers vermeldden de gebruikte methode of lading. Voor zover deze aangegeven werd door de deelnemers, hebben wij voor de schijfjesmethode volgens NCCLS en ROSCO (NEO-SENSITABS) mediaan, minimum en maximum diameter bepaald. Sommige deelnemers vermeldden een andere lading dan de aangewezen lading of vermeldden de lading niet; deze laboratoria werden niet in de berekening der medianen, minimum en maximum opgenomen.

Tabel 4.1.2. Bekomen diameters met de schijfjesmethode volgens NCCLS

Antibioticum	Totaal aantal gebruikers	Aantal gebruikers met vermelding van lading	Lading	Mediane diameter	Minimum diameter	Maximum diameter
Amoxicilline	15	8	25	11	0	16
Ampicilline	52	49	10	6	0	7
Gentamicine ¹	49	21	10	6	0	10
		20	120	5	0	10
Vancomycine	44	39	30	10	0	19
Teicoplanine	21	21	30	18	16	20

¹ Hoewel voor enterokokken de bepaling van resistentie tegen 'high level gentamicine' aangewezen is, zijn er toch 21 laboratoria die de resistentie bepalen met een schijfje met een lading van 10 µg.

Tabel 4.1.3. Bekomen diameters met de schijfjesmethode volgens ROSCO

Antibioticum	Totaal aantal gebruikers	Aantal gebruikers met vermelding van lading	Lading	Mediane diameter	Minimum diameter	Maximum diameter
Amoxicilline	61	61	30	14	0	20
Ampicilline	86	86	33	11	0	20
Gentamicine ¹	99	30	40	8	0	27
Vancomycine ²	89	62	250	9	0	25
		71	5	9	0	21
		12	70	9	0	26
Teicoplanine	59	59	60	20	14	30

¹ Hoewel voor enterokokken de bepaling van resistentie tegen 'high level gentamicine' aangewezen is, zijn er toch 30 laboratoria die de resistentie bepalen met een schijfje met een lading van 40 µg.

² Hoewel voor de bepaling van resistentie tegen vancomycine door enterokokken het gebruik van een disk met een lading van 5 µg aangeraden is, zijn er toch 12 laboratoria die de resistentie bepalen met een schijfje met een lading van 70 µg.

OPMERKING

Er dient opgemerkt dat een aantal laboratoria bij groei tot tegen het schijfje een diameter gelijk aan «nul» rapporteren. Nochtans is het aangewezen dat in dergelijke gevallen geen «nul» geantwoord wordt, doch de diameter van het schijfje gerapporteerd wordt. (Deze «nullen» verklaren ook waarom de mediane diameter in sommige gevallen kleiner blijkt te zijn dan de diameter van het schijfje, wat uiteraard onmogelijk is).

De resultaten van de meest gebruikte MIC-bepaling, de E-test, worden weergegeven in tabel 4.1.4.

Tabel 4.1.4. De resultaten bekomen met de E test

Antibioticum	Aantal gebruikers	Resultaat
Amoxicilline	8	Concentraties : Gemiddeld : 37 mg/L Maximum : 16 mg/L Minimum : 64 mg/L
Ampicilline	20	Alle resultaten ≥ 48 mg/L 11/20 resultaten ≥ 256 mg/L
Gentamicine	12	Alle resultaten ≥ 256 mg/L 2/12 resultaten ≥ 1024 mg/L
Vancomycine	49	Zie opmerking ¹
Teicoplanine	30	Concentraties : Gemiddeld : 2 mg/L Maximum : 1 mg/L Minimum : 15 mg/L

¹ Voor vancomycine rapporteerden de deelnemers volgende resultaten: 6 laboratoria antwoordden «S» (met concentraties ≤ 3 mg/L), twee antwoordden «I» (concentraties van 8 en 16 mg/L), en 41 «R» (concentraties ≥ 32 mg/L; 33 onder hen vonden zelfs een concentratie ≥ 256 mg/L)

De resultaten bekomen met de Vitek worden weergegeven in tabel 4.1.5.

Tabel 4.1.5. Resultaten bekomen met de Vitek

Vitek 1					
Antibioticum	Totaal aantal gebruikers	Resultaten		Meest vermelde verdunning	Aantal labo's dat deze verdunning vermeldde
		S	R		
Amoxicilline	1	-	1	-	-
Ampicilline	13	-	13	> 16	7
Gentamicine ¹	13	-	13	-	-
Vancomycine ^{2,3}	15	1	14	> 32	6
Teicoplanine	15	15	-	< 4	7

Vitek 2					
Antibioticum	Totaal aantal gebruikers	Resultaten		Meest vermelde verdunning	Aantal labo's dat deze verdunning vermeldde
		S	R		
Amoxicilline	8	-	8	-	-
Ampicilline	34	-	34	≥ 32	30
Gentamicine ¹	32	1	31	≥ 500	5
Vancomycine ^{2,3}	32	1	31	≥ 32	26
Teicoplanine	33	33	-	≤ 1	28

¹ Er was één laboratorium dat bij gentamicine voor Vitek 2 een verdunning < 500 vond; dit laboratorium interpreteerde gentamicine als «S»

² Voor vancomycine op Vitek 1 was er één laboratorium dat een verdunning < 0,5 rapporteerde, doch dit wel als «R» interpreteerde.

³ Eén laboratorium rapporteerde voor vancomycine op Vitek 2 een verdunning < 1 met een interpretatie «S».

De ATB gebruikers kunnen als volgt gerangschikt worden: 5 laboratoria bepaalden resistentie tegen amoxicilline, 19 tegen ampicilline, 17 tegen gentamicine, 20 tegen vancomycine en 16 tegen teicoplanine.

Vier laboratoria bepaalden de resistentie tegen vancomycine met de «Vancoscreen agar».

Verder dienen vermeld:

- één laboratorium bepaalde de resistentie tegen vancomycine met de agardilutiemethode;
- één laboratorium bepaalde de resistentie tegen ampicilline, gentamicine, vancomycine en teicoplanine met de microdilutiemethode;
- één laboratorium bepaalde de resistentie tegen ampicilline, gentamicine, vancomycine en teicoplanine met Phoenix;
- één laboratorium bepaalde de resistentie tegen amoxicilline, ampicilline, gentamicine, vancomycine en teicoplanine met Mini Api;
- één laboratorium bepaalde de resistentie tegen ampicilline, gentamicine en vancomycine met Sensititre.

Ten slotte zijn er 6 laboratoria die voor één of meerdere antibiotica de gebruikte methode niet vermeldden.

V. PARASITOLOGIE

5.1. De monsters

Er werden 2 bloeditstrijkjes naar de laboratoria verzonden.

Staal P/3175 was voorzien van volgende klinische inlichtingen:

Een 25-jarige ontwikkelingswerker biedt zich, na zijn terugkeer uit Kongo aan met een voorbijgaande zwelling ter hoogte van de pols. Het bloedbeeld toont aanwezigheid van eosinofilie. Het uitstrijkje werd overdag afgenomen.

Dit staal bevatte microfilaria van *Loa loa*.

Staal P/4164 was voorzien van volgende klinische inlichtingen:

Een 40-jarige vrouw vertoont twee weken na de terugkeer van een rondreis doorheen Zuidelijk Afrika koorts. Tijdens haar rondreis nam zij de gebruikelijke profylaxe.

Dit staal was negatief.

5.2. De resultaten

5.2.1 Staal P/3175

In totaal namen 208 laboratoria deel aan de enquête. Eén laboratorium vermeldde de aanwezigheid van 2 parasieten.

Een overzicht van de antwoorden is terug te vinden in tabel 5.2.1

Tabel 5.2.1. Overzicht van de resultaten gerapporteerd voor staal P/3175

Parasiet	Aantal
Loa loa	141
Filariasis	34
Onchocerca volvulus	5
Wuchereria bancrofti	4
Mansonella ozzardi	2
Mansonella species	2
Mansonella streptocerca	2
Plasmodium malariae	2
Bartonella species	1
Dirofilaria immitis	1
Mansonella perstans	1
Naegleria fowleri	1
Plasmodium falciparum	1
Plasmodium vivax	1
Plasmodium species	1
Onchocerca volvulus ou Wuchereria bancrofti ¹	1
Afwezigheid van parasieten	9
Totaal	209

¹ Eén laboratorium vermeldde «Onchocerca volvulus of Wuchereria bancrofti».

Zowel de antwoorden *Loa loa* als filariasis kunnen als correct beschouwd worden.

Voor *Loa loa* werden volgende evolutiestadia vermeld: microfilaria (135), larve (3), volwassen vorm (2) en niet gepreciseerd (1).

Voor filariasis werden volgende evolutiestadia vermeld: microfilaria (30), volwassen vorm (1) en niet gepreciseerd (4) (één laboratorium vermeldde 2 evolutiestadia: microfilaria en volwassen vorm).

Zeven laboratoria zouden het staal in routine-omstandigheden doorsturen voor verdere identificatie of voor bevestiging van de eigen identificatie: 2 laboratoria die filariasis antwoordden, drie die *Loa loa* antwoordden en telkens één dat *Onchocerca volvulus* of afwezigheid van parasieten antwoordde.

5.2.2 Staal P/4164

In totaal namen 208 laboratoria deel aan de enquête. Een overzicht van de antwoorden is terug te vinden in tabel 5.2.2.

Tabel 5.2.2. Overzicht van de resultaten gerapporteerd voor staal P/4164

Parasiet	Aantal
Afwezigheid van parasieten	198
Plasmodium species	3
Plasmodium falciparum	2
Plasmodium vivax	1
Plasmodium malariae	1
Plasmodium vivax of ovale ¹	1
Trypanosoma species	1
Loa loa	1
Totaal	208

¹ Eén laboratorium vermeldde «Plasmodium vivax of Plasmodium ovale».

Het valt op te merken dat één laboratorium het staal naar een referentiecentrum zou sturen ter bevestiging; een ander laboratorium zou een serologische test voor malaria uitvoeren. Twee laboratoria raden een nieuwe staalname (dikdruppel) aan bij koorts. Het betreft hier vier laboratoria die het staal als negatief beschouwen.

5.3. Commentaar

Staal P/3175 *Loa loa*

Deze preparaten bevatten enkele microfilairen van *Loa loa*. De meeste microfilairen worden aangetroffen in de rand van het preparaat.

Algemene kenmerken van filaria

Filaria vormen een heterogene groep «fijne» nematoden, die als volwassenen in de weefsels, de lymfevaten of de caviteiten van de eindgastheer leven. Het embryo, de microfilaire, is gewoonlijk het diagnostisch stadium.

De microfilairen verschillen van elkaar door (4):

1. een bepaalde periodiciteit, gedurende de dag en of de nacht, in overeenstemming met de activiteit van de vector;
2. de lokalisatie bij de eindgastheer, in het bloed of in de huid;
3. het globale uitzicht in de preparaten (geplooiden vormen);
4. de grootte (vooral de diameter te vergelijken met de rode bloedcellen);
5. de aanwezigheid van een schede (met Giemsa kleurt de schede van *Brugia malayi* sterk roos, deze van *Wuchereria bancrofti* nagenoeg niet en deze van *Loa loa* niet; met Hematoxylline kleuren de schedes van deze drie species wel);
6. het uitzicht van het staarteinde (aanwezigheid van kernen tot op het einde, vorm);

Geografische verspreiding

Loa loa is een typisch Afrikaanse filaire, die voorkomt in westelijk en centraal Afrika. In Kongo-Kinshasa zijn het vooral de bosrijke gebieden (Mayumbe, Uélé) waar de worm voorkomt.

Volwassen wormen

Het wijfje meet 60 mm op 0.5 mm. Het mannetje is iets kleiner (30 mm x 0.4 mm). De volwassen wormen leven in het onderhuids weefsel en verplaatsen zich voortdurend. Soms kan de worm worden opgemerkt in de conjunctivae van de ogen (*eye worm*). Bij allergische personen kan de passage van de wormen aanleiding geven tot lokale reacties en zwellingen (*oedèmes fugaces de Calabar, Calabar swellings*). *Loa loa* werd ook in verband gebracht met andere zeldzame aandoeningen zoals endomyocardfibrose.

Cyclus

Het volwassen wijfje legt de microfilaria in het onderhuids weefsel. Deze bereiken de bloedbaan overdag overeenkomstig de activiteit van de vector, het wijfje van het *Chrysops* vliegje (1cm). De volledige cyclus wordt beschreven in figuur 5.3.1.

Diagnose

Soms kan men de volwassen worm zien in het oog of in de huid. De infectie gaat gewoonlijk gepaard met een verhoogde eosinofilie. Deze eosinofilie kan weliswaar variëren in functie van de tijd.

Meestal zal de diagnose gesteld worden door het vinden van de typische microfilarinen in het bloed. De dikdruppel, een bloeduitstrijkje of een aanrijkingstechniek (gewoonlijk na hemolyse) zijn hiervoor geschikt (3, 4). In Kongo-Kinshasa kunnen er drie soorten microfilarinen voorkomen in het perifere bloed (tabel 5.3.1). In huidscarificaties in Kongo kan men eveneens microfilarinen aantreffen van *Onchocerca volvulus* (rivierblindheid) en van *Mansonella streptocerca* (oude benaming *Dipetalonema*) (3, 4).

De microfilarinen van *Loa loa* meten 230 (200) - 300 μm op 6.0 tot 8 μm , en 270 - 300 μm in formol (1, 2, 3, 4). De andere diagnosemiddelen worden toegelicht op de website van het CDC (5).

Therapie

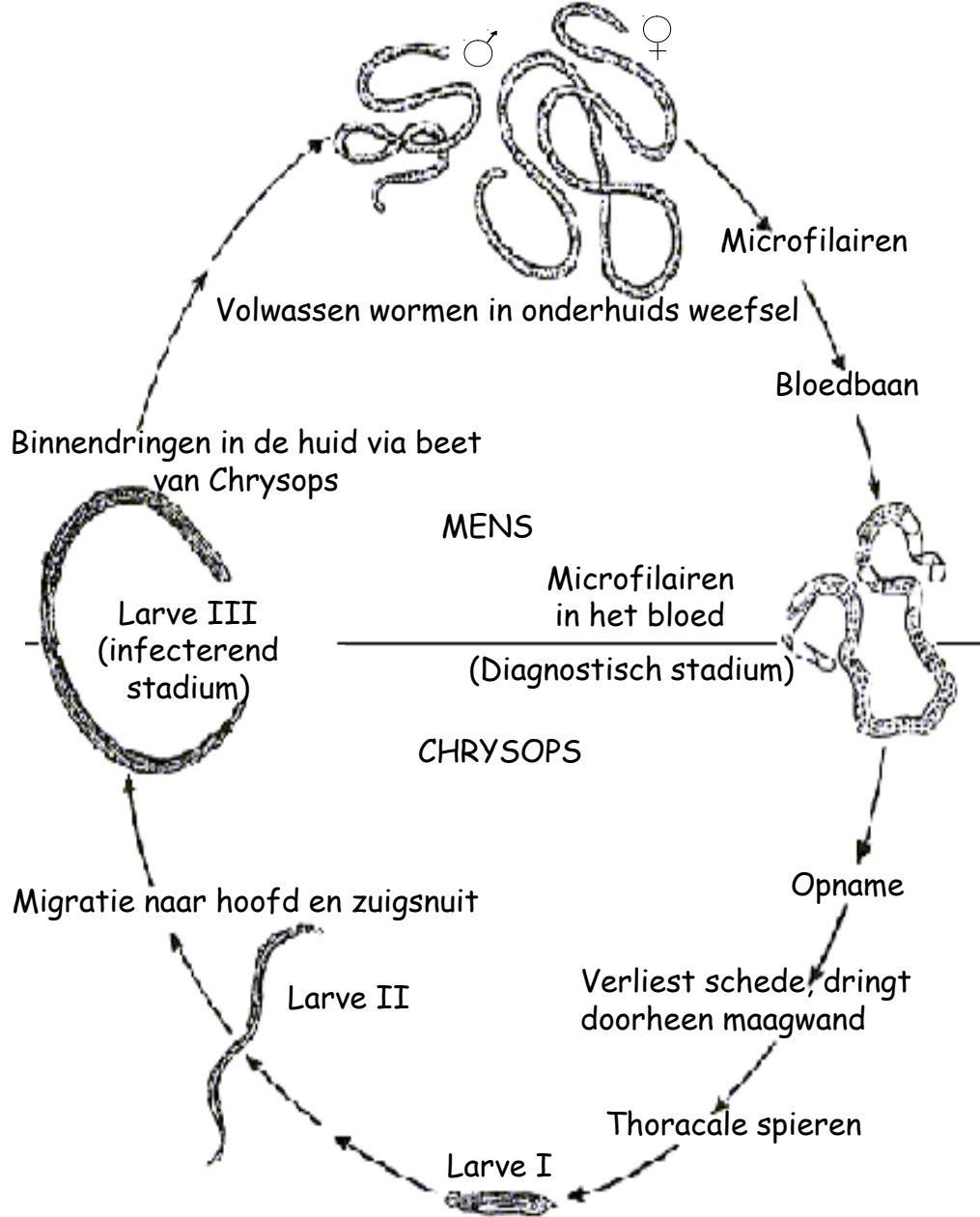
Voor de therapie verwijzen we naar de Sanford. Men zal vooral bedacht zijn op de mogelijkheid van allergische reacties.

Tabel 5.3.1. : Microfilairen voorkomend in perifeer bloed in Kongo-Kinshasa, naar J. Sonnet en J. Vandepitte (3, 4).

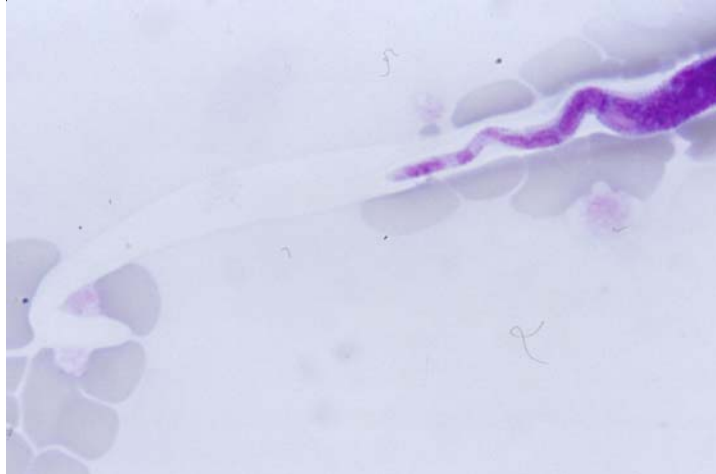
	<i>Mansonella perstans</i>	<i>Loa loa</i>	<i>Wuchereria bancrofti</i>
Periodiciteit	dag/nacht	Dag	Nacht
Vector	vliegjes(<i>Culicoides</i> spp.)	vliegjes(<i>Chrysops</i> spp.)	Muggen(<i>Culex</i> , <i>Anopheles</i> , ...)
Grootte	< 200 μm	> 250 (230) μm	> 250 μm
Staart	eindstandige kernen	eindstandige kernen	Geen eindstandige kernen
Schede	geen	aanwezig (niet kleurbaar met Giemsa)	Aanwezig (licht kleurbaar met Giemsa)

M. Lontie (MCH, Leuven)
K. Vernelen (WIV-LP, Brussel)

Loa loa



Figuur 5.3.1.: Cyclus van *Loa loa* naar J. Vandepitte (4)



Figuur 5.3.2.: Microfiliaire *Loa loa*: de staart vertoont kernen tot op het einde. De schede is goed zichtbaar door negatieve kleuring. Preparaat van deze enquête (P/3175), gekleurd met May-Grünwald-Giemsa.



Figuur 5.3.3.: Kleine microfiliaire *Mansonella perstans* (links) en grotere microfiliaire *Loa loa* in een dikdruppel gekleurd met Giemsa. Dit preparaat werd gemaakt in het Laboratorium voor Microbiologie van het Universitair Ziekenhuis Lovanium in Kinshasa.

REFERENTIES

1. Ash L. & Oribel T. 1980. Atlas of human parasitology. American Society of Clinical Pathologists, Chicago.
2. Lamy L. 1980. Protozoaires et helminthes parasites. Maloine, Paris.
3. Sonnet J. 1964. Syllabus des techniques usuelles de laboratoire médical. Université Lovanium, Kinshasa.
4. Vandepitte J. 1988. Helminthologie médicale. Acco, Leuven.
5. <http://www.dpd.cdc.gov/DPDx/HTML/Filariasis.htm>

VI. SEROLOGIE

6.1. TESTEN

6.1.1. Beschrijving van de monsters

Er werden 3 monsters opgestuurd. De monsters S/3942 en S/4034 dienden zowel voor de bepaling van antistoffen tegen EBV als tegen CMV. Monster S/2724 diende voor de bepaling van antistoffen tegen Toxoplasma. Hiervan werden er 2 verschillende stalen rondgestuurd; laboratoria met een even erkenningsnummer kregen een staal met hoge IgG en lage IgM; laboratoria met een oneven erkenningsnummer een staal met lage IgG en hoge IgM.

De stalen waren vergezeld van volgende klinische inlichtingen:

S/3942 : Een vrouw op vruchtbare leeftijd raadpleegt haar arts voor een griepaal syndroom met koorts, spierpijnen en algemeen gevoel van onwelzijn. Het staal werd afgenomen één maand na de start van de klinische symptomen.

S/4034 : Man van 60 jaar in goede gezondheid zonder specifieke klachten.

S/2724 : Een jonge vrouw klaagt van vermoeidheid en vertoont klieren.

6.2. CMV

6.2.1. De deelnemers

In het totaal namen 206 laboratoria deel aan deze enquête. De meeste laboratoria bepaalden zowel IgG als IgM antistoffen; sommige voerden deze bepalingen uit met meerdere reagentia. Eén laboratorium bepaalde alleen IgM antistoffen. Zeven laboratoria bepaalden de totale antistoffen; voor drie, alle drie transfusiecentra, onder hen was dit de enige bepaling welke zij uitvoerden. Aviditeit werd door 72 laboratoria bepaald op staal S/3942 en door 31 laboratoria op staal S/4034.

6.2.2. Gebruikte reagentia

Volgende tabellen geven weer in aantal welke reagentia door de deelnemers gebruikt werden:

Tabel 6.2.2.1 Reagentia gebruikt ter bepaling van de totale antistoffen

Fabrikant	Kit	S/3942	S/4034
Beckton Dickinson	CMV Scan Test Kit	2	2
BioMérieux	Vironostika anti-CMV II	1	1
	Vironostika anti-CMV III	1	1
Dade Behring	Niet gespecificeerd	1	1
Diesse	Enzywell CMV Screen	1	1
Eurogenetics	CMV IgM/IgG Elisa	1	1
Totaal		7	7

Tabel 6.2.2.2. Reagentia gebruikt ter bepaling van de IgG

Fabrikant	Kit	S/3942	S/4034
Abbott	AxSYM CMV IgG	98	98
Biokit	CMV-IgG Bio-Elisa	1	1
BioMérieux	VIDAS CMV IgG	67	67
BioRad	Novum cytomegalovirus IgG	1	1
Dade Behring	Enzygnost anti-CMV IgG	16	16
Diamed	CMV IgG	1	1
Diamedix	CMV IgG	1	1
DiaSorin	ETI-CYTOK G Plus	11	11
	Liaison CMV IgG	2	2
	Niet gespecificeerd	1	1
DPC	Immulite CMV IgG	3	3
Eurogenetics	CMV IgG	1	1
Mikrogen	recomBlot CMV IgG	1	1
Home made	EIA IgG	2	2
Totaal		206	206

Tabel 6.2.2.3. Reagentia gebruikt ter bepaling van de IgM

Fabrikant	Kit	S/3942	S/4034
Abbott	AxSYM CMV IgM	84	86
	IMx CMV IgM	2	2
BioMérieux	VIDAS CMV IgM	84	77
	Vironostika anti-CMV IgM II	1	1
BioRad	Novum cytomegalovirus IgM	1	1
Dade Behring	Enzygnost anti-CMV IgM	17	16
Diamedix	CMV IgM	1	1
DiaSorin	ETI-CYTOK M reverse Plus	19	18
	Liaison CMV IgM	3	3
	Niet gespecificeerd	1	1
Eurogenetics	CMV IgM	1	1
Gamma SA Belgium	Elisa IgM Antibody G11	1	1
Mikrogen	recomBlot CMV IgM	1	1
Home made	EIA IgG	2	2
Totaal		218	211

Tableau 6.2.2.4. Regentgebruikt ter bepaling van de IgG aviditeit

Fabrikant	Kit	S/ 3942	S/ 4034
BioMérieux	VIDAS CMV IgG avidity	63	27
Dade Behring	Enzygnost anti-CMV IgG avidity	6	3
DiaSorin	Liaison CMV IgG avidity	1	1
Home made	Home made	1	
Niet gespecificeerd	Niet gespecificeerd	1	
Totaal		72	31

6.2.3. Resultaten

6.2.3.1. Staal S/3942

Zowel voor totale antistoffen als voor IgM werden alle bepalingen door de deelnemers als positief geantwoord. Voor IgG werden 202 resultaten als positief geantwoord, 2 als borderline en 2 als negatief. De 2 borderline resultaten werden bekomen met respectievelijk de ETI-CYTOK G Plus kit van DiaSorin en de CMV IgG kit van Diamedix; de beide negatieve resultaten werden bekomen met respectievelijk de ETI-CYTOK G Plus kit van DiaSorin en de AxSYM CMV IgG kit van Abbott.

De aviditeitstest werd door alle gebruikers laag bevonden.

De interpretatie wordt in onderstaande tabel weergegeven:

Interpretatie	Aantal
Primo-infectie	128
Positieve IgM test maar bijkomende testen vereist	74
Andere	3
Geen interpretatie	1
Totaal	206

De 3 interpretaties «andere» zijn afkomstig van bloedtransfusiecentra, waar enkel seropositiviteit of -negativiteit bepaald wordt. Deze centra antwoordden dan ook seropositiviteit.

Het niet interpreteren gebeurde door één van de laboratoria die enkel totale antistoffen bepaalde.

Het laboratorium dat enkel IgM bepaalde interpreteerde dit staal als afkomstig van een primo-infectie.

Sommige laboratoria raadden de bepaling van meerdere bijkomende testen aan. Een overzicht van de aangeraden bijkomende testen is te vinden in volgende tabel

Aangeraden bepaling	Aantal
Nieuwe afname	59
Aviditeit	39
Kultuur voor CMV op urine	6
Bepaling van CMV glycoproteïne B	2
Bepaling van EBV	2
PCR CMV	2
Bepaling van CMV Ag	1
Controle van IgM met specifieke Elisa	1
Echografie	1
Bepaling van HIV	1
Bepaling van rheumafactor	1
Totaal	115

Het aantal weken dat aangeraden wordt te wachten vooraleer een nieuwe afname te verrichten wordt weergegeven in onderstaande tabel.

Aantal weken	Aantal laboratoria
1 - 2	1
2	16
2 - 3	8
3	28
3 - 4	2
4	1
4 - 6	1
Niet aangegeven	2
Totaal	59

Dertien laboratoria raadden ondanks de interpretatie van een primo-infectie toch aan van bijkomende testen uit te voeren; tien onder hen zouden deze altijd aanraadden, drie enkel in geval van zwangerschap.

Een overzicht hiervan wordt in volgende tabel gegeven.

Aangeraden bepaling	Aantal
Nieuwe afname na 3 weken	5
Nieuwe afname na 12 weken	1
Aviditeit	1
Nieuwe afname na 2 weken + aviditeit	2
Nieuwe afname na 3 weken + aviditeit	2
Bepaling van hematologische parameters en transaminasen	1
Bepaling van hematologische parameters en transaminasen, aviditeit en cultuur	1
Totaal	13

6.2.3.2. Staal S/4034

De totale antistoffen worden door alle deelnemers als positief geantwoord. De IgG worden door 205 van de 206 gebruikers als positief geantwoord; één deelnemer beschouwt ze als negatief (AxSYM kit van Abbott). IgM wordt in 203 van de 211 antwoorden als negatief geantwoord; zeven antwoorden waren borderline en één positief. De borderline antwoorden worden allen met de ETI-CYTOK-M reverse plus kit van DiaSorin bekomen; de positieve IgM met de Liaison CMV IgM kit van DiaSorin. De 31 deelnemers die een aviditeitsbepaling uitvoerden op dit staal vonden allen een hoge aviditeit.

De interpretatie wordt in volgende tabel weergegeven:

Interpretatie	Aantal
Vroeger doorgemaakte infectie	196
Borderline IgM test maar bijkomende testen vereist	2
Seronegatief	4
Andere	3
Geen interpretatie	1
Totaal	206

De 3 andere interpretaties zijn afkomstig van bloedtransfusiecentra, waar enkel seropositiviteit of -negativiteit bepaald wordt. Deze centra antwoordden dan ook seropositiviteit

Het niet interpreteren gebeurde door één van de laboratoria die enkel totale antistoffen bepaalde.

Het voorstel tot uitvoeren van bijkomende testen gebeurde door 2 van de laboratoria die een borderline IgM vonden.

De voorgestelde bijkomende testen waren nieuwe afname na 2 weken + transaminasen + hematologisch beeld door het ene laboratorium en nieuwe afname + aviditeit + EBV bepaling door het andere laboratorium.

Het laboratorium dat een positieve IgM vond, alsmede twee van de laboratoria met borderline IgM, interpreteerden het staal als afkomstig van een vroeger doorgemaakte infectie op basis van de uitgevoerde aviditeitsbepaling. Drie andere laboratoria met borderline IgM interpreteerden 'vroeger doorgemaakte infectie' zonder bijkomende testen.

De interpretatie 'seronegatief' was afkomstig van het laboratorium dat enkel IgM bepaalde (en negatief bevond) en van drie laboratoria die IgM negatief bevonden, doch wel een positieve IgG vonden.

Er valt nog op te merken dat één laboratorium het staal als afkomstig van een vroegere infectie beschouwde, maar toch aanraadde om na 2 weken een staal ter controle af te nemen.

6.2.4. Commentaar op de resultaten van het onderzoek

Staal S/3942: Recente CMV infectie bij een jonge vrouw

Alle IgM bepalingen werden als positief geïnterpreteerd. Voor de IgG blijken 4 resultaten af te wijken van het verwachte positieve resultaat (2 borderline en 2 negatieve resultaten). Deze discordanties blijken eerder een technische oorzaak te hebben dan te wijten te zijn aan een bepaald reagens; twee van de drie betrokken kits blijken zonder problemen door andere deelnemers aan de EKE gebruikt te worden.

De interpretatie "primo-infectie" werd door 128 laboratoria geantwoord:

- 72 laboratoria voerden een aviditeitsbepaling uit met een laag resultaat
- in 56 gevallen is de diagnose van een primo-infectie gebaseerd op de associatie van positieve IgM met een suggestieve kliniek

Men moet er aan denken dat het enige formele bewijs van een primo-infectie geleverd wordt door het optreden van een seroconversie en dat de aanwezigheid van IgM in één enkel staal in geen geval beschouwd kan worden als een bewijs van een recente infectie. De laatste jaren zijn er supplementaire tests ontwikkeld waarvan het gebruik overigens door verschillende laboratoria voorgesteld is (bepaling van de IgG aviditeit en opsporen van de anti-gB antistoffen). Men moet nochtans in het achterhoofd houden dat deze testen enkel

toelaten een recente infectie uit te sluiten, doch niet om deze te bevestigen.

Tot slot moeten we vermelden dat één laboratorium enkel IgM bepaald heeft en op basis van de positiviteit hiervan, zonder evenwel de IgG status van de patiënte te kennen, de diagnose primo-infectie vooropgesteld heeft. Men moet er aan denken dat:

- de aanwezigheid van IgM en de afwezigheid van IgG niet toelaten om te besluiten dat het een recente infectie betreft; enkel de seroconversie van IgG, eventueel op een laattijdig serum, zal het antwoord brengen
- de aanwezigheid van IgM en van IgG een onvoldoend criterium is om te spreken van een recente infectie.
- de follow-up van enkel IgM onzekere resultaten met zich meebrengt: seroconversies zonder IgM zijn beschreven, bepaalde patiënten verliezen zeer snel hun IgM. Indien men de keuze maakt slechts één enkele parameter te testen, verdient de bepaling van IgG de voorkeur.

Staal S/4034: Oude CMV infectie bij een 60-jarige man

Op één na werden alle IgG bepalingen als positief gerapporteerd. Deze discordantie blijkt eerder een technische oorzaak te hebben dan te wijten te zijn aan een bepaald reagens; deze kit werd door andere deelnemers aan de EKE probleemloos gebruikt.

De IgM bepalingen bleken negatief, op zeven borderline en één positief resultaat na, allen bekomen met de kits van DiaSorin. Het is geen zeldzaamheid in routine discordanties in de IgM bepaling aan te treffen vooral indien deze borderline of zwak positief zijn; dit fenomeen is onafhankelijk van de gebruikte reagentia: indien een ander serum gebruikt was in de EKE, had dit een ander "discordantieprofiel" kunnen opleveren voor andere kits.

Een beetje tot onze verbazing hebben 31 laboratoria (waarvan het merendeel negatieve IgM bekomen hadden) de IgG aviditeit bepaald op dit staal. Vermoedelijk betreft het hier eerder een "EKE-reflex" en niet zozeer een gebruikelijk algoritme...

Ten slotte blijkt dat 4 laboratoria de interpretatie "seronegatief" geantwoord hebben voor dit staal op basis van negatieve IgM. Om alle verwarring uit te sluiten, wensen wij te benadrukken dat de termen seropositief en seronegatief enkel gebruikt mogen worden voor patiënten die wel of geen IgG hebben, en dit onafhankelijk van het resultaat van de IgM bepaling.

M. Bodeus, Cliniques universitaires St-Luc , Bruxelles

6.3. EBV

6.3.1. De deelnemers

In het totaal namen 190 laboratoria deel aan deze enquête. De meeste laboratoria bepaalden zowel IgG als IgM antistoffen; sommige voerden deze bepalingen uit met meerdere reagentia. Dertien laboratoria bepaalden de heterofiele antistoffen op staal S/3942; twaalf bepaalden deze op staal S/4034. Eén laboratorium bepaalde de totale antistoffen, zonder fabrikant of kit te specificeren; deze totale antistoffen werden positief bevonden. Eén laboratorium bepaalde de aviditeit met de Enzygnost anti-EBV IgG avidity kit van Dade Behring op staal S/3942 en vond hiervoor een hoge aviditeit.

Vier laboratoria bepaalden enkel IgM voor beide stalen, een vijfde laboratorium bepaalde voor S/3942 IgG en IgM doch voor S/4034 enkel IgM.

6.3.2. Gebruikte reagentia

Volgende tabellen geven weer in aantal welke reagentia door de deelnemers gebruikt werden:

Tabel 6.3.2.1. Reagentia gebruikt ter bepaling van de heterofiele antistoffen

Fabrikant	Kit	S/ 3942	S/ 4034
Biokit	Monolatex	2	2
BioMérieux	Monoslide Test	1	1
Lucron	MNI Fumouze test	1	1
Meridian	Monospot Latex	1	-
Oxoid	Mono G Test	1	1
Unipath	Clearview	5	5
Niet gespecificeerd	Niet gespecificeerd	2	2
Totaal		13	12

Tabel 6.3.2.2. Reagentia gebruikt ter bepaling van de IgG

Fabrikant	Kit	S/ 3942	S/ 4034
Alphadia	EBV IgG	2	2
Bioagnost	anti-EBV-CA Elisa IgG	14	14
	CAPTIA VCA IgG	5	5
	anti-EBV-EA Elisa IgG	1	1
	anti-EBV-EBNA IIF IgG	1	1
	EBNA-1 IgG EIA	1	1
	Niet gespecificeerd	6	6
BioMérieux	Vironostika EBV VCA IgG	5	5
	Vironostika EBV EBNA IgG	2	2
BioRad	Novum Epstein Barr virus VCA IgG	1	1
Biotest	anti-EBV EBNA-IgG Elisa	8	7
	anti-EBV EA-IgG Elisa	4	4
	Niet gespecificeerd	1	1
BMD	Immunodot Mono-G Test	15	14
	EBV VCA IgG Immunowell	7	7
	EBV EBNA IgG Immunowell	1	1
	Niet gespecificeerd	1	1
Dade Behring	Enzygnost anti-EBV IgG	50	50
DiaSorin	ETI-VCA-G	8	8
	Liaison VCA IgG	5	5
	Niet gespecificeerd	2	2
Euroimmun	IgG anti-EA	1	1
	IgG anti-EBNA	1	1
	IgG anti-VCA	1	1
Forlab/Focus	EBV VCA IgG IFA	6	6
Gamma SA Belgium	Elisa IgG G21	1	1
Immunoconcepts components	EBV VCA IgG	1	1
Meridian	EBV IgG IFA	23	23
	EBV IgG EIA	11	11
	EBNA-1 IgG EIA	2	2
	EBV-EA IFA	2	2
	EBNA ACIF	1	1
Merifluor	EBV IgG IFA/IFT	1	1
Mikrogen	recomLine EBV IgG	1	1
Sigma	EBV IgG	1	1
Viron/Serion	EBV VCA IgG	5	5
Niet gespecificeerd	Niet gespecificeerd	4	4
Totaal		202	200

Tabel 6.3.2.3. Reagentia gebruikt ter bepaling van de IgM

Fabrikant	Kit	S/ 3942	S/ 4034
Alphadia	EBV IgM	2	2
Biognost	anti-EBV-CA Elisa IgM	14	14
	CAPTIA VCA IgM	5	5
	Niet gespecificeerd	7	7
BioMérieux	Vironostika EBV VCA IgM	5	5
BioRad	Novum Epstein Barr virus VCA IgM	1	1
Biotest	anti-EBV EA-IgM Elisa	9	9
	anti-EBV VCA-IgM Elisa	1	1
	Niet gespecificeerd	1	1
BMD	Immunodot Mono-M Test	14	14
	EBV VCA IgM Immunowell	7	7
	Niet gespecificeerd	1	1
Dade Behring	Enzygnost anti-EBV IgM	50	50
DiaSorin	Liaison EBV IgM	6	6
	ETI-EBV-M-reverse	5	5
	Niet gespecificeerd	2	2
Euroimmun	IgM anti-VCA	1	1
Forlab/Focus	EBV VCA IgM RIFA	8	8
Gamma SA Belgium	Elisa IgM G22	1	1
Immunoconcepts	EBV VCA IgM RIFA	1	1
components			
Meridian	EBV IgM IFA	27	25
	EBV IgM EIA	16	16
Merifluor	EBV IgG IFA/IFT	1	1
Mikrogen	recomLine EBV IgM	1	1
Viron/Serion	EBV VCA IgM	4	4
Niet gespecificeerd		4	4
Totaal		194	192

6.3.3. Resultaten

6.3.3.1. Staal S/3942

Alle laboratoria die heterofiele antistoffen bepaalden, bevonden deze negatief.

Een overzicht van het besluit betreffende IgG en IgM wordt weergegeven in volgende tabel

Besluit	IgG	IgM
Positief	197	62
Borderline	1	33
Negatief	4	99
Totaal	202	194

Drie van de 4 negatieve resultaten werden bekomen bij de bepaling van IgG-EA; deze laboratoria vonden wel IgG-VCA en/of EBNA positief. Het vierde laboratorium, dat "negatieve IgG" antwoordde, bepaalde slechts één IgG; evenals het laboratorium dat borderline antwoordde

Interpretatie	Aantal
Vroegere infectie	100
Positieve IgM test maar bijkomende testen vereist	60
Primo-infectie	15
Seronegatief	2
Andere	13
Totaal	190

De interpretaties seronegatief zijn afkomstig van enerzijds één van de laboratoria dat enkel IgM bepaalde en deze negatief bevond; anderzijds van een laboratorium dat zowel IgG als IgM negatief bevond.

Van de 3 andere laboratoria die enkel IgM bepaalden zijn er 2 die als interpretatie "geen primo-infectie" antwoorden (gezien zij een negatieve IgM bekwamen); het derde laboratorium vond IgM positief en raadt bijkomende testen aan (bepaling van IgG, EBNA, aviditeit en Paul en Bunnell).

De drie laboratoria die een negatieve IgG-EA vonden, bekwamen positieve IgG-EBNA en/of IgG-VCA en interpreteerden het staal als 'vroegere infectie' gezien IgM negatief was. Het laboratorium dat een borderline IgG vond, bewam een negatieve IgM en interpreteerde het staal eveneens als een vroegere infectie.

De interpretaties "andere" omvatten: geen primo-infectie door EBV (2 maal), reactivatie (4 maal), polyclonale stimulatie door CMV-infectie (6 maal) en reactivatie of polyclonale respons (1 maal).

Sommige laboratoria raadden de bepaling van meerdere bijkomende testen aan. Een overzicht van de aangeraden bijkomende testen is te vinden in onderstaande tabel

Aangeraden bepaling	Aantal
Nieuwe afname	40
Aviditeit	20
EBNA	13
EBNA + EA	6
Bepaling van CMV	5
Paul en Bunnell	4
EA	2
Bepaling van EBV IgG	1
Controle van IgM na voorbehandeling met absorbtie	1
Bepaling van transaminase	1
Bepaling van formule der witte bloedcellen	1
Niet aangegeven	1
Totaal	95

Het aantal weken dat aangeraden wordt te wachten vooraleer een nieuwe afname te verrichten wordt weergegeven in volgende tabel

Aantal weken	Aantal laboratoria
2	15
2 - 3	3
3	19
3 - 6	1
4	1
Niet aangegeven	1
Totaal	40

Van de 15 laboratoria die dit staal als een EBV primo-infectie interpreteerden, was er één dat geen CMV bepaalde. Van de 14 overblijvende zijn er 12 die ook voor CMV als interpretatie "primo-infectie" antwoorden; de 2 overige vroegen voor CMV de bepaling van bijkomende

testen: het ene laboratorium aviditeit en een nieuwe afname na 2 weken, het andere de bepaling van rheumafactor, CMV antigeen en HIV.

6.3.3.2. Staal S/4034

Alle laboratoria die heterofiele antistoffen bepaalden, bevonden deze negatief.

Een overzicht van het besluit betreffende IgG en IgM wordt weergegeven in volgende tabel

Besluit	IgG	IgM
Positief	195	2
Borderline	0	0
Negatief	5	190
Totaal	200	192

Vier van de 5 negatieve resultaten werden gevonden bij de bepaling van IgG-EA; drie van deze laboratoria vonden wel IgG-VCA en/of EBNA positief; één laboratorium bepaalde enkel IgG-EA. Het vijfde laboratorium, dat "negatieve IgG" antwoordde, vermeldt niet welk type IgG het bepaalde.

De interpretatie wordt weergegeven in onderstaande tabel

Interpretatie	Aantal
Vroegere infectie	181
Positieve IgM test maar bijkomende testen vereist	1
Seronegatief	6
Andere	2
Totaal	190

Twee van de seronegatieve interpretaties zijn afkomstig van laboratoria die enkel IgM bepaalden en deze negatief bevonden. Twee andere seronegatieve interpretaties zijn afkomstig van de laboratoria die IgG en IgM negatief bevonden. Eén seronegatieve interpretatie werd geantwoord door het laboratorium dat totale antistoffen en IgM bepaalde en beide negatief bevond. De zesde seronegatieve interpretatie tenslotte is afkomstig van een laboratorium dat IgM negatief, doch IgG positief bevond.

De drie overige laboratoria die een negatieve IgG-EA vonden, bekwamen positieve IgG-EBNA en/of IgG-VCA en interpreteerden het staal als 'vroegere infectie' gezien IgM negatief was.

Van de 3 andere laboratoria die enkel IgM bepaalden zijn er 2 die als interpretatie "geen primo-infectie" antwoorden (gezien zij een negatieve IgM bekwamen); het derde laboratorium, dat IgM eveneens

negatief bevond, geeft als interpretatie 'vroegere infectie'.

Het laboratorium dat aanraadt bijkomende testen uit te voeren, stelt voor de aviditeit te bepalen, gezien zowel IgG als IgM positief bevonden werden.

6.3.4. Commentaar op de resultaten van het onderzoek

Staal S/3942: Oude EBV infectie bij een jonge vrouw

Het opsporen van IgG leverde weinig problemen op:

- 197 laboratoria antwoordden IgG positief.
- de 3 negatieve antwoorden zijn bepalingen van anti-EA IgG; zowel anti-VCA als anti-EBNA IgG waren positief in deze 3 gevallen. Deze resultaten illustreren duidelijk dat anti-EA IgG niet gebruikt mogen worden om de anti-EBV "immunitet" te evalueren
- één laboratorium met een negatief antwoord en één met een borderline antwoord vermeldde de aard der bepaalde IgG niet...

De resultaten van de IgM bepalingen zijn heterogener maar dit is niet verwonderlijk. Zowel voor EBV als voor CMV worden in routine vaak discordante resultaten gevonden, vooral als de IgM borderline of zwak positief zijn; deze discordanties zijn onafhankelijk van het gebruikte reagens. In geval de IgM positief zijn, laten complementaire testen toe om de

serologische diagnose te preciseren. Verschillende laboratoria hebben trouwens de bepaling van enkele van deze bijkomende testen voorgesteld (voornamelijk de bepaling van anti-EBNA antilichamen en van de IgG aviditeit).

Honderd deelnemers concludeerden dat het om een oude infectie ging; 60 verkozen bijkomende testen uit te voeren gezien de positieve IgM. De dertien laboratoria die de interpretatie "andere" geantwoord hebben, besloten eigenlijk ook dat het om een oude infectie ging maar probeerden de aanwezigheid van IgM te verklaren: reactivatie en/of polyclonale activatie ten gevolge van een CMV primo-infectie en/of kruisreactie...mogelijk het één of het ander, of het één en het ander, onmogelijk of in elk geval moeilijk aan te tonen. Sommige laboratoria stellen de bepaling van IgA of anti-EA antistoffen voor om een "reactivatie" te bewijzen. Het belang van het aantonen van een "vermeende" reactivatie bij immuuncompetente patiënten blijft te bewijzen. Bij immuundeficiënte patiënten kan de bepaling van het virale genoom via moleculaire biologie nuttig zijn.

De diagnose "primo-infectie" werd voorgesteld door 15 laboratoria op basis van positieve IgG en IgM. Dezelfde opmerking als bij CMV kan hier aangehaald worden: de aanwezigheid van IgM in één enkel staal mag in geen geval beschouwd worden als aanduiding van een recente infectie. Dit staal is daar een mooi voorbeeld van.

Staal S/4034: Oude EBV infectie bij een 60-jarige man

Dit staal leverde nagenoeg geen problemen op. We verwijzen naar enkele van de voorgaande opmerkingen:

- betreffende het correcte gebruik van de term seronegatief
- betreffende de interpretatie van een negatief resultaat voor anti-EA IgG.

M. Bodeus, Cliniques universitaires St-Luc , Bruxelles

6.4. Toxoplasma

6.4.1. De deelnemers

In het totaal namen 207 laboratoria deel aan deze enquête. De meeste laboratoria bepaalden zowel IgG als IgM antistoffen; sommige voerden deze bepalingen uit met meerdere reagentia.

Veertien laboratoria bepaalden IgA en 69 bepaalden de aviditeit. Eén laboratorium bepaalde de totale antistoffen; hiervoor werd gebruikt gemaakt van een home made test.

6.4.2. Gebruikte reagentia

Volgende tabellen geven in aantal weer welke reagentia door de deelnemers gebruikt werden:

Tabel 6.4.2.1. Reagentia gebruikt ter bepaling van de IgG

Fabrikant	Kit	Aantal
Abbott	AxSYM Toxo IgG	95
	Toxo MEIA	4
Bayer	ADVIA Centaur Toxo IgG	9
Beckman	Access Toxo IgG	28
BioMérieux	VIDAS Toxo IgG	42
	Toxo-spot IF	5
BioRad	Platelia Toxo IgG	2
Dade Behring	Enzygnost Toxoplasmosis IgG	1
Diamedix	Toxo IgG EIA	1
DiaSorin	ETI-TOXOK-G Plus	11
	Liaison Toxo IgG	2
DPC	Toxoplasma IgG	8
Home Made	EIA IgG	2
Niet gespecificeerd	Niet gespecificeerd	2
Totaal		212

Tabel 6.4.2.2. Reagentia gebruikt ter bepaling van de IgM in staal S/2724

Fabrikant	Kit	Aantal
Abbott	AxSYM Toxo IgM	95
	Toxo MEIA	4
Bayer	ADVIA Centaur Toxo IgM	8
Beckman	Access Toxo IgM	28
BioMérieux	VIDAS Toxo IgM	47
	Toxo-spot IF	8
	Toxonostika IgM	1
BioRad	Platelia Toxo IgM	3
Dade Behring	Enzygnost Toxoplasmosis IgM	1
Diamedix	Toxo IgM EIA	1
DiaSorin	ETI-TOXOK-M reverse Plus	13
	Liaison Toxo IgM	2
DPC	Toxoplasma IgM	5
Home Made	EIA IgM	2
Niet gespecificeerd	Niet gespecificeerd	2
Totaal		220

Tabel 6.4.2.3. Reagentia gebruikt ter bepaling van de IgA in staal S/2724

Fabrikant	Kit	Aantal
BioMérieux	Toxo-spot IF	2
BioRad	Platelia Toxo IgA	5
DiaSorin	ETI-TOXOK-A reverse Plus	5
Home Made	EIA IgA	2
Totaal		14

Tabel 6.4.2.4. Reagentia gebruikt ter bepaling van de IgG aviditeit in staal S/2724

Fabrikant	Kit	Aantal
BioMérieux	VIDAS Toxo IgG avidity	64
Dade Behring	Enzygnost Toxoplasmosis IgG	3
DiaSorin	Liaison Toxo IgG avidity	2
Totaal		69

6.4.3. Resultaten

Er werden 2 verschillende stalen S/2724 verstuurd naargelang het erkenningsnummer.

6.4.3.1. Laboratoria met een even erkenningsnummer

Deze groep omvat 118 laboratoria.

Zij voerden 121 bepalingen van IgG uit. Al deze resultaten waren positief. Vier laboratoria vermeldden de gevonden waarde niet. 114 van deze waarden toonden een hoge IgG aan (waarden boven de 200 U/ml), doch er zijn toch 3 laboratoria die lage tot negatieve waarden aantreffen:

- één van deze laboratoria gebruikt een "Home made" test; dit laboratorium bepaalde IgG eveneens met de Toxo-spot IF kit van BioMérieux, zonder een vermelding van de waarde. Het laboratorium bepaalde ook IgM met deze 2 methoden en bewam hiervoor een hoge waarde en een lage waarde,

- respectievelijk met de Toxo-spot IF en met de home made methode.
- de 2 overige lage resultaten werden bekomen met de AxSYM IgG kit van Abbott en de VIDAS IgG kit van BioMérieux; deze 2 laboratoria vonden een lage IgM (de AxSYM gebruiker interpreteerde deze zelfs als negatief), telkens met de overeenkomstige IgM kit van de betrokken firma's.

Er werden 123 bepalingen van IgM uitgevoerd. De resultaten zijn weergegeven in onderstaande tabel.

Besluit	IgM
Positief	101
Borderline	18
Negatief	4
Totaal	123

Drie van de 4 negatieve resultaten werden bekomen met de AxSYM IgM kit van Abbott (2 maal) en de Toxoplasma IgM kit van DPC (1 maal). Het 4e laboratorium gebruikte een immunofluorescentie techniek; dit laboratorium bepaalde IgM echter ook met een ELISA techniek en vond deze hiermee positief (optische densiteit 6,98).

Tien laboratoria bepaalden IgA. Allen vonden deze positief. De waarden lopen echter zeer sterk uiteen (mogelijk door gebruik van verschillende methoden en eenheden).

De aviditeit werd bepaald door 46 laboratoria. 43 deden dit met de VIDAS IgG avidity kit van BioMérieux; voor zover zij het percentage vermeldden, lag dit tussen 15 en 30%. De gebruiker van de Liaison Toxo IgG avidity (DiaSorin) bekwam een percentage van 43%; de 2 gebruikers van de Enzygnost Toxoplasmosis IgG avidity (Dade Behring) bekwamen percentages van respectievelijk 72 en 82%.

Een overzicht van de interpretaties wordt gegeven in onderstaande tabel.

Interpretatie	Aantal
Primo-infectie	53
Positieve IgM test maar bijkomende testen vereist	53
Vroegere infectie	9
Andere	3
Totaal	118

De interpretaties "andere" omvatten: "acute infectie maar met persisterende kliniek sinds 10-20 weken", "primo-infectie of vroeger doorgemaakte infectie, controle van IgG en IgM na 2 weken aangewezen,

en aviditeit in geval van zwangerschap", en "recente infectie: bepaling van aviditeit is aangewezen; indien deze laag is dienen IgM, IgA en eventueel IgG gecontroleerd na 3 weken".

De interpretaties van de 3 laboratoria die lage IgG waarden vonden zijn "vroegere infectie" (1 maal) en "primo-infectie" (2maal).

De interpretatie "vroegere infectie" is afkomstig van het laboratorium dat IgM als negatief interpreteerde. Eén interpretatie "primo-infectie" is afkomstig van het laboratorium dat IgM met 2 methoden bepaalde (en 2 verschillende kwantitatieve resultaten bekam).

Een ander laboratorium dat een negatieve IgM bekam gaf als interpretatie "vroegere infectie". Een 3^e laboratorium dat een negatieve IgM bekam gaf als interpretatie "primo-infectie" (dit laboratorium vond tevens een zwakke aviditeit) . Het laboratorium dat zowel een negatieve, als een positieve IgM vond, gaf als interpretatie "bijkomende testen noodzakelijk, met name bepaling van de aviditeit en nieuwe afname na 3 weken".

Sommige laboratoria raadden de bepaling van meerdere bijkomende testen aan. Een overzicht is te vinden in onderstaande tabel.

Aangeraden bepaling	Aantal
Nieuwe afname	35
Aviditeit	33
IgA	12
IgM IF	3
IgM EIA	1
Bepaling van CMV	1
Bepaling van EBV	1
Controle met andere techniek (VIDAS)	1
Elisa capture techniek	1
HCG	1
Complement bindingsreactie	1
Niet aangegeven	2
Totaal	92

Het aantal weken dat aangeraden wordt te wachten vooraleer een nieuwe afname te verrichten, wordt weergegeven in onderstaande tabel.

Aantal weken	Aantal laboratoria
1 -2	1
2	9
2 - 3	3
3	19
3 - 4	2
4	1
Totaal	35

Er dient nog opgemerkt dat 4 laboratoria die de interpretatie 'primaire infectie' antwoordden, toch bijkomende testen aanraden (nieuwe staalafname, aviditeit of beide); ook 2 laboratoria die 'vroegere infectie'

antwoordden, raadden toch de bepaling van de aviditeit aan.

6.4.3.2. *Laboratoria met een oneven erkenningsnummer*

Deze groep omvat 89 laboratoria.

Zij voerden 91 bepalingen van IgG uit. Hiervan werden 89 resultaten als positief beschouwd en 2 als borderline. Deze 2 interpretaties werden bekomen met de ETI-TOXOK-G Plus kit van DiaSorin en met de Enzygnost Toxoplasmosis IgG kit van Dade Behring.

Slechts 1 laboratorium vermeldde de gevonden waarde niet. Twee laboratoria vonden hoge IgG waarden. Zij bekwamen deze resultaten met de Toxoplasma IgG kit van DiaSorin en met de AxSYM IgG kit van Abbott. Beiden vonden tevens een hoge IgM; deze bepalingen gebeurden respectievelijk met de ETI-TOXOK-M reverse Plus kit van DiaSorin en de AxSYM IgM kit van Abbott. Het tweede laboratorium vond eveneens een lage aviditeit.

Er werden 97 bepalingen van IgM uitgevoerd. Deze waren alle positief. Voor zover zij de waarden vermeldden, vonden alle laboratoria een hoge tot zeer hoge waarde.

Er werden 4 bepalingen van IgA uitgevoerd. Drie hiervan werden als positief geïnterpreteerd, één als borderline. Dit laatste resultaat werd

bekomen met de Toxo-spot IF kit van BioMérieux.

De aviditeit werd bepaald door 23 laboratoria. 21 deden dit met de VIDAS IgG avidity kit van BioMérieux; voor zover zij het percentage vermeldden, lag dit tussen 2 en 7%. De gebruiker van de Liaison Toxo IgG avidity (DiaSorin) bewam een percentage van 15%; de gebruiker van de Enzygnost Toxoplasmosis IgG avidity (Dade Behring) bewam een percentage van 16%.

Een overzicht van de interpretaties wordt gegeven in onderstaande tabel.

Interpretatie	Aantal
Primo-infectie	51
Positieve IgM test maar bijkomende testen vereist	36
Vroegere infectie	1
Seronegatief	1
Totaal	89

De laboratoria die een hoge IgG bekwamen, gaven beide als interpretatie "primo-infectie". De laboratoria met een borderline IgG, stelden als interpretatie respectievelijk "primo-infectie" en "bijkomende testen, met name aviditeit" voor.

Sommige laboratoria raadden de bepaling van meerdere bijkomende testen aan. Een overzicht is te vinden in onderstaande tabel

Aangeraden bepaling	Aantal
Nieuwe afname	30
Aviditeit	21
IgA	5
Bevestiging van IgM met andere technieken	4
Bepaling van CMV	1
Bepaling van EBV	1
Bevestiging van IgG met Elisa	1
Doorstuur bij zwangerschap	1
Total	64

Het aantal weken dat aangeraden wordt te wachten vooraleer een nieuwe afname te verrichten wordt weergegeven in volgende tabel.

Aantal weken	Aantal laboratoria
2	12
2 - 3	2
3	16
Totaal	30

Er dient nog opgemerkt dat 4 laboratoria die de interpretatie 'primaire infectie' antwoordden, toch bijkomende testen aanraden (3 raadden een nieuwe staalafname aan, één de bepaling van de aviditeit).

6.4.4. Commentaar op de resultaten van het onderzoek

De klinische informatie voor het monster specificeert dat het over een jonge vrouw gaat die klaagt over vermoeidheid en klieren.

6.4.4.1. Bespreking resultaten labo's met een even nummer.

Laboratoria die een even nummer hadden kregen een staal doorgestuurd van een patiënte die 5 maand voordien een acute toxoplasmose had doorgemaakt. Dit serumstaal vertoonde een hoge IgG en een lage IgM.

IgG

De meeste laboratoria vonden zeer hoge IgG waarden (van 300 eenheden tot 5370 eenheden).

Drie laboratoria echter vonden een lage of negatieve waarde. Een van deze laboratoria gebruikte een home made test, de andere 2 een commerciële test.

Als we de resultaten van deze 2 labo's vergelijken met identieke reagentia gebruikt door andere labo's vinden we de volgende situatie terug:

Kit	Range andere gebruikers	Waarde gevonden
AxSYM IgG Abbott:	393 - 5370	11,8
Vidas IgG	300 - 3956	2,504 (-)

Het probleem is dus duidelijk niet te wijten aan een onvoldoende gevoeligheid van de gebruikte kits.

Deze drie labo's hebben dus een probleem met hun IgG bepaling. Deze laboratoria kunnen een nieuw staal aanvragen bij het WIV om na te gaan waar de problemen zich situeren. Indien nog steeds te lage waarden worden gevonden is een grondige analyse van hun werkmethoden noodzakelijk.

Het labo dat gebruik maakt van een home made test voor de analyse, zou een grondig nazicht van de techniek moeten verrichten.

IgM

Het monster dat werd opgestuurd bevatte lage waarden voor IgM antistoffen. Deze lage IgM antistoffen werden echter niet door alle laboratoria gevonden. Gezien het lang persisteren van IgM antistoffen na een acute infectie (vaak meerdere jaren) is het aan te bevelen het resultaat van de IgM kwantitatief (titerbepaling of ratio) of semi-kwantitatief (laag positief, positief, of hoog positief) uit te drukken. De hoogte van de IgM titer kan de interpretatie van het serologisch profiel beïnvloeden.

Zes (5%) van de laboratoria gaven enkel een kwalitatief antwoord voor de IgM (pos of neg). Een kwantitatieve of semi-kwantitatieve bepaling van de IgM is nochtans essentieel om een datering van de infectie mogelijk te maken.

Interpretatie

De interpretatie van een serologisch profiel van toxoplasmose met een hoge IgG en een lage IgM, is steeds bijzonder moeilijk. Bij patiënten met een zeer hoge IgG titer in het eerste staal is het weinig waarschijnlijk dat een tweede staalname een significante stijging zal aantonen gezien we reeds op een plateau fase in de antilichaamrespons zijn. Bij deze patiënten kan het interessant zijn om andere serologische testen op deze stalen uit te voeren (vb. andere IgM en IgG techniek, IgA bepaling, IgG aviditeit enz.). De combinatie van deze verschillende technieken zal in vele gevallen een adequaat antwoord kunnen geven met betrekking tot het mogelijke tijdstip van de infectie.

Tussen de verschillende mogelijke antwoorden was de optie: "positieve IgM test maar bijkomende testen vereist" de beste keuzemogelijkheid voor dit serumstaal.

Bijkomende serologische technieken die een hulpmiddel kunnen zijn in de datering van een toxoplasma infectie zijn:

- IgA antistoffen: deze verschijnen na de IgM antistoffen en verdwijnen sneller dan de IgM antistoffen. Opgepast: er zijn ook patiënten waarbij de IgA antistoffen lang (jaren) persisteren na de acute infectie.
- De IgG aviditeit: het is belangrijk dat elk laboratorium zijn eigen aviditeitstechniek evalueert en de

karakteristieken van de doeltreffendheid ervan bepaalt. Uitgevoerd onder gunstige omstandigheden, sluit een hoge aviditeit in combinatie met een positieve IgM in principe een primo-infectie in de drie voorgaande maanden uit, terwijl een lage aviditeit in combinatie met IgM niet noodzakelijk op een recente infectie wijst (een lage aviditeit kan gevonden worden maanden tot soms meer dan een jaar na een acute infectie)

- Andere IgM techniek: afhankelijk van de techniek die gebruikt wordt in het labo kan het terugvinden van IgM in het serum langer of korter zijn. IgM antistoffen gemeten d.m.v. immunofluorescentie zullen in regel sneller dalen dan IgM antistoffen gemeten d.m.v. EIA.

6.4.4.2. Bespreking resultaten labo's met een oneven nummer.

Laboratoria die een oneven nummer hadden kregen een staal doorgestuurd van een patiënte die een acute toxoplasmose doormaakt (afname serumstaal: 4 weken na infectie). Dit serumstaal vertoonde een hoge IgM en een lage IgG.

IgG

De meeste laboratoria vonden lage IgG waarden (gaande van 7 eenheden tot 87 eenheden).

Twee laboratoria echter vonden een hoge waarde (247, en >300). Hier ook zou een herevaluatie van de IgG door deze laboratoria nuttig kunnen zijn.

IgM

Het monster dat werd opgestuurd bevatte hoge waarden voor IgM antistoffen.

Alle labo's vonden een positieve waarde. Van de 97 bepalingen hebben er 90 (93 %) een kwantitatieve of semi-kwantitatieve bepaling uitgevoerd.

Interpretatie

De combinatie lage IgG en hoge IgM is veel eenvoudiger dan de vorige situatie: een dergelijk profiel doet onmiddellijk het vermoeden rijzen van een acute infectie.

Tussen de verschillende antwoorden waren de volgende opties mogelijk:

« Primoinfectie »

« positieve IgM test maar bijkomende testen vereist »

Bijkomende serologische technieken die een hulpmiddel kunnen zijn in de datering van een toxoplasma infectie zijn bij dit staal:

- De IgG aviditeit: dit staal vertoonde een lage aviditeit; de lage aviditeit kan in dit geval het vermoeden van een acute infectie bevestigen. Opgepast: een lage aviditeit sluit een oude infectie niet uit.
- IgA bepaling: tijdens de vroege fase van een toxoplasma infectie kan de

IgA nog negatief zijn. Een negatieve IgA bepaling sluit een acute infectie niet uit.

- Nieuwe staalname: tijdens de vroeg acute fase kunnen we tussen twee opeenvolgende stalen een significante stijging verwachten van de IgG antistoffen. Een tweede bloedafname (2 à 3 weken na het eerste staal) zal dan de diagnose van acute infectie kunnen bevestigen (titers vergelijken op gepaarde stalen)

A. Naessens, UZ VUB, Jette