

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 02/2003

Microbiologie (identificaties)

Aeromonas species
Escherichia coli
Corynebacterium diphtheriae
Staphylococcus aureus

Parasitologie

Plasmodium species

Serologie

Syphilis
ASLO

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 2e evaluatie van het jaar 2003 (enquête 2003/2) werd volgend materiaal verzonden op 22 april 2003.

- 1.1. Vier gelyofiliseerde monsters voor identificatie.
Voor 2 monster werden de resultaten van de gevoeligheidstesten gevraagd.
- 1.2. Twee bloeditstrijkjes voor parasitologisch onderzoek.
- 1.3. Twee gevriesdroogde plasmamonsters voor het opsporen van antistoffen tegen syfilis en bepaling van ASLO

AANTAL DEELNEMERS

Het aantal evalueerbare antwoordbulletins bedroeg :

1. Voor identificatie en antibiogram :	216
2. Voor parasitologie :	205
3. Voor de serologie :	
Syfilis :	203
ASLO :	206

II. IDENTIFICATIES

2.1. Cultuur M/2862 was een *Aeromonas* sp.

Deze bacterie werd geïsoleerd uit de stoelgang van een patiënt met diarree. Er werd gevraagd identificatie tot op genusniveau uit te voeren.

Het genus *Aeromonas* werd in het verleden in de familie der Vibrionaceae ondergebracht naast de genera *Vibrio*, *Photobacterium* en *Plesiomonas*. Recente fylogenetische analyses hebben echter aangetoond dat er weinig verwantschap bestaat tussen *Aeromonas* en de overige Vibrionaceae zodat de nieuwe familie der Aeromonadaceae werd gecreëerd waartoe thans 14 verschillende genospecies behoren (1). Vooral de genospecies *hydrophila*, *caviae* en *veronii* biotype *sobria* kunnen infecties bij de mens veroorzaken.

Infecties

Sommige *Aeromonas* spp. produceren enzymen waaronder hemolysines, enterotoxinen en cytotoxines die verantwoordelijk zijn voor de pathogenese. *Aeromonas* spp. kunnen bij immuungecompromiteerde patiënten bacteriëmie veroorzaken (2). Maar ze zijn daarnaast ook bij niet-immuungecompromiteerde patiënten verantwoordelijk voor een hele reeks extra-intestinale infecties: wondinfecties, peritonitis, meningitis, artritis en osteomyelitis (3). Wondinfecties bij gebruik van bloedzuigers in de heelkunde en dermatologie zijn regelmatig beschreven. Er bestaat een symbiotische relatie tussen de bloedzuiger en *Aeromonas*. De bloedzuiger produceert geen proteolytische enzymen in zijn spijsverteringsorgaan noodzakelijk voor de vertering van het opgezogen bloed. *Aeromonas* spp. produceert daarentegen wel dergelijke hemolysines.

Wondinfecties treden op bij de mens wanneer de bloedzuiger *Aeromonas* spp. vanuit zijn intestinale tractus regurgiteert (4).

Daarnaast is *Aeromonas* spp. een potentiële oorzaak van enteritis met koorts, abdominale krampen en waterige tot slijmerige diarree. *A. veronii* biotype *sobria*, *A. caviae*, *A. jandaei* en *A. hydrophila* zijn de species die verantwoordelijk zijn voor de enteritis (5). Het is ook een belangrijke oorzaak van reizigersdiarree.

Microbiologische diagnose

Aeromonas spp. groeien vlot na incubatie in normale atmosfeer op de meeste niet-selectieve voedingsbodems. Voor de isolatie uit stoelgang kan men een bloedagar met ampicilline (20 µg/ml) enten. *Aeromonas* heeft immers een natuurlijke resistentie tegen aminopenicillines. Ook de CIN agar die vele laboratoria gebruiken voor de isolatie van *Yersinia enterocolitica* laat groei toe van *Aeromonas* spp.

Om een correcte identificatie te bekomen moet eerst het onderscheid gemaakt worden met andere Gramnegatieve, oxidase positieve, glucose fermenterende bacillen zoals *Plesiomonas* spp. en *Vibrio* spp. Hiervoor kunnen de kenmerken vermeld in tabel 2.1.1. gebruikt worden. Daarnaast is het ook belangrijk te vermelden dat een recente studie aangetoond heeft dat *Aeromonas* spp. nooit verzuring in Andrade peptone water geeft van D-arabitol, dulcitol, erythritol en xylose (6).

Identificatie van *Aeromonas* tot op species niveau is niet eenvoudig. Men onderkent thans 14 verschillende genospecies die, slechts van elkaar kunnen gedifferentieerd worden met fenotypische kenmerken die aan het licht gebracht worden door reagentia (KCN, pectaat, amygdalin, elastase, ...) waarover een routine klinisch laboratorium niet beschikt.

Een eerste alternatief is het schema gepubliceerd door Abbott en medewerkers toe te passen (6). De species kunnen in vijf groepen onderverdeeld worden op basis van de resultaten voor de ornithine-, lysinedecarboxylase en de argininedihydrolase reacties.

Groep 1: ornithine positief en arginine en lysine beiden negatief
A. veronii biogroep *veronii*, *A. allosaccharophila*

Groep 2: lysine en arginine positief en ornithine negatief
A. hydrophila, *A. veronii* biogroep *sobria*, *A. jandaei*, *A. schubertii*, *A. trota* en *A. allosaccharophila*

Groep 3: lysine, arginine en ornithine negatief
A. caviae, *A. media* en *A. eucrenophila*

Groep 4: arginine positief, lysine en ornithine beiden negatief
A. bestiarum, *A. caviae*, *A. media*, *A. eucrenophila*, *A. encheleia* en *A. popoffii*

Groep 5: lysine positief, arginine variabel en ornithine negatief
A. bestiarum en *A. salmonicida*

De meeste klinische isolaten behoren tot de groep 2 of 4 met een hele reeks species die slechts door bijkomende tests van elkaar kunnen gedifferentieerd worden.

Een ander alternatief is de *Aeromonas* toe te wijzen aan één van de gangbare drie complexen: de complexen *A. hydrophila* of *A. caviae* of *A. sobria*. Nadeel van deze werkwijze is dat de zeldzame species *A. popoffii*, *A. encheleia*, *A. allosaccharophila* en *A. sobria sensu stricto* niet tot één van deze drie complexen behoren
A. hydrophila complex : *A. hydrophila*, *A. bestiarum* en *A. salmonicida*

A. caviae complex : *A. caviae*, *A. media* en *A. eucrenophila*

A. sobria complex : *A. veronii* biogroep *sobria*, *A. jandaei*, *A. shubertii* en *A. trota*

Zoals hoger reeds vermeld zijn *Aeromonas* spp. van nature uit resistent tegen aminopenicillines. Het resistentiepatroon t.o.v. andere β -lactam antibiotica, nalidixinezuur en fluorochinolones is wisselend (7, 8). Fluorochinolones worden algemeen aangeraden voor de behandeling van ernstige enteritis veroorzaakt door gevoelige *Aeromonas* spp. De rondgestuurde stam was echter resistent tegen fluorochinolones. De resistentie tegen chlooramfenicol, tetracyclines en co-trimoxazole is geografisch wisselend. Ook *A. veronii* biogroep *sobria* is bijvoorbeeld frequenter resistent tegen deze drie antibiotica dan *A. caviae*.

J. Verhaegen, UZ Gasthuisberg, Leuven

Tabel 2.1.1. Kenmerken van het genus *Aeromonas*

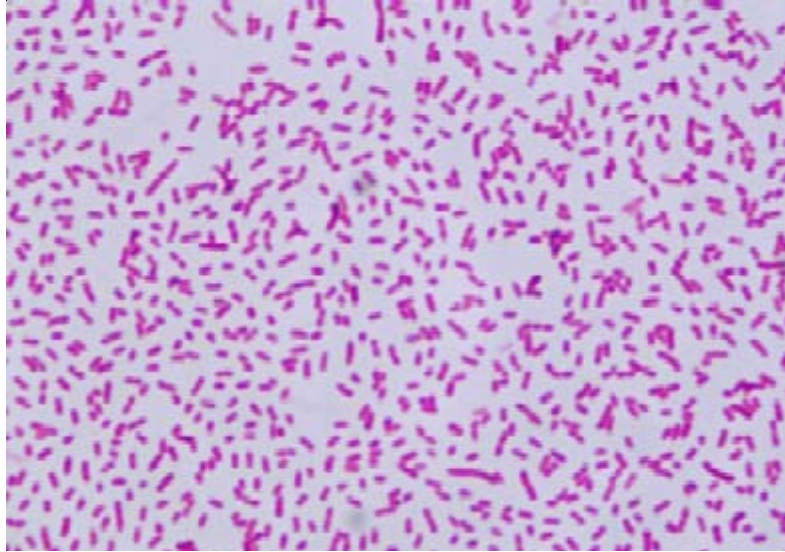
	<i>Aeromonas</i>	<i>Plesiomonas</i>	<i>Vibrio</i>
Groei op NaCl 6,5%	-	-	+
Gelatinase	+	-	+
Resistentie tegen Vibriostaticum O ₁₂₉ (150 µg)	+*	-	-
Verzuring van			
glucose	+	+	+
inositol	-	+	-
mannitol	V	-	+
sucrose	V	-	V

* zeldzame stammen van *A. eucrenophila* zijn gevoelig
 - negatief
 + positief
 V variabel

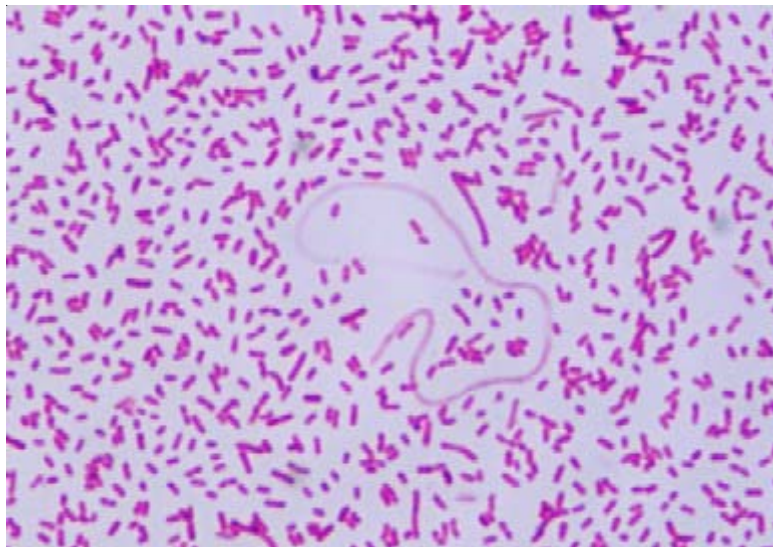
Tabel 2.1.2 Resultaten voor de identificatie stam M/2862 voor 216 laboratoria

<i>A. hydrophila</i>	136	(63,0%)
<i>A. hydrophila/caviae</i>	9	(4,5%)
<i>A. sobria</i>	9	(4,5%)
<i>A. caviae</i>	2	(0,9%)
<i>Aeromonas</i> spp.	54	(25,0%)
Enterohemorragische <i>E. coli</i>	1	
<i>Vibrio metschnikovii</i>	1	
<i>Yersinia enterocolitica</i> O :9	1	
Geen groei	1	
Geen antwoord	2	(0,9%)

Figuur 2.1.1. *Aeromonas* sp. (M/2862)



Figuur 2.1.2. *Aeromonas* sp. (M/2862)



REFERENTIES

1. Joseph S.W. , Carnahan, A.M.. Update on the Genus *Aeromonas*. ASM News, 2000; 66, 218 - 223.
2. Ko W.C., Lee H.C., Chuang Y.C., et al. Clinical features and therapeutic implications of 104 episodes of monomicrobial *Aeromonas* bacteraemia. J. Infect. 2000; 40, 267-273.
3. Gold W.I., Salit I.E. *Aeromonas hydrophila* infections of skin and soft tissue: report of 11 cases and review. Clin. Infect. Dis. 1993; 16, 69-74.
4. Sartor, C., Limouzin-Perotti, F., Legré, R. et al. Nosocomial infections with *Aeromonas hydrophila* from leeches. Clin. Infect. Dis. 2002; 35, 1-5.
5. Vila J., Ruiz J., Gallardo F., et al. *Aeromonas* spp. and travelers diarrhea : clinical features and antimicrobial resistance. Emerg. Infect. Dis. 2003; 9, 552- 555.
6. Abbott S.L., Cheung W.K.W., Janda J.M. The genus *Aeromonas*: biochemical characteristics, atypical reactions, and phenotypic identification schemes. J. Clin. Microbiol. 2003; 41, 2348-2357.
7. Moawad M.R., Zeiderman M. *Aeromonas hydrophila* wound infection in elective surgery. J. Wound Care, 2002, 11, 210-211.
8. Goñi-Urriza M., Arpin C., Capdepuy M. et al. Type II Topoisomerase quinolone resistance-determining regions of *Aeromonas caviae*, *A. hydrophila* and *A. sobria* complexes and mutations associated with quinolone resistance. Antimicrob. Agents Chemother., 2002; 46, 350-359.

2.2. Cultuur M/4244

Was een *Escherichia coli*, die verstuurd werd in de EKE omdat het een ESBL- producer betrof ("extended spectrum β -lactamase").

De detectie van de ESBL stelde geen probleem bij deze stam en de meeste laboratoria (98%) hebben dan ook de aanwezigheid van deze ESBL gerapporteerd. Het is belangrijk de toename van dit percentage te benadrukken gezien bij de enquête in april 2002 "slechts" 91% der laboratoria de ESBL-productie door een *E. coli* gerapporteerd hadden. Deze toename is wellicht te wijten aan verschillende factoren, zoals de toenemende kennis van de verschillende technieken om ESBLs te detecteren en van het belang om het biotype van de ESBL te rapporteren, en de verbetering van de performanties van de toestellen en hun expertsystemen. De testen ter detectie en confirmatie van ESBL productie bij *E. coli* en *Klebsiella* spp werden in vroegere globale rapporten reeds uitvoerig besproken; het lijkt ons dus niet nodig hier opnieuw op in te gaan. Nochtans wensen we uw aandacht te vestigen op volgende punten:

1. Er zijn momenteel slechts weinig gegevens ter beschikking omtrent de prevalentie van ESBL-producerende *E. coli* en *Klebsiella* spp in België. Studies uitgevoerd op de stammen, geïsoleerd bij patiënten gehospitaliseerd op Intensieve Zorgen, rapporteren cijfers gaande van minder dan 1% ESBL-producerende *E. coli* tot 30% ESBL-producerende *Klebsiella*¹. Deze gegevens werden bevestigd door een studie uitgevoerd in 2000-01 op eenheden van Intensieve Zorgen².

2. De wijzigingen van de grenswaarden van cefpodoxime voor de detectie van ESBL (2 tot 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of 20 tot 17 mm)
3. Het belang om verschillende detectietesten te combineren.
4. Het nut van het gebruik van confirmatietesten

⇒ 2+3+4 laat toe het aantal vals positieven te verminderen en dus de specificiteit van de detectie te verhogen.

In een recente studie hebben Tenover et al een analyse uitgevoerd van 131 *E.coli* stammen met een positieve detectie van ESBL volgens de NCCLS criteria, i.e. een MIC van $\geq 2 \mu\text{g}/\text{ml}$ voor minstens 1 van de aanbevolen cefalosporines³.

→ De confirmatietesten bleken positief voor 21 (16%) van de 131 stammen. Voor elk van deze 21 stammen werd de aanwezigheid van een ESBL bevestigd door PCR en IEF.

→ 59 (45%) van de 131 stammen hadden een screeningstest die enkel positief was voor cefpodoxime (MIC = 2 tot 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Van geen enkele van deze stammen werd de positiviteit bevestigd door een confirmatietest.

→ Met het verhogen van de grenswaarden voor cefpodoxime tot $\geq 8 \mu\text{g}/\text{ml}$, werden 45% van de vals positieve resultaten, gebaseerd op cefpodoxime alleen, geëlimineerd.

5. De aanbevelingen van de NCCLS betreffen enkel *E. coli* en *Klebsiella spp*⁴. Nochtans wordt in vele publicaties de verspreiding van ESBLs bij steeds meer *Enterobacteriaceae* vermeld⁵⁻⁹.

Zo produceerden 66% van de *Enterobacter aerogenes* stammen, die in België verzameld werden tijdens de nationale surveillance studie van 2000-01, een ESBL¹⁰.

- Voor de detectie van ESBL bij *E. aerogenes* kunnen wij ons baseren op een aantal studies:
 - √ Bij de synergietest, oorspronkelijk beschreven door Jarlier et al, verhoogt het verminderen van de afstand tussen de centra van de cefepime- en amoxicilline-clavulaanzuurschijfjes tot 20 mm de gevoeligheid van de ESBL detectie bij *E. aerogenes*^{11, 12}.
 - √ De co-resistentie tussen ceftazidime en ciprofloxacine is een uitstekende merker van de ESBL productie, gezien dit fenotype voorkomt bij 100% van de Belgische stammen die een ESBL produceerden in 2000-01¹⁰.
- Andere studies hebben de performantie van de automaten en hun expertsystemen in de detectie van ESBL bij *Enterobacteriaceae* geëvalueerd. De gerapporteerde performanties variëren tussen 80 en 100% gevoeligheid naargelang het type apparaat en de geanalyseerde stam, met uitstekende specificiteiten. Nochtans zal een groter aantal onderzoeken en een grotere variatie van geanalyseerde stammen nodig zijn om definitieve besluiten te kunnen trekken^{13, 14}.
- Twee in België uitgevoerde studies hebben de performantie van de dubbele Oxoid-schijfjes (De Gheldre) en de dubbele E-testen (Laffineur) geëvalueerd voor de detectie van ESBL bij eenzelfde groep *Enterobacteriaceae* van volgende stammen: *E. aerogenes* (n=91), *E. coli* (n=31), *K. pneumoniae* (n=29), *E. cloacae* (n=8), *K. oxytoca* (n=8), *S. marcescens* (n=6), *M. morgani* (n=2), *P. vulgaris* (n=2), *C. freundii*, *P. mirabilis* en *P. stuartii* (telkens n=1).

De gouden standaard voor de ESBL productie was het aantonen van genen die coderen voor de ESBL types TEM en SHV via PCR. Dit leverde volgende resultaten op :

- √ Performantie van de dubbele Oxoid-schijfjes ceftazidime/clavulanaat (CD02), cefotaxime/clavulanaat (CD03) en cefpirome/clavulanaat (CD04) : voor *E. coli* en *Klebsiella* spp, zijn de gevoeligheden (%) / specificiteiten (%) voor CD02, CD03, CD04 en de combinatie van CD02 of CD04 88/92, 90/92, 95/84 en 100/82 ; voor *E. aerogenes* bedragen ze 94/100, 4/100, 94/100 en 100/100. Deze gegevens hebben de auteurs ertoe gebracht om CD02 en CD04 aan te raden voor de detectie van ESBL bij *Enterobacteriaceae*, met inbegrip van *E. aerogenes*¹⁵.
 - √ Performantie van de dubbele E-testen ceftazidime/clavulanaat (TZ/TZL), cefotaxime/clavulanaat (CT/CTL) en cefepime/clavulanaat (PM/PML) : voor *E. coli* en *Klebsiella* spp, zijn de gevoeligheden (%) / specificiteiten (%) voor TZ/TZL, CT/CTL en PM/PML 96/100, 90/81 en 94/81; voor *E. aerogenes* zijn ze 4/16, 0/11 en 92/97. Cefepime blijkt aldus het meest performant bij *E. aerogenes* en ceftazidime bij *E. coli* en *Klebsiella* spp¹⁶.
6. Voor de ESBL-producerende stammen raadt de NCCLS aan om alle β -lactamines, met inbegrip van aztreonam, als resistent te antwoorden; de CA-SFM daarentegen raadt aan om de gevoeligheid van de β -lactamines te antwoorden als "I". Bestaat er een klinische documentatie die de validatie van deze aanbevelingen mogelijk maakt?

Enkele studies hebben zeker de klinische evolutie van patiënten besmet met ESBL-producerende *E. coli* of *K. pneumoniae* onderzocht en suggereren een slechtere evolutie bij het gebruik van derde en vierde generatie cefalosporines in vergelijking met het gebruik van carbapenems^{17, 18}. Nochtans blijven zowel het aantal onderzochte patiënten als het type gedocumenteerde infecties minimaal en blijkt de efficiëntie of het falen van de cefalosporines desalniettemin verbonden met de MIC.

Besluit

Het opsporen van ESBL is een complex probleem. Er zal in één van de volgende globaal rapporten nogmaals nader worden op in gegaan.

Y. de Gheldre, Mont-Saint-Godinne

REFERENTIES

1. Vercauteren, E., Descheemaeker, P., Ieven, M., Sanders, C. C. & Goossens, H. (1997). Comparison of screening methods for detection of extended-spectrum beta-lactamases and their prevalence among blood isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. in a Belgian teaching hospital. *Journal of Clinical Microbiology* **35**, 2191-2197.
2. Glupczynski, Y., Delmée, M., Goossens, H., Ieven, M., Nonhoff, C., Struelens, M., *et al.* (2003). Survey of antimicrobial resistance in Gram-negative rods in Belgian intensive units in 2000-20001. *In Program and Abstracts of the Fourtyone Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Chicago, 2003*. Abstract C2-1972. American society for Microbiology, Washington, DC, USA.
3. Tenover, F. C., Raney, P. M., Williams, P. P., Rasheed, J. K., Biddle, J. W., Oliver, A., *et al.* (2003). Evaluation of the NCCLS extended-spectrum beta-lactamase confirmation methods for *Escherichia coli* with isolates collected during Project ICARE. *J Clin Microbiol* **41**, 3142-3146.
4. Standards, N. C. f. C. L. (2002). . *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: Twelfth informational supplement; M100-S12* NCCLS, Villanova, Pa, USA.
5. De Champs, C., Sirot, D., Chanal, C., Bonnet, R. & Sirot, J. (2000). A 1998 survey of extended-spectrum beta-lactamases in *Enterobacteriaceae* in France. The French Study Group. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **44**, 3177-3179.
6. Neuwirth, C., Siebor, E., Pechinot, A., Duez, J. M., Pruneaux, M., Garel, F., *et al.* (2001). Evidence of in vivo transfer of a plasmid encoding the extended-spectrum beta-lactamase TEM-24 and other resistance factors among different members of the family *Enterobacteriaceae*. *Journal of Clinical Microbiology* **39**, 1985-1988.

7. Pagani, L., Migliavacca, R., Pallecchi, L., Matti, C., Giacobone, E., Amicosante, G., *et al.* (2002). Emerging extended-spectrum beta-lactamases in *Proteus mirabilis*. *Journal of Clinical Microbiology* **40**, 1549-1552.
8. Canton, R., Oliver, A., Coque, T. M., Varela Mdel, C., Perez-Diaz, J. C. & Baquero, F. (2002). Epidemiology of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacter* isolates in a Spanish hospital during a 12-year period. *Journal of Clinical Microbiology* **40**, 1237-1243.
9. Bradford, P. A. (2001). Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clinical Microbiology Reviews* **14**, 933-951.
10. De Gheldre, Y., Glupczynski, Y., Berhin, C., Struelens, M., De Mol, P. & GDEPIH-GOSPIZ (2002). Epidemiology of *Enterobacter aerogenes* in Belgium: preliminary results of a multicentre survey. *Clinical Microbiology and Infection* **8**, abstract P428.
11. Jarlier, V., Nicolas, M. H., Fournier, G. & Philippon, A. (1988). Extended broad-spectrum beta-lactamases conferring transferable resistance to newer beta-lactam agents in *Enterobacteriaceae*: hospital prevalence and susceptibility patterns. *Reviews of Infectious Diseases* **10**, 867-878.
12. Tzelepi, E., Giakkoupi, P., Sofianou, D., Loukova, V., Kemeroglou, A. & Tsakris, A. (2000). Detection of extended-spectrum beta-lactamases in clinical isolates of *Enterobacter cloacae* and *Enterobacter aerogenes*. *J Clin Microbiol* **38**, 542-546.
13. Leverstein-van Hall, M. A., Fluit, A. C., Paauw, A., Box, A. T., Brisse, S. & Verhoef, J. (2002). Evaluation of the Etest ESBL and the BD Phoenix, VITEK 1, and VITEK 2 automated instruments for detection of extended-spectrum beta-lactamases in multiresistant *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. *Journal of Clinical Microbiology* **40**, 3703-3711.

14. Sanguinetti, M., Posteraro, B., Spanu, T., Ciccaglione, D., Romano, L., Fiori, B., *et al.* (2003). Characterization of clinical isolates of *Enterobacteriaceae* from Italy by the BD Phoenix extended-spectrum beta-lactamase detection method. *Journal of Clinical Microbiology* **41**, 1463-1468.
15. De Gheldre, Y., Avesani, V., Berhin, C., Delmee, M. & Glupczynski, Y. (2003). Evaluation of Oxoid combination discs for detection of extended-spectrum beta-lactamases. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **In press**.
16. Laffineur, K., De Gheldre, Y., Berhin, C., Avesani, V. & Glupczynski, Y. (2003). Evaluation of three different Etest ESBL strips for the detection of extended-spectrum beta-lactamases (ESBL) in various *Enterobacteriaceae* species. *In Program and Abstracts of the Fortyone Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Chicago, 2003*. Abstract D-203. American society for Microbiology, Washington, DC, USA.
17. Kim, Y. K., Pai, H., Lee, H. J., Park, S. E., Choi, E. H., Kim, J., *et al.* (2002). Bloodstream infections by extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in children: epidemiology and clinical outcome. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **46**, 1481-1491.
18. Paterson, D. L., Ko, W. C., Von Gottberg, A., Casellas, J. M., Mulazimoglu, L., Klugman, K. P., *et al.* (2001). Outcome of cephalosporin treatment for serious infections due to apparently susceptible organisms producing extended-spectrum beta-lactamases: implications for the clinical microbiology laboratory. *Journal of Clinical Microbiology* **39**, 2206-2212.

2.3. Cultuur M/4313 is een *Corynebacterium diphtheriae*

Voor deze externe kwaliteitsevaluatie werd (om veiligheidsredenen) een toxine negatieve *Corynebacterium diphtheriae* type gravis geselecteerd. Er werd gevraagd om deze uit een keeluitstrijkje geïsoleerde stam tot op het speciesniveau te identificeren. De resultaten zijn zeer bevredigend: 203 op 216 deelnemers identificeerden deze stam correct. Echter, slechts 192 laboratoria gaven het antwoord "Ja" op de vraag of deze stam in routine naar een referentielaboratorium zou doorgestuurd worden. Dit is verontrustend gezien het belang van de bepaling van het toxinogeen karakter van *C. diphtheriae*.

Difterie is een acute bacteriële ziekte van de bovenste luchtwegen met keelpijn, dysfagie, lymfadenitis, lage koorts, malaise en hoofdpijn. De aanwezigheid van een grijsgroen membraan in de keel is karakteristiek. De ernstige systemische effecten van difterie, myocarditis, neuritis en nierschade, worden door het *C. diphtheriae*-exotoxine veroorzaakt, dat door een bacteriofaag gecodeerd wordt.

Dankzij de vaccinatie is deze ziekte verdwenen in landen met hoge socio-economische standaard zoals België. Nochtans blijft ze endemisch in veel subtropische en tropische landen. In de jaren '90 is er een belangrijke epidemie uitgebroken in Rusland en de landen van de voormalige Sovjet Unie, waarschijnlijk in verband met een daling van de vaccinale dekking. Weinig informatie is beschikbaar voor wat betreft de jaren 2000, maar het Volksgezondheidsagentschap van Letland heeft nog 91 gevallen gerapporteerd in 2001, waarvan 4 dodelijk. Deze toestand is verontrustend omdat de volwassen bevolking in West Europa onvoldoende geïmmuniseerd is tegen deze ziekte: een serologische studie gepubliceerd in 1997 toonde aan dat slechts 43% van de Vlaamse bevolking beschermd is (1).

Recent werden officieel geen gevallen in België gerapporteerd maar meerdere gevallen werden wel beschreven in andere West-Europese landen, vaak na contact met Oost-Europa.

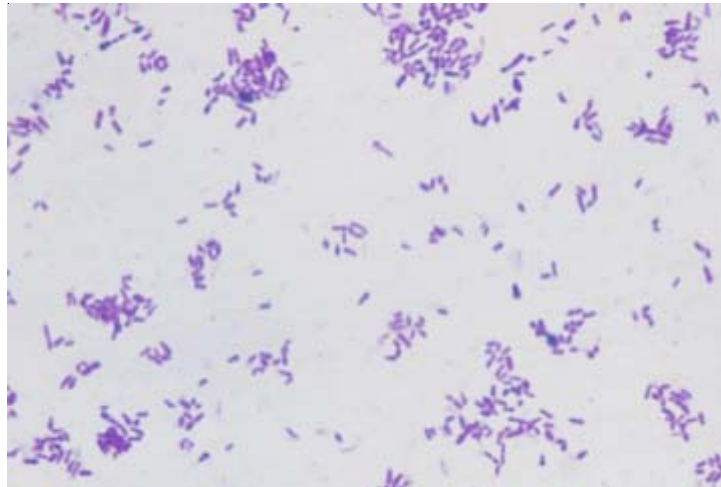
De laboratoria moeten dus waakzaam blijven. Het is ook belangrijk om te weten dat *Corynebacterium ulcerans*, die ook het toxine kan produceren, een zeldzame oorzaak van difterie is na consumptie van rauwe melk. Tenslotte moet er nog gemeld worden dat niet toxinogene *C. diphtheriae* stammen sporadisch afgezonderd worden uit klinische monsters maar hun klinische en epidemiologische betekenis blijft onduidelijk.

In België wordt *C. diphtheriae* in keeluitstrijkjes enkel op speciaal verzoek opgespoord. Dit is ook het geval voor andere Europese landen, met uitzondering van het Verenigd Koninkrijk waar deze pathogeen systematisch opgespoord wordt. Het optimale monster is een keelwisser, het membraan indien aanwezig of voor asymptomatische dragers een nasofarynx uitstrijk. De wetenschappers moeten zeer snel op de media geënt worden of in transportbodem (type Amies) geplaatst worden.

Het primaire medium voor de kweek van *C. diphtheriae* is een combinatie van een bloedplaat en een milieu op basis van telluriet, zoals CTBA (cystine-tellurite bloed agar) of Tinsdale medium; het Loeffler medium wordt door sommige auteurs afgeraden wegens frequente overgroei door commensale flora. De verdachte kolonies (zwakke hemolyse op bloedagar, grijs-zwarte kolonies op de media met telluriet) worden met Gram kleuring, katalase test en pyrazinamidase test onderzocht. Stammen met een karakteristieke morfologie op Gram kleuring (Gram positieve bacillen met verdikte uiteinden in palissaden- of spijkerschriftligging), positieve katalase en pyrazinamidase zullen verder geïdentificeerd worden.

Tabel 2.3.1. geeft de relevante biochemische kenmerken weer. Meerdere commerciële systemen (o.a. API Coryne) zijn betrouwbaar voor de identificatie van de potentieel toxineproducerende corynebacteria. Van essentieel belang is dat elk verdacht isolaat onderzocht wordt voor de productie van toxine en dit zonder op een definitieve identificatie te wachten. Het referentielaboratorium gebruikt hiervoor een PCR techniek. Positieve isolaten zullen echter naar een internationaal referentielaboratorium verzonden worden om de productie van het toxine te bevestigen, daar enkele stammen gerapporteerd werden met een puntmutatie leidend tot de introductie van een stop codon in het gen.

Figuur 2.3.1. Corynebacterium diphtheriae



Tabel 2.3.1. : Differentiatie van potentieel toxineproducerende *Corynebacteria*.

	<i>C. diphtheriae</i> biotype :				<i>C. ulcerans</i>	<i>C. pseudo-tuberculosis</i>
	<i>mitis</i>	<i>belfanti</i> ⁽¹⁾	<i>intermedius</i>	<i>gravis</i>		
urease	0	0	0	0	+	+
nitraat	+	0	+	+	0	V
glucose*	+	+	+	+	+	+
maltose*	+	+	+	+	+	+
glycogeen*	0	0	0	+	+	0
sucrose*	0	0	0	0	0	V
esculine	0	0	0	0	0	0
alk. fosfatase	0	0	0	0	+	V
CAMP**	0	0	0	0	OMG***	OMG***
β- hemolyse (BA)	meestal zwak	meestal zwak	geen	soms zwak	+	+
zetmeel (MH)	0	0	0	+	+	0
dextrine*	0	+	+	+	/	/
lipofiel	0	0	+	0	0	0
BA na 48u (koloniegrootte)	>1mm	>1mm	<1mm	>1mm	/	/
Gram van Loeffler	Lang, recht, pleiomorf		zeer pleiomorf	kort, coccoïd	/	/

- (1) *C. diphtheriae* biotype *belfanti* is steeds toxine negatief
* + 2 druppels paardenserum wanneer lipofiele kiem.
** gebruik *Staphylococcus aureus* ATCC 25923
*** omgekeerde Camp reactie (dubbele hemolysezona rond Stafylokok is verminderd)
0 negatief
+ positief
V variabel
BA bloed agar
MH Muller Hinton

D. Pierard, AZ VUB, Jette

REFERENTIES

1. Mathei et al., Diphtheria immunity in Flanders, Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1997, 16: 631-6

2.4. Cultuur M/4370 was een methicilline resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA)

De identificatie van *S. aureus* stelt over het algemeen geen problemen; toch dienen we de aandacht van de laboratoria te vestigen op de bepaling van de oxacilline-gevoeligheid, die soms problemen kan opleveren; nochtans is het detecteren van dragers van essentieel belang in het voorkomen van de transmissie van deze bacterie binnen het ziekenhuis, die meestal gebeurt via andere MRSA dragers (patiënten of personeel).

De oxacilline-resistentie van Stafylokokken is een genomische resistentie; het betreft een eilandje van chromosomale resistentie dat « Staphylococcal cassette chromosome *mec* » (*SCCmec*) genoemd wordt.

Antibiogram voor Stafylokokken via disk-diffusietest op agar :

Bodem : Mueller Hinton 2
Inoculum : 0.5 McFarland
Incubatietemperatuur : 35°C
Incubatieduur : 24 uur

Deze voorwaarden dienen strikt gevolgd te worden zoniet bestaat het risico op het antwoorden van vals negatieven.

Het opsporen van de resistentie kan gebeuren

- door agardiffusie met behulp van een oxacilline disk van 1 µg/ml
- door een bodem van het type Oxa-screen (Mueller Hinton + 4%NaCl + 6 µg/ml Oxacilline). Deze bodem houdt een risico op vals negatieven in gezien de mogelijkheid bestaat dat « small colony variants » niet groeien op deze bodem.
- met een automaat van de nieuwe generatie

Recente studies tonen aan dat het gebruik van een cefoxitineschijfje van 30 µg gevoeliger en specifiek zou zijn om resistentie van laag niveau te detecteren bij de heteroresistente MRSA. Bij een inhibitiezone van <20mm moet de methicilline-resistentie geconfirmeerd worden. Deze test moet echter nog op grote schaal geëvalueerd worden vooraleer hij in routine kan aangeraden worden.

Resistentie tegen oxacilline impliceert resistentie tegen alle β lactamines met of zonder β lactamase inhibitor, tegen cefalosporines en tegen carbapenems. Het is zinloos deze antibiotica te testen want er bestaan in vitro valse gevoeligheden.

Bevestiging van de oxacilline-resistentie :

- Gold standard : detectie van het *mecA* gen via PCR (gebeurt in de meeste Centra voor Moleculaire Diagnostiek in België) (De CMD voeren bovendien een bevestiging van de identificatie uit met behulp van een andere merker (Nuc of Fem))
- Detectie van de aanwezigheid van PBP2a via een latex techniek (Denka)
- Eventueel met een Oxa-screen bodem (beperkingen cf. supra)

Het is onontbeerlijk om de gevoeligheid van de *S. aureus* te bevestigen als het klassieke antibiogram gevoeligheid aan oxacilline maar resistentie tegen één der volgende antibiotica vertoont: 4-fluorochinolone, aminoglycoside of tetracycline.

In het begin van de jaren 1990, werd in de Belgische hospitalen voornamelijk een multiresistente MRSA kloon (behorende tot groep A) geïsoleerd met resistentie tegen gentamicine, fluorochinolones, macroliden, lincosamine ;

sinds enkele jaren merken we echter het verschijnen van een nieuwe kloon (behorende tot groep B), waarvan het belang steeds meer toeneemt en die veel gevoeliger is (Tabellen 2.4.1 en 2.4.2).

Bepaling van de gevoeligheid aan glycopeptiden (vancomycine en teicoplanine)

De prevalentie van *S. aureus*, die resistent of intermediair zijn voor glycopeptiden, is zeer gering in België ; het opsporen van dergelijke stammen is dus enkel nuttig in geval van een klinisch vermoeden van de aanwezigheid van dergelijke resistentie.

De agardiffusiemethode met antibioticaschijfjes en de dilutiemethode op automaten van de eerste generatie zijn niet betrouwbaar.

De screening kan gebeuren door gebruik te maken van een

- BHI (Brain Hart Infusion) bodem die 6 µg/ml vancomycine bevat.
- Mueller Hinton 2 bodem die 5 µg/ml vancomycine bevat.

Een 10 µl spot van een 0.5 McFarland *S. aureus* oplossing wordt geënt op één van deze twee bodems, die vervolgens gedurende 24 uur op 35°C geïncubeerd wordt.

Elke groei dient bevestigd te worden door een MIC-bepaling.

Tabel 2.4.1. : Gevoeligheid van de verschillende MRSA klonen

	Groep A1	Groep A20	Groep B
Gentamicine	R	S	S
Tobramycine	R	R	S
Rifampicine	R	R	S
Erythromycine	R	R	variabel
Clindamycine	R	R	S
Ciprofloxacin	R		R

Tabel 2.4.2 Verdeling van de MRSA klonen over de Belgische hospitalen

Jaar	Approximatief % groep A	Approximatief % groep B
1992	> 75%	5%
1995	< 75%	15 à 20%
1997	< 50%	35%
2001	25%	50%

REFERENTIES

1. NCCLS Document M100-S13 : Performance standards for antimicrobial disk susceptibility testing 13th informational supplement (for use with M2-A8). Janvier 2003
2. Werkdocument van de GDEPIH- GOSPIZ voorgesteld tijdens het symposium van de vereniging in Brussel op 29/04/2003.

III. RESULTATEN VAN DE IDENTIFICATIES (N=216)

De correcte of aanvaardbare resultaten zijn onderlijnd.

3.1. Cultuur M/2862 *Aeromonas species* (stoelgang) N = 216

<u><i>Aeromonas hydrophila</i></u>	136	(63,0 %)
<u><i>Aeromonas hydrophila/caviae</i></u>	9	(4,2 %)
<i>Aeromonas sobria</i>	9	(4,2 %)
<i>Aeromonas caviae</i>	2	(0,9 %)
<u><i>Aeromonas species</i></u>	54	(25,0 %)
Enterohemorragische <i>E. coli</i>	1	
<i>Vibrio metschnikovii</i>	1	
<i>Yersinia enterocolitica</i> 09	1	
Geen groei	1	
Niet in toepassingsgebied	1	
Geen antwoord	1	

3.2. Cultuur M/4244 *Escherichia coli* (bronchusaspiraatt) N = 216

<u><i>Escherichia coli</i></u>	215	(99,5 %)
Geen antwoord	1	

Op de vraag of het een ESBL producer betrof waren de antwoorden de volgende :

Ja	212	(98,1 %)
Niet bekend	3	
Geen antwoord	1	

3.3. Cultuur M/4313 *Corynebacterium diphtheriae*
(keeluitstrijkje)
N = 216

<u><i>Corynebacterium diphtheriae</i></u>	117 (54.2%)
<u><i>Corynebacterium diphtheriae gravis</i></u>	86 (39.8%)
<i>Corynebacterium diphtheriae mitis</i>	1
<i>C. diphth. gravis</i> + <i>C. diphth. intermedius</i>	1
<i>Corynebacterium species</i>	9
<i>Corynebacterium accolens</i>	1
<i>Corynebacterium diphtheriae</i> + <i>E. coli</i>	1

Op de vraag deze stam in routine naar een referentielaboratorium zou doorgestuurd worden, waren de antwoorden de volgende:

Ja	192 (88.9%)
Neen	13
Niet van toepassing	1
Geen antwoord	10

Het antwoord 'niet van toepassing' werd gegeven door een firmalaboratorium.

3.4 Cultuur M/4370 *Staphylococcus aureus* (wonde)
N = 216

<u><i>Staphylococcus aureus</i></u>	214 (99.1%)
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	1
Geen antwoord	1

94 van de 214 deelnemers die *S. aureus* geantwoord hebben, hebben hierbij expliciet MRSA vermeld.

IV. ANTIBIOGRAM

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

4.1. Cultuur M/4244 (*E. coli*)

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. Eén laboratorium vermeldde zowel voor amoxicilline-clavulaanzuur als voor cefepime het resultaat I/R voor de diffusiemethode (met ROSCO tabletten) en het resultaat R voor de dilutiemethode. Een ander laboratorium vermeldde voor amoxicilline-clavulaanzuur het resultaat S voor de diffusiemethode (met ROSCO tabletten) en het resultaat R voor Vitek 2. Een derde laboratorium vermeldde voor cefepime resultaat S voor de diffusiemethode (met papieren schijfjes) en het resultaat R voor Vitek 2. Al deze laboratoria werden in onderstaande tabel als 'R' gerangschikt.

Tabel 4.1.1. Resultaten der laboratoria voor de antibiogrammen voor staal M/4244 (*E.coli*)

	Verwacht resultaat	S	I	R
Co-trimoxazole	R	-	-	210
Ciprofloxacin	R	-	-	201
Amoxicilline ¹	R	-	-	138
Amoxicilline-clavulaanzuur	R	42	78	95
Piperacilline	R	3	1	145
Meropenem	S	164	-	-
Cefuroxime	R	-	-	209
Cefotaxime	R	1	2	170
Cefepime	R	8	38	117
Gentamicine	R	3	3	192

¹ Resultaten afgeleid op basis van ampicilline in een aantal gevallen

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. 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 resultaten werden evenmin in aanmerking genomen in de hiernavolgende tabellen.

Tabel 4.1.2. Bekomen diameters met de schijfjesmethode volgens NCCLS voor staal M/4244 (*E.coli*)

Antibioticum	Aantal gebruikers met vermelding van lading (Totaal aantal gebruikers)	Lading	Mediane diameter	Grenswaarden diameter	Resultaat (Totaal aantal gebruikers)		
					S	I	R
Co-trimoxazole	34 (49)	1.25/23.75	6	6-6	0	0	49
Ciprofloxacin	43 (47)	5	6	6-7	0	0	47
Amoxicilline-clavulaanzuur	22 (50)	20/10	14	6-16	1	16	33
Piperacilline	23 (29)	100	6,5	6-22	1	0	28
Meropenem	33 (36)	10	30	21-34	36	0	0
Cefuroxime	44 (47)	30	6	6-7	0	0	47
Cefotaxime	35 (39)	30	9	6-12	0	0	39
Cefepime	27 (31)	30	17	11-20	2	1	28
Gentamicine	41 (44)	10	8	6-11	0	0	44

Tabel 4.1.3. Bekomen diameters met de schijfjesmethode volgens ROSCO voor staal M/4244 (*E.coli*)

Antibioticum	Aantal gebruikers met vermelding van lading (Totaal aantal gebruikers)	Lading	Mediane diameter	Grenswaarden diameter	Resultaat (Totaal aantal gebruikers)			
					S	I	I/R	R
Co-trimoxazole	85 (85)	5.4/240	9	8-10	0	0	0	85
Ciprofloxacin	56 (76)	10	9	9-10	0	0	0	76
Amoxicilline	29 (55)	30	9	8-10	0	0	0	55
Amoxicilline-clavulaanzuur	90 (90)	30/15	20	16-24	26	19	1	44
Piperacilline	37 (57)	100	9	9-26	0	0	0	57
Meropenem	34 (57)	10	33	23-39	57	0	0	0
Cefuroxime	86 (86)	60	9	8-10	0	0	0	86
Cefotaxime	37 (61)	30	12	9-29	0	0	0	61
Cefepime	62 (62)	30	17	10-23	1	11	1	49
Gentamicine	57 (76)	40	16	10-19	2	1	0	73

De verschillen tussen NCCLS en ROSCO zijn significant voor amoxicilline-clavulaanzuur ($p < 0.05$).

De resultaten bekomen met de Vitek worden weergegeven in tabel 4.1.4.

Tabel 4.1.4. Resultaten bekomen met de Vitek voor staal M/4244 (*E.coli*)

Antibioticum	Vitek 1					Vitek 2				
	Finaal resultaat			Meest vermelde verdunning	Aantal labo's dat deze verdunning vermeldde (Totaal aantal gebruikers)	Finaal resultaat			Meest vermelde verdunning	Aantal labo's dat deze verdunning vermeldde (Totaal aantal gebruikers)
	S	I	R			S	I	R		
Co-trimoxazole	0	0	12	>320	7 (12)	0	0	38	>320	29 (38)
Ciprofloxacine	0	0	13	>4	8 (13)	0	0	37	>4	28 (37)
Amoxicilline-clavulaanzuur	2	9	2	<8	8 (13)	0	32	6	16	26 (38)
Piperacilline	0	0	1	>256	1 (1)	0	0	38	>128	29 (38)
Meropenem	10	0	0	<2	7 (10)	37	0	0	<0.25	28 (37)
Cefuroxime	0	0	13	>32	8 (13)	0	0	37	>64	28 (37)
Cefotaxime	0	0	13	>64	6 (13)	0	0	37	>64	28 (37)
Cefepime	0	1	9	16	4 (10)	3	24	11	2 en 4	20 (38)
Gentamicine	0	2	11	>16	7 (13)	0	0	38	>16	29 (38)

In de meeste gevallen is de 'meest vermelde verdunning' de enige die vermeld werd door de deelnemers; een aantal laboratoria vermeldden immers de gevonden verdunning niet. Uiteraard zijn er laboratoria die één verdunning verschillend van de meest vermelde, gevonden hebben.

Nochtans:

- voor cefepime:

- Vitek 1: naast de meest vermelde verdunning 16 mg/l (4 maal vermeld), werden ook 1 maal de verdunning 8 mg/l en 2 maal > 32 mg/l geantwoord voor het finale antibiogram; de overige gebruikers vermeldden de gevonden verdunning niet. Er dient opgemerkt dat de verdunning 16 mg/l een 'ruw' resultaat "I" oplevert; op basis van het expertsysteem wordt dit vervolgens omgezet naar "R" voor het finale resultaat.

- Vitek 2: naast de 2 meest vermelde verdunningen 2 en 4 mg/l (ieder 10 maal vermeld), werden ook 4 maal de verdunning 8 mg/l, 3 maal de verdunning 32 mg/l en één maal > 64 mg/l geantwoord voor het finale antibiogram; de overige gebruikers vermeldden de gevonden verdunning niet. Er dient opgemerkt dat de verdunningen 2, 4 en 8 mg/l een 'ruw' resultaat "S" opleveren; op basis van het expertsysteem worden deze resultaten al dan niet naar "I" of "R" omgezet voor het finale resultaat. We kunnen echter geen strikte relatie tussen een verdunning lager dan 32 mg/l en finaal resultaat vaststellen:

Verdunning (mg/l)	Finaal resultaat (n)		
	S	I	R
2	7	2	1
4		7	3
8		3	
32			3
> 64			1

- voor amoxicilline-clavulaanzuur dient vermeld te worden dat een verdunning < 8 mg/l een ruw resultaat "S" oplevert; op basis van het expert systeem wordt dit resultaat omgezet naar "I" voor het finale resultaat.

De resultaten bekomen met de ATB methode worden weergegeven in tabel 4.1.5. De meeste laboratoria antwoordden enkel het resultaat (S, I of R) en geven geen waarden weer.

Tabel 4.1.5. Resultaten bekomen met de ATB methode voor staal M/4244 (*E.coli*)

Antibioticum	Resultaat		
	S	I	R
Co-trimoxazole	0	0	20
Ciprofloxacine	0	0	21
Amoxicilline-clavulaanzuur	11	4	6
Piperacilline	1	0	16
Meropenem	18	0	0
Cefuroxime	0	0	22
Cefotaxime	1	2	16
Cefepime	3	1	14
Gentamicine	0	0	20

Verder dienen vermeld:

- vier laboratoria bepaalden de resistentie tegen cefepime met de E-test, twee gebruikten deze techniek voor de resistentie bepaling tegen amoxicilline, amoxicilline-clavulaanzuur en meropenem; één laboratorium bepaalde de resistentie tegen cefuroxime, cefotaxime en gentamicine hiermee
- twee laboratoria bepaalden de resistentie tegen co-trimoxazole, ciprofloxacine, amoxicilline-clavulaanzuur, piperacilline, meropenem, cefuroxime, cefepime en gentamicine met de microdilutiemethode;

- één van beide bepaalde met deze methode tevens de gevoeligheid tegen amoxicilline en cefotaxime
- twee laboratoria bepaalden de resistentie tegen co-trimoxazole, ciprofloxacin, amoxicilline-clavulaanzuur, meropenem, cefuroxime, cefotaxime, cefepime en gentamicine met Phoenix; één van beide bepaalde met deze methode tevens de gevoeligheid tegen amoxicilline en piperacilline
 - één laboratorium bepaalde de resistentie tegen co-trimoxazole, ciprofloxacin, amoxicilline, amoxicilline-clavulaanzuur en gentamicine met de agardilutiemethode
 - één laboratorium bepaalde de resistentie tegen co-trimoxazole, ciprofloxacin, amoxicilline, piperacilline, cefuroxime, cefotaxime en gentamicine met Sensititre
 - één laboratorium bepaalde de resistentie tegen co-trimoxazole, amoxicilline, amoxicilline-clavulaanzuur, piperacilline, meropenem, cefuroxime, cefotaxime, cefepime en gentamicine met Mini Api

Tenslotte zijn er zeven laboratoria die niet vermeldden welke techniek zij gebruikten voor de bepaling van de resistentie tegen één of meer antibiotica

4.2. Cultuur M/4370 (S.aureus)

Aantal deelnemers= 216

Sommige deelnemers bepaalden de gevoeligheid met meer dan 1 methode. Per laboratorium wordt in onderstaande tabel 4.2.1. slechts 1 resultaat weergegeven. In de meeste gevallen werd met verschillende technieken door eenzelfde laboratorium eenzelfde resultaat bekomen voor eenzelfde antibioticum. Eén laboratorium vermeldde voor oxacilline het resultaat S voor de diffusiemethode (met ROSCO tabletten) en het resultaat R voor de diluatiemethode. Een tweede laboratorium vermeldde voor amikacine het resultaat S voor de diffusiemethode (met ROSCO tabletten) en het resultaat R voor Vitek 2. Deze beide laboratoria werden in onderstaande tabel onder 'R' gerangschikt.

Een derde laboratorium vermeldde voor gentamicine het resultaat I voor de diffusiemethode (met ROSCO tabletten) en het resultaat S voor de MIC-bepaling. Een vierde laboratorium vermeldde voor ciprofloxacin resultaat I voor de diffusiemethode en het resultaat S voor de MIC-bepaling. Gezien we mogen veronderstellen dat deze laboratoria in routine het resultaat van de MIC-bepaling laten prevaleren op het resultaat van de diffusiemethode werden deze laboratoria werden in onderstaande tabel als 'S' gerangschikt.

Tevens is er een laboratorium dat voor gentamicine I/S antwoordde; dit laboratorium werd onder 'I' gerangschikt.

Er valt eveneens te vermelden dat één laboratorium het ruwe antibiogram bepaalde voor alle antibiotica, doch voor erythromycine, co-trimoxazole, amikacine en ciprofloxacin geen finaal antibiogram antwoordde gezien dit laboratorium deze antibiotica bij S. aureus in routine enkel antwoordt voor urinestalen.

Tot slot dienen we één laboratorium te vermelden dat met bepaling van het ruw antibiogram het resultaat 'R' bekwam voor vancomycine en vervolgens rapporteerde dat om de gevoeligheid adequaat te kunnen bepalen een MIC-bepaling aangewezen is.

Tabel 4.2.1. Resultaten der laboratoria voor de antibiogrammen voor staal M/4370 (*S.aureus*)

	Verwacht resultaat	S	I	R
Oxacilline	R	20	-	194
Penicilline	R	2	-	199
Erythromycine	S	187	13	7
Clindamycine	S	191	3	5
Co-trimoxazole	S	204	1	2
Vancomycine	S	196	2	5
Gentamicine	S	183	8	4
Amikacine	S	101	3	28
Ofloxacine	S	123	1	2
Ciprofloxacine	S	154	5	4

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. 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 resultaten werden evenmin in aanmerking genomen in de hiernavolgende tabellen.

Tabel 4.2.2. Bekomen diameters met de schijfjesmethode volgens NCCLS voor staal M/4370 (*S.aureus*)

Antibioticum	Aantal gebruikers met vermelding van lading (Totaal aantal gebruikers)	Lading	Mediane diameter	Grenswaarden diameter	Resultaat (Totaal aantal gebruikers)			
					S	I ¹	R	*2
Oxacilline	32 (43)	1	7,5	6-22	2	0	41	
Penicilline	34 (47)	10	12	6-31	0	0	47	
Erythromycine	42 (47)	15	25	20-35	39	6	2	
Clindamycine	37 (42)	2	25	19-28	38	2	2	
Co-trimoxazole	41 (50)	1.25/23.75	26	22-32	50	0	0	
Vancomycine	36 (41)	30	16	12-27	37	1	2	1
Gentamicine	36 (41)	10	20	14-29	38	1	2	
Amikacine	36 (39)	30	18	6-26	29	2	8	
Ofloxacine	21 (24)	5	23	18-28	22	1	1	
Ciprofloxacine	38 (43)	5	23	18-32	37	5	1	

¹ Het voor gentamicine in de tabel als "I" vermelde resultaat werd als "I/S" geantwoord

² Eén laboratorium vermeld geen finaal resultaat voor vancomycine doch geeft aan dat een MIC bepaling dient te gebeuren ten einde het finaal resultaat te kennen

Tabel 4.2.3. Bekomen diameters met de schijfjesmethode volgens ROSCO voor staal M/4370 (*S.aureus*)

Antibioticum	Aantal gebruikers met vermelding van lading (Totaal aantal gebruikers)	Lading	Mediane diameter	Grenswaarden diameter	Resultaat (Totaal aantal gebruikers)			
					S	I	R	*1
Oxacilline	78 (87)	1	14	9-30	17	0	70	
Penicilline	64 (86)	5	11	9-37	2	0	84	
Erythromycine	58 (89)	78	30	24-44	82	3	3	1
Clindamycine	65 (84)	25	31	14-38	81	1	2	
Co-trimoxazole	58 (89)	1.25/23.75	34	25-47	87	1	0	1
Vancomycine	38 (82)	5	17	11-22	38	0	0	
	31	70	20	10-23	28	1	2	
Gentamicine	66 (81)	40	26	20-30	73	7	1	
Amikacine	47 (81)	40	23	9-27	68	1	11	1
Ofloxacine	33 (52)	10	26	22-32	52	0	0	
Ciprofloxacine	57 (78)	10	25	20-32	76	0	1	1

¹ Eén laboratorium bepaalde het ruwe antibiogram voor alle antibiotica, doch antwoordde voor erythromycine, co-trimoxazole, amikacine en ciprofloxacine geen finaal antibiogram gezien dit laboratorium deze antibiotica bij *S. aureus* in routine enkel antwoordt voor urinestalen.

De verschillen tussen NCCLS en ROSCO zijn significant voor oxacilline ($p < 0.05$).

De resultaten bekomen met de Vitek worden weergegeven in tabel 4.2.4.

Tabel 4.2.4. Resultaten Bekomen met de Vitek voor staal M/4370 (*S. aureus*)

Antibioticum	Vitek 1					Vitek 2				
	Finaal resultaat			Meest vermelde verdunning	Aantal labo's dat deze verdunning vermeldde (Totaal aantal gebruikers)	Finaal resultaat			Meest vermelde verdunning	Aantal labo's dat deze verdunning vermeldde (Totaal aantal gebruikers)
	S	I	R			S	I	R		
Oxacilline	0	0	13	>8	9 (13)	0	0	38	>4	24 (38)
Penicilline	0	0	4	>16	2 (4)	0	0	38	>0.5	28 (38)
Erythromycine	12	0	1	<0.5	8 (13)	38	0	0	<0.25	29 (38)
Clindamycine	13	0	0	<0.5	8 (13)	38	0	0	<0.25	29 (38)
Co-trimoxazole	11	0	1	<10	8 (12)	38	0	0	<10	29 (38)
Vancomycine	13	0	0	2	4 (13)	38	0	0	<1	29 (38)
Gentamicine	12	0	1	<2	7 (13)	38	0	0	<0.5	29 (38)
Amikacine	-	-	-	-	-	1	0	8	>32	3 (9)
Ofloxacine	3	0	0	<4	1 (3)	38	0	0	<0.5	29 (38)
Ciprofloxacine	12	0	1	<0.5	8 (13)	11	0	0	-	- (11)

In nagenoeg alle gevallen is de 'meest vermelde verdunning' ook de enige die vermeld werd (enkel bij penicilline werd éénmaal de verdunning 0.25 mg/l vermeld); een aantal laboratoria vermeldden de gevonden verdunning niet.

De 5 resultaten die afwijken van deze van de meerderheid der gebruikers van deze methode (R met Vitek 1 voor erythromycine, co-trimoxazole, gentamicine en ciprofloxacine; S met Vitek 2 voor amikacine) werden geantwoord door laboratoria die de gevonden verdunning niet vermeldden. Er dient opgemerkt dat voor erythromycine, gentamicine en ciprofloxacine het 'ruw' resultaat "S" was en dit nadien omgezet werd naar "R" voor het finaal resultaat (in geval van erythromycine op basis van het expertsysteem).

De resultaten bekomen met de ATB methode worden weergegeven in tabel 4.1.5. De meeste laboratoria antwoordden enkel het resultaat (S, I of R) en geven geen waarden weer.

Tabel 4.2.5. Resultaten bekomen met de ATB methode voor staal M/4370 (*S.aureus*)

Antibioticum	Resultaat		
	S	I	R
Oxacilline	0	0	19
Penicilline	0	0	19
Erythromycine	15	3	1
Clindamycine	18	0	1
Co-trimoxazole	16	0	1
Vancomycine	18	0	1
Gentamicine	18	0	0
Amikacine	-	-	-
Ofloxacine	8	0	0
Ciprofloxacine	7	0	0

Tabel 4.2.6. Resultaten bekomen met oxascreen en vancoscreenbodems voor staal M/4370 (*S.aureus*)

Antibioticum	Resultaat		
	S	I	R
Oxacilline	1	0	15
Vancomycine	8	0	0

Tabel 4.2.7. Resultaten bekomen met de E test voor staal M/4370 (*S.aureus*)

Antibioticum	Resultaat		
	S	I	R
Oxacilline	1	0	7
Penicilline	0	0	3
Erythromycine	-	-	-
Clindamycine	-	-	-
Co-trimoxazole	-	-	-
Vancomycine	9	0	0
Gentamicine	1	0	0
Amikacine	1	0	1
Ofloxacine	-	-	-
Ciprofloxacine	1	0	0

Verder dienen vermeld:

- twee laboratoria bepaalden de resistentie tegen oxacilline, penicilline, erythromycine, clindamycine, co-trimoxazole, vancomycine, gentamicine en ciprofloxacine met de microdilutiemethode
- één laboratorium bepaalde de resistentie tegen oxacilline, penicilline, erythromycine, clindamycine, co-trimoxazole, vancomycine, gentamicine en ciprofloxacine met Phoenix
- één laboratorium bepaalde de resistentie tegen oxacilline, penicilline, erythromycine, clindamycine, co-trimoxazole, vancomycine, gentamicine, ofloxacine en ciprofloxacine met Sensititre
- één laboratorium bepaalde de resistentie tegen oxacilline, penicilline, erythromycine, clindamycine, co-trimoxazole, vancomycine, gentamicine en ciprofloxacine met Mini Api

Tenslotte zijn er elf laboratoria die niet vermeldden welke techniek zij gebruikten voor de bepaling van de resistentie tegen één of meer antibiotica

Nota betreffende staal M/4086 uit enquête 2003/1

Enkel de antwoorden *Enterococcus faecium* en *Enterococcus species* werden als correct of aanvaardbaar weerhouden. Het antwoord *Streptococcus faecium* werd niet weerhouden.

In de zevende editie van de 'Manual of clinical microbiology' (eds. P.R. Murray et. al.) (1999) wordt duidelijk vermeld dat *Enterococcus* als een verschillend genus van *Streptococcus* beschouwd dient te worden ("Genetic evidence that *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* were sufficiently different from the other members of the genus *Streptococcus* to merit a separate genus, as originally proposed by Kalina, was provided by Schleiffer and Killper-Balz in 1984. It has been 15 years since this proposal, and it is generally accepted that the genus *Enterococcus* is valid." (p. 297)). Derhalve leek het ons ook aangewezen het antwoord *Streptococcus faecium* niet meer te weerhouden.

V. PARASITOLOGIE

5.1. De monsters

Er werden 2 bloeditstrijkjes naar de laboratoria verzonden.

Staal P/4151 was voorzien van volgende klinische inlichtingen:

Een 21-jarige man uit Burkina Faso verblijft sinds een 3-tal jaar in België. Na een bezoek aan zijn thuisland is hij sinds 3 weken terug in België. Op het ogenblik van de staalafname vertoont hij hoge rikoorts en diarree. Dit staal bevatte trofozoieten van *Plasmodium falciparum*.

In sommige preparaten werden eveneens zeldzame schizonten aangetroffen.

Staal P/4165 was voorzien van volgende klinische inlichtingen:

Een 45-jarige man maakte een rondreis doorheen Zuid-Amerika. Sinds zijn terugkeer vertoont hij tekens van algemeen onwelzijn, koorts en vermoeidheid. Tijdens zijn verblijf nam hij de aangewezen profylaxe. Dit staal was negatief.

5.2. De resultaten

5.2.1 Staal P/4151

In totaal namen 205 laboratoria deel aan de enquête. 203 laboratoria vermeldden de aanwezigheid van Plasmodium. Drie laboratoria vermeldden de aanwezigheid van 2 verschillende species, één laboratorium de aanwezigheid van 3 verschillende species. Vijf andere laboratoria vermeldden de mogelijkheid van een menginfectie.

Eén laboratorium vermeldde de aanwezigheid van *E. hominis*, een andere van microsporidia. Mogelijk maakten deze laboratoria gebruik van een oudere code. Wij wensen erop aan te dringen steeds de meest recente codes te gebruiken.

De resultaten worden in onderstaande tabel weergegeven.

Tabel 5.2.1. Resultaten van de in staal P/4151 weergevonden parasieten

Parasiet	Aantal
<i>P.falciparum</i>	186
<i>P.falciparum</i> + <i>P.malariae</i>	3
<i>P.falciparum</i> + <i>P.malariae</i> + <i>P.ovale</i>	1
<i>P.malariae</i>	7
<i>P.vivax</i>	2
<i>P.ovale</i>	1
<i>Plasmodium species</i>	3
<i>Enteromonas hominis</i>	1
Microsporidia	1
Totaal	205

De 190 laboratoria die, alleen of in combinatie met een andere *Plasmodium species*, *P. falciparum* vonden, vermeldden 5 evolutie stadia: 176 laboratoria vermeldden één stadium, 13 vermeldden er 2 en één laboratorium drie.

Deze stadia worden weergegeven in volgende tabel.

Tabel 5.2.2. De stadia vermeld voor *P. falciparum* in staal P/4151

Stadium	Aantal
Trofozoiet	181
Jonge schizont	7
Oudere schizont	7
Gametocyt	5
Volwassen vorm	1
Niet gepreciseerd	4
Totaal	205

Indien meer dan 2 evolutiestadia vermeld werden, werden volgende combinaties weergegeven :

Tabel 5.2.3. Combinaties van stadia voor *P. falciparum* in staal P/4151

Combinatie	Aantal
Trofozoiet + oudere schizont	4
Trofozoiet + jonge schizont	4
Trofozoiet + gametocyt	2
Trofozoiet + volwassen vorm	1
Jonge + oudere schizont	2
Trofozoiet + oudere schizont + gametocyt	1
Totaal	14

Drie laboratoria vermeldden met andere woorden enkel schizonten: 2 de combinatie van jonge + oude schizonten, één enkel jonge schizonten. Twee laboratoria vermeldden de aanwezigheid van enkel gametocyten.

Vijf laboratoria vermeldden het staal in routine door te sturen naar het referentiecentrum voornamelijk ter bevestiging van species en/of stadium.

Vier van deze laboratoria stelden wel de aanwezigheid van trofozieten van *P. falciparum* voorop; het vijfde laboratorium vermeldde *Plasmodium* species (zonder differentiatie van het stadium).

Het percentage gearasiteerde cellen varieert sterk tussen de laboratoria. Niet alle laboratoria vermeldden dit aantal. Voor de verschillende stadia van *P.falciparum* hebben we mediaan, minimum en maximum berekend.

Tabel 5.2.4. Percentage gearasiteerde cellen voor *P. falciparum*

Percentage gearasiteerde cellen	Mediaan	Minimum	Maximum
Trofozoiet	5	0,8	40
Jonge schizont	1	0,001	7
Oudere schizont	3	0,001	25
Gametocyt	2,4	1	5

5.2.2 Staal P/4165

In totaal namen 205 laboratoria deel aan de enquête. Een overzicht van de antwoorden is terug te vinden in onderstaande tabel.

Tabel 5.2.5. Overzicht van de resultaten gerapporteerd voor staal P/4165

Parasiet	Aantal
Negatief	200
<i>Plasmodium vivax</i>	2
<i>Bartonella species</i>	2
<i>Mansonella ozzardi</i>	1
<i>Trypanosoma cruzi</i>	1
Totaal	205

Er valt op te merken dat één laboratorium vermeldde alle uitstrijkjes door te sturen naar het referentielaboratorium aangezien zij enkel een antigenbepaling uitvoeren. Een ander laboratorium raadt controle op een dikdruppel aan. Beide laboratoria beschouwen het uitstrijkje wel als negatief.

Eveneens te vermelden is dat één laboratorium de diagnose van virale infectie suggereert op basis van de combinatie van de verstrekte klinische inlichtingen en het negatieve aspect van het uitstrijkje.

5.3. Commentaar

5.3.1 Staal P/4151 *Plasmodium falciparum* + ?

5.3.1.1. Klinische inlichtingen

Een 21-jarige man uit Burkina Faso verblijft sinds een 3-tal jaar in België. Na een bezoek aan zijn geboorteland is hij sinds 3 weken terug in België. Op het ogenblik van de staalname vertoont hij hoge rilkooorts en diarree. Het aantal bloedplaatjes bedraagt $92 \cdot 10^9/l$ en zal verder dalen tot $49 \cdot 10^9/l$.

5.3.1.2. Epidemiologie van malaria in West-Afrika

De vier humane *Plasmodium* species komen voor in Afrika. Weliswaar komt *Plasmodium vivax* niet voor in West-Afrika.

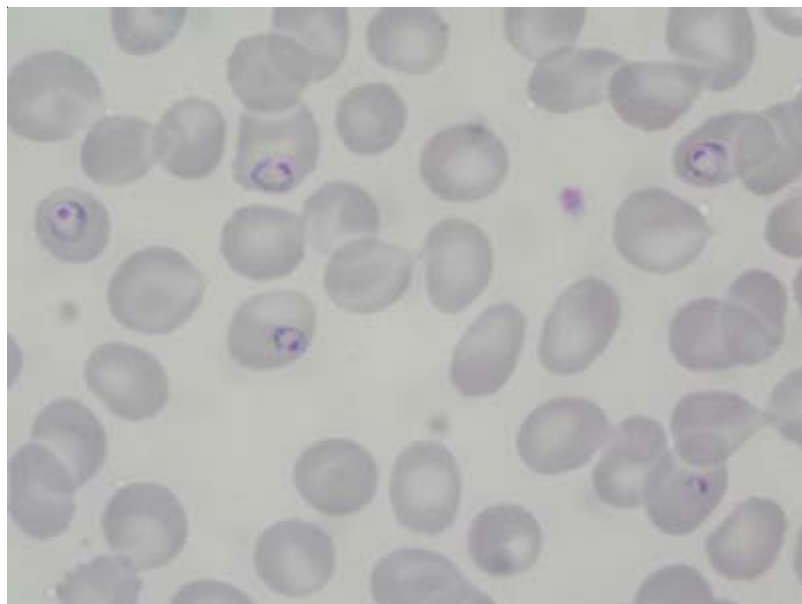
De Duffy-bloedgroep is de receptor van deze species en deze bloedgroep komt nagenoeg niet voor bij de bevolking van West-Afrika (1, 2). In West-Afrika daarentegen is *Plasmodium ovale* niet zo zeldzaam. In Noord-Afrika (bv. Egypte) en in Oost-Afrika (bv. Ethiopië) is *P. vivax* wel zeer frequent (2). *Plasmodium malariae* en vooral *Plasmodium falciparum* kunnen voorkomen in heel Zwart Afrika (onder de Sahara) (2). Chloroquine-resistentie bij *P. falciparum* is vrij verspreid in heel dit gebied (vroegere zone C van de WGO) en bemoeilijkt zowel de profylaxe als de therapie.

5.3.1.3. Microscopie

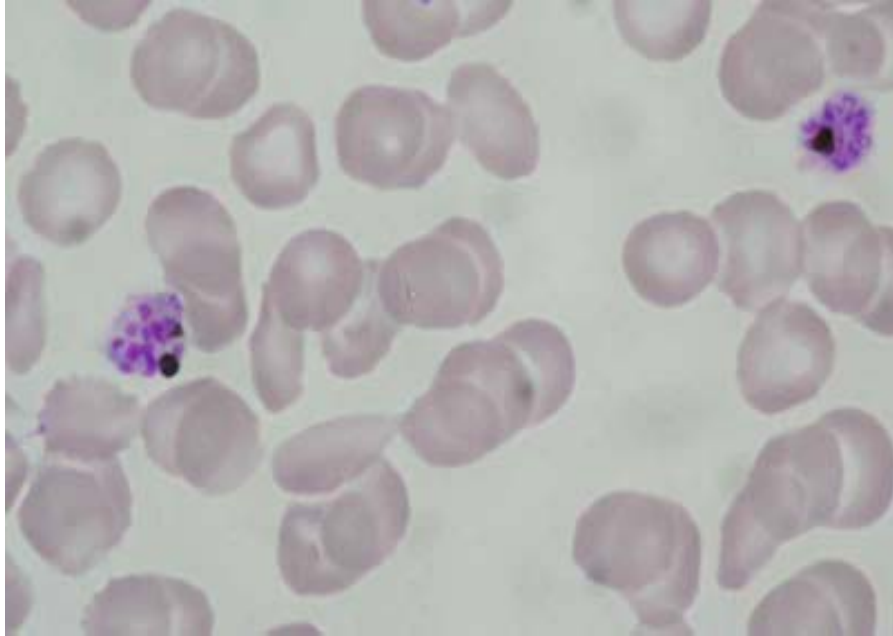
Een aanzienlijk aantal rode bloedcellen (mediane waarde 5 % in deze enquête) waren geparasiteerd door jonge ringvormige trofozoïeten (figuur 5.3.1.1). Deze trofozoïeten hadden een doormeter die soms kleiner was dan een derde van de doormeter van de geparasiteerde cel (figuur 5.3.1.1). In een minderheid van de preparaten kon men eveneens schizonten aantreffen (figuur 5.3.1.2). Deze schizonten vertoonden een tiental merozoïeten.

Enkele belangrijke differentiële kenmerken van de vier humane *Plasmodium* species zijn samengevat in tabel 5.3.1.1.

Korreling van de rode bloedcellen (Maurer, Schüffner) komt beter tot uiting bij licht alkalische pH, maar een dergelijke kleuring is niet voorhanden in de meeste laboratoria.



Figuur 5.3.1.1: 5 trofozoïeten van *Plasmodium falciparum* in P/4151.



Figuur 5.3.1.2: 2 schizonten van *Plasmodium* sp. in P/4151

Tabel 5.3.1.1: differentiële kenmerken van de vier humane *Plasmodium* species (2, 3, 4)

	<i>P. falciparum</i>	<i>P. vivax</i>	<i>P. ovale</i>	<i>P. malariae</i>
% geparasiteerde RBC	Tot 40 % en meer	2 %	2 %	2 %
Uitzicht RBC	Normaal	Vergroot	Vergroot	Verkleind
Trofozoïet	Soms 2 / RBC; soms 2 kernen; <i>accolé</i> -vormen	1 / RBC	1 (2) / RBC	Bandvorm en pigment frequent
Schizont	Normaal niet in het perifeer bloed	12-24 merozoïeten	6-12 merozoïeten	6-12 merozoïeten
Gametocyt	Sikkelvormig	Rond	Rond	Rond

Men vermoedt dat de hoge parasitemie bij *P. falciparum* een gevolg is van het feit dat deze parasiet alle rode bloedcellen, jonge en oude, infecteert.

5.3.1.4. Bespreking

Een trombopenie is een indicator van een ernstige malaria (1). De meeste trofozoïeten zijn klein (ten opzichte van de RBC) en fijn, wat typisch is voor *Plasmodium falciparum*. Ook de hoge parasitemie wijst in deze richting. Schizonten van *P. falciparum* (8-24 of meer merozoïeten) kunnen in uitzonderlijke gevallen wel eens voorkomen in het perifere bloed (4). Menginfecties kunnen voorkomen in 5 tot 7 % van de gevallen (1). Deze schizonten (in West-Afrika) kunnen in principe dan ook *P. ovale* of *P. malariae* zijn. Er werd geen malariaserologie uitgevoerd voor deze patiënt. Een andere mogelijkheid ware een species-specifieke PCR geweest (5). Deze PCR is voorlopig niet beschikbaar in België maar wordt ontwikkeld in het Instituut voor Tropische Geneeskunde in Antwerpen. De experten, na raadplegingen van externe gespecialiseerde collegae, zijn dan ook de mening toegedaan dat het niet mogelijk is op basis van de beschikbare gegevens een menginfectie van *P. falciparum* met een andere species uit te sluiten. De diagnose van *P. falciparum* is echter wel essentieel omdat deze species levensbedreigend kan zijn.

De precieze species identificatie is eveneens belangrijk voor de therapie en voor het voorkomen van de laattijdige recidieven. In twijfel zal men er uiteraard van uit gaan dat er *P. falciparum*, met ernstig risico voor chloroquine-resistentie, aanwezig is. *Plasmodium ovale* en *Plasmodium vivax* hebben een persisterende leverfaze (hypnozoïeten) van waaruit laattijdige recidieven kunnen optreden. Het herkennen van deze vormen is dan ook nuttig om een eventuele nabehandeling (met primaquine) te kunnen instellen. Het is wenselijk om positieve stalen door te zenden naar het referentielabo in het Instituut voor Tropische Geneeskunde te Antwerpen.

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

REFERENTIES

1. Krogstad D. J. 2000. *Plasmodium species (malaria)*. In Mandell G. et al. (eds.). Principles and practice of infectious diseases. Churchill Livingstone, New York: 2817-2831.
2. Ripert C., Pajot F.X. 1996. Paludisme. In Ripert C. et al. (eds). Epidémiologie des maladies parasitaires. Editions Médicales Internationales, Cachan Cedex: Tome 1:69-180.
3. Rogers W. O. 2003. *Plasmodium and Babesia*. In Murray P. et al. (eds.). Clinical Microbiology. ASM Press, Washington DC: 1994-1959.
4. Wilcox A. 1960. Manual for the microscopical diagnosis of malaria in man. U.S. Department of Health, Education, and Welfare, Washington.
5. <http://www.dpd.cdc.gov/DPDx/HTML/Malaria.htm>

VI. SEROLOGIE

6.1. Syfilis

6.1.1. Beschrijving van het monster

Er werd één monster opgestuurd: S/ 2102 waarop zowel anti Syfilis-antistoffen als ASLO bepaald moesten worden.

Het staal was vergezeld van volgende klinische inlichtingen:

Een patiënt meldt zich bij zijn arts met rash en koorts.

6.1.2. De deelnemers

In het totaal namen 203 laboratoria deel aan deze enquête. Er werden 424 bepalingen uitgevoerd. Vijftien laboratoria voerden één test uit; 160 deelnemers voerden 2 testen uit, 23 voerden 3 testen uit en 5 voerden 4 testen uit.

6.1.3. Gebruikte reagentia

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

Fabrikant	Kit	Aantal
Abbott	Determine Syphilis TP	1
Alphadia	FTA-ABS	1
Axis-Shield	Microsyph TP	7
	Syphscreen RPR	11
Becton Dickinson	MacroVue RPR Card Test	14
	VDRL Cardioliipin Ag	1
Biokit	RPR	12
	Syphagen TPHA	14
bioMérieux	RPR-Slide Test	35
	TPHA-nosticon	1
	Trepo-Spot IF	29
Bouty	EIA Syphilis IgM Cattura	1
Dade Behring	Cellognost Syphilis H Combipack	13
	Enzygnost Syphilis	14
	VDRL Cardioliipin Ag	4
Diagast	Sypal CB	2
	VDRL Microgast	2
DiaSorin	EPI-TREPONEMA SCREEN	3
Eurobio	TPHA	1
Euroimmun	Treponema pallidum IgG	2
Forlab	Syphscreen EIA	3
	TPHA Test kit	1
Fujirebio	Serodia TPPA	108
	Serodia TPPA auto	1
Innogenetics	Inno TPHA	4
Lameris	RPR	1
Lorne Laboratories	TPHA kit	1
Medigal	RPR Latex	1
Mikrogen	Recomblot IgG	1
	Recomblot IgM	1
	Recomwell IgG	1
	Recomwell IgGM	1
Murex	Murex Syphacard-R	45
	Murex TPHA	3
	Murex VDRL Carbon antigen	2
	Wellcosyph HA	23
New Market Laboratories Ltd.	TPHA 200	1
Omega	Immutrep Carbon Antigen	1
	Immutrep RPR kit	9
	Immutrep TPHA kit	4
Oxoid	TPHA test	2
	VDRL Carbon Antigen	2
Reaction Spinreact	RPR Carbon	39
Servibio	Servitex TPHA	1
Totaal		424

6.1.4. Resultaten

De volgende tabel geeft een overzicht van de resultaten :

Resultaten	Aantal
Negatief	416
Borderline	4
Positief	3
Geen antwoord	1
Totaal	424

De borderline resultaten werden gevonden door 3 laboratoria :

- één laboratorium bekwam 2 maal een borderline resultaat en dit met 2 verschillende testen: de Macrovue RPR Card Test (Becton Dickinson) en de Murex TPHA test
- één laboratorium bekwam een borderline resultaat met de Syfacard-R (Murex) en een positief resultaat met de Murex TPHA test
- een derde laboratorium bekwam een borderline resultaat met de Syfacard-R (Murex) en negatieve resultaten met de Inno-TPHA (Innogenetics) en Trepo-Spot IF (bioMérieux)

Naast het hierboven reeds vermelde positief resultaat werden de overige 2 positieve resultaten bekomen door :

- één laboratorium dat een positief resultaat bekwam met de Trepo-Spot IF (bioMérieux) en negatieve resultaten met de Syfacard-R (Murex) en Serodia-TPPA (Fujirebio)

- één laboratorium dat slechts één test uitvoerde, de Syphscreen RPR (Axis-Shield)
Het laboratorium dat geen antwoord verstrekke, vermeldde dat de test niet interpreteerbaar was en stelde de vraag naar mogelijke matrixproblemen.

De laboratoria gaven volgende interpretaties:

Interpretatie	Aantal
Geen antilichamen detecteerbaar	195
Antilichamen detecteerbaar: acute syfilis dient te worden uitgesloten op basis van klinische gegevens, anamnese en serologisch profiel van follow-up sera.	4
Geen interpretatie	4
Totaal	203

De 4 antwoorden "antilichamen detecteerbaar" waren afkomstig van de laboratoria die een positief en/of borderline resultaat bekwamen.

Het laboratorium, dat éénmaal een borderline en twee maal een negatief resultaat bekwam, antwoordde echter "geen antilichamen detecteerbaar".

Eén van de laboratoria dat vermeldde dat acute syfilis diende te worden uitgesloten, vermeldde dat naast klinische gegevens, anamnese en follow-up sera, ook vals positieve FTA door kruisreactie diende uitgesloten te worden.

Behalve het hoger vermelde laboratorium, dat problemen had met de interpretatie, kwamen de 3 andere "geen interpretaties" van laboratoria, die negatieve resultaten bekwamen. Vermoedelijk betreft het hier gewoon een vergetelheid bij het invullen.

Onderstaande tabel geeft een overzicht van de afwijkende resultaten :

Positief	Borderline	Negatief
1 labo (Aan)	1 labo (Aan)	
Syphscreen	Macrovue RPR cardtest MUREX TPHA	
	1 labo (Aan)	1 labo (Af)
MUREX TPHA	Syphacard-R	Inno TPHA Trepospot IF
	1 labo (Aan)	
Trepospot IF		Syphacard-R

Interpretatie : (Aan) = aanwezigheid van As; (Af) : Afwezigheid van As

6.1.5. Commentaar op de resultaten van het onderzoek

Syfilis is een infectie die meestal wordt overgedragen door seksueel contact. Het oorzakelijk agens is het humane pathogeen *Treponema pallidum*.

De diagnose van syfilis kan gesteld worden op basis van klinische gegevens, het aantonen van de spirocheten in een letsel, het resultaat van een serologische test en meer recent door het opsporen van het DNA van *T. pallidum*.

6.1.5.1. Laboratorium diagnose van syfilis

Een overzicht van de meest gebruikte diagnostische tests voor syfilis vinden we terug in onderstaande tabel.

Tabel 6.1.5.1. Overzicht van de diagnostische testen voor syfilis

1. Opsporen van Treponemen

- donker veld microscopie
- directe immunofluorescentie met een specifiek anti-*Treponema pallidum* conjugaat

2. Opsporen van antistoffen

2.1. Niet specifieke *Treponema* antistoffen

- Venereal Disease Research Laboratory test (VDRL)
- Rapid Plasma Reagin test (RPR)

2.2. Specifieke *T. pallidum* antistoffen

- indirecte microagglutinatie testen waar de specifieke antigenen gebonden zijn op rode bloedcellen of andere dragers zoals gekleurde gelatine partikels
- indirecte immunofluorescentie testen voor IgG en/ of IgM antistoffen
- immuno enzymatische testen voor het opsporen van IgG antistoffen en in mindere mate IgM antistoffen
- blot of LIA (Line Immuno Assays) testen voor het opsporen van IgG of IgM antistoffen (vooral gebruikt als confirmatietest)

3. Polymerase Chain Reaction (PCR) voor opsporen van *T. pallidum* DNA (wordt op dit ogenblik gebruikt als confirmatietest).

Voor het opsporen van antistoffen is een zeer groot gamma syfilistesten op de markt en we merken dat ook aan de reagentia die door de verschillende laboratoria gebruikt worden (zie tabel 6.1.3.)

In de USA gebruikt men vooral de VDRL of RPR als screening test voor de syfilis. In Europa sporen we vooral de specifieke antistoffen op (TPHA, TPPA, FTA, EIA) of screenen we met beide methoden zoals blijkt uit deze enquête.

In de groep van screening testen zijn de laatste tijd heel wat EIAs op de markt gekomen. Deze methoden hebben als voordeel dat een grote verscheidenheid aan antigenen (totaalextracten, gezuiverde fracties, recombinant antigenen, synthetische peptiden) aan de plastic drager kunnen gebonden worden. Ook kan men zoals bij immunofluorescentie een specifiek IgM of IgG conjugaat gebruiken.

Tabel 6.1.3. toont dat in deze enquête 6% van de analyses uitgevoerd werden met een EIA methode.

6.1.5.2. Interpretatie van het resultaat

De performantie van een test hangt natuurlijk af van de gevoeligheid, specificiteit en de predictieve waarden. Op zijn beurt zijn de predictieve waarden gekoppeld aan de prevalentie van de ziekte in de onderzochte populatie.

Tabel 2 geeft een literatuur overzicht van de gevoeligheid van verschillende serologische testen.

Tabel 6.1.5.2. Gevoeligheid van serologische testen in niet behandelde syfilis.

Serologische test	Gevoeligheid % per stadium			
	S1	S2	S3	S4
VDRL	75	100	95	71
RPR	83	100	98	73
FTA-ABS	84	100	100	96
TPHA-TP	76	100	97	94
TPHA-TP ELISA-TP				

S1 primair stadium S2 secundair stadium
S3 latent stadium S4 laat stadium

Indien de syfilis correct wordt behandeld, zal de VDRL of RPR negatief worden na maximum 1 jaar. 80% van de specifieke testen blijven levenslang een positief resultaat geven.

In de huidige enquête kunnen we stellen dat in het ongunstigste geval 8 vals positieve resultaten (1,9%) werden bekomen op een totaal van 424 analyses.

Er is een algemene consensus dat onafhankelijk van de gebruikte screening methode een positief resultaat best geconfirmeerd wordt. Immers vals positieve resultaten worden beschreven bij aandoeningen zoals auto-immuun ziekten, borreliose, HIV, maligniteit, chronische leverziekten, malaria, zwangerschap, ...

Op dit ogenblik zijn reeds enkele blot- en LIA testen in de literatuur gunstig geëvalueerd. Deze testen maken dikwijls gebruik van recombinant antigenen en synthetisch peptiden.

Alhoewel een negatief serumstaal werd rondgestuurd in deze enquête, hebben toch enkele laboratoria confirmatietesten uitgevoerd.

De FTA-abs werd ook lange tijd aanvaard als een confirmatietest maar met de opkomst van Lyme werden vals positieve FTA-abs vastgesteld. In ons labo vonden we in een reeks van 25 positieve Lyme sera tot 20% vals positieve FTA-abs resultaten. De TPHA-TP was negatief.

T. Vervoort, Instituut voor Tropische Geneeskunde, Antwerpen

REFERENTIES

1. A.Ebel et al. Validation of the INNO-LIA *syphilis* kit as a confirmatory assay for *Treponema pallidum* antibodies. *J-Clin-Microbiol.* 2000 Jan; 38(1) : 215-9
2. H.Liu et al. New tests for *syphilis*: rational design of a PCR method for detection of *Treponema pallidum* in clinical specimens using unique regions of the DNA polymerase I gene. *J-Clin-Microbiol.* 2001 May; 39(5) : 1941-6
3. J.L.Backhouse and S.I.Nesteroff *Treponema pallidum* western blot: comparison with the FTA-ABS test as a confirmatory test for *syphilis*. *Diagn-Microbiol-Infect-Dis.* 2001 Jan; 39(1) : 9-14
4. S.A.Larsen and W.E.Morrill. 1998. *Syphilis* in Clinical Diagnostic Immunology. Protocols in Quality Assurance and Standardisation p.353-361 ed. by R.M.Nakamura et al. Blackwell Science, London
5. M.L.Turgcon. 1996 *Syphilis* Immunology and Serology in Laboratory Medicine. P.197-214 Second Edition, Masby-Year Book St.Louis
6. B.L.Schmidt et al. Comparative evaluation of nine different enzyme-linked immunosorbent assays for determination of antibodies against *Treponema pallidum* in patients with primary *syphilis*. *J-Clin-Microbiol.* 2000 Mar; 38(3): 1279-82

6.2. ASLO

6.2.1. Beschrijving van de monsters

Er werd één monster opgestuurd: S/ 2102 waarop zowel anti Syfilis-antistoffen als ASLO bepaald moesten worden.

Het staal was vergezeld van volgende klinische inlichtingen:
Een patiënt meldt zich bij zijn arts met rash en koorts.

6.2.2. De deelnemers

In het totaal namen 206 laboratoria deel aan deze enquête. Twee laboratoria voerden 2 bepalingen uit: er werden dus 208 bepalingen uitgevoerd.

6.2.3. Gebruikte reagentia

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

Fabrikant	Kit	Aantal
ABX Diagnostics	ASO	1
APTEC Diagnostics	Anti Streptolysine O Reagent	9
Beckman	Array ASO	15
	Image ASO	6
	Synchron Anti-streptolysine O	5
	Niet gepreciseerd	3
Biokit	Quantex ASO Plus	3
bioMérieux	ASL-kit	2
	ASL-slidex	1
Dade Behring	Antistreptolysin O Serum Standardized	1
	Cellognost ASL Micro	1
	N Latex ASL	26
	Rapitex ASL	5
	Rapitex ASL Combipack 150	1
	Streptolysin O Reagent Reduced	4
	Turbiquant ASL	3
	Niet gepreciseerd	1
Fujirebio	Serodia ASO	12
Olympus	System Reagent Anti Streptolysin O	3
Omega	Avitex ASO	1
Roche	Cobas Integra 100 Tinaquant ASLO	1
	Cobas Integra 400 Tinaquant ASLO	14
	Cobas Integra 700 Tinaquant ASLO	5
	Cobas Integra 800 Tinaquant ASLO	15
	Cobas Integra Tinaquant ASLO ¹	1
	Hitachi 911 Tinaquant ASLO	2
	Hitachi 912 Tinaquant ASLO	8
	Hitachi 917 Tinaquant ASLO	13
	Modular Tinaquant ASLO	13
	Tinaquant ASLO ²	32
	Niet gepreciseerd	Niet gepreciseerd
Totaal		208

¹ Eén deelnemer vermeldde Cobas Integra zonder verdere typering.

² Meerdere deelnemers vermeldden het gebruik van Tinaquant ASLO zonder vermelding van het toestel (Tinaquant ASLO kan gebruikt worden op alle toestellen van de firma Roche) of met de vermelding dat de kit gebruikt wordt op een toestel van een andere firma.

6.2.4. Resultaten

De volgende tabel geeft de resultaten weer :

Resultaat	Aantal
Negatief	201
Borderline	1
Positief	3
Geen antwoord	1
Totaal	206

Niet alle deelnemers vermeldden de kwantitatieve resultaten; in een aantal gevallen wordt het resultaat uitgedrukt als kleiner dan de cut-off waarde.

Voor de 2 meest gebruikte methoden, waarbij de kwantitatieve resultaten door een groot aantal deelnemers vermeld werden, werden de mediaan, minimum en maximum bepaald.

Methoden	Aantal deelnemers met vermelding kwantitatief resultaat	Mediaan	Minimum	Maximum
N Latex ASL (Dade Behring)	21	53	46	101
Tinaquant ASLO (Roche); alle toestellen	96	46	31,4	77

De laboratoria met een afwijkend of geen antwoord vermeldden allen het kwantitatieve resultaat.

De laboratoria met als antwoord "positief" bekwamen volgende resultaten:

- 36 U/ml (Cobas Integra 400)
- 38 U/ml (Cobas Integra 800)
- 68 U/ml (N Latex ASL)

Het laboratorium met als antwoord "borderline" bekam als resultaat 41 U/ml met de Quantex ASO Plus methode (Biokit) (de overige 2 gebruikers van deze methode, die "negatief" antwoordden, bekamen respectievelijk < 50 en 56 U/ml).

Het laboratorium dat geen besluit gaf, bekam als resultaat 40 U/ml (Tinaquant ASLO)

6.2.5 Commentaar op de resultaten van het onderzoek

6.2.5.1. Introductie

Streptococcus pyogenes (bèta hemolytische streptokok van de groep A) veroorzaakt een aantal veel voorkomende infecties waaronder de meest frequente faryngitis en huid infecties zijn. Het acut gewrichtsreuma en glomerulonefritis zijn niet suppuratieve verwickelingen die kunnen ontstaan na een streptokokken infectie van groep A. Deze twee types van verwickelingen treden verschillende weken na het acut infectieus proces op en zijn waarschijnlijk auto-immuun van oorsprong; de gastheer ontwikkelt antistoffen tegen bepaalde componenten van de streptokokken; die antilichamen zullen dan kruisreageren met het normaal gastheer weefsel.

Diagnose van acute infecties gebeurt steeds via een klassieke kweek, of via een antige detectie test. Serologische bepalingen hebben geen enkele zin in de diagnostiek van acute streptokokken infecties. Het routinematig testen van patiënten met faryngitis op anti streptokokken antistoffen heeft bovendien geen enkele prognostische waarde.

Diagnose van niet suppuratieve verwickelingen berust op een aantal klinische criteria in associatie met een bewijs van een doorgemaakte streptokokken infectie. Dit bewijs van een doorgemaakte streptokokken infectie kan zowel een positieve kweek of antige test zijn, of een serologisch bewijs van een streptokokken infectie. Gezien dergelijke verwickelingen weken tot maanden na een acute infectie optreden, wordt meestal een beroep gedaan op de serologie om een bewijs van groep A streptokokken infectie te leveren. De interpretatie van deze testen is vaak moeilijk; enerzijds vanwege het bestaan van gezonde dragers, anderzijds vanwege een mogelijke ASLO-positiviteit in geval van infecties door bèta hemolytische streptokokken van de groep C.

Het is dus duidelijk dat een serologie voor streptokokken eerder een zeldzaamheid zou moeten zijn in de klinische laboratoria. Er wordt echter nog al te vaak routinematig gebruik (misbruik) gemaakt van deze serologie. Door overmatig gebruik van deze test werd reeds overwogen om deze test uit de RIZIV nomenclatuur te lichten. Totnogtoe is dit niet gebeurd maar de mogelijkheid blijft bestaan dat dit alsnog zal gebeuren.

Infectie met groep A streptokokken wekt een immunologische respons op tegen verschillende streptokokken antigenen: anti-streptolysine O (ASLO), anti-deoxyribonuclease B (ADNase B) en anti-hyaluronidase (AH).

Drie weken na een streptokokken faryngitis zullen ongeveer 80% van de niet behandelde kinderen een stijging vertonen van ASLO of ADNase B. Wanneer antistoffen tegen meerdere antigenen worden getest stijgt de gevoeligheid van de detectie tot 95%. Na huidinfecties is de immunitaire respons op streptolysine O minder goed; andere antigenen (DNase B; hyaluronidase) verwekken een betere respons.

Antibiotherapie gegeven in de vroege fase van een acute infectie kan de antilichaamrespons onderdrukken.

De test die het frequentst gebruikt wordt om antistoffen tegen groep A streptokokken op te sporen is de antistreptolysine O test. In deze test meten we de antistoffen tegen het streptolysine O (een specifiek streptokokken enzym dat RBC lyseert). De test bepaalt in welke mate het serum van de patiënt de lyse van RBC kan inhiberen. Voor de diagnostiek zullen we dus nagaan of er een stijgende of een verhoogde titer in ASLO antistoffen aanwezig is.

6.2.5.2. **Commentaren op de bekomen resultaten**

Het staal dat werd opgestuurd bevatte geen noemenswaardige titer in ASLO. Aan de hand van de gevonden waarden kon onmogelijk de diagnose van vroeger doorgemaakte streptokokken infectie worden gegeven. De resultaten die verstrekt werden door de labo's lagen allemaal in dezelfde range. De correcte interpretatie van de serologie zou dan ook moeten zijn: titer niet suggestief voor recent doorgemaakte streptokokken infectie.

Deze mogelijkheid werd echter niet voorzien in de antwoorden en de meeste laboratoria hebben de test als negatief geïnterpreteerd.

1 labo vertaalde het antwoord naar borderline en 3 andere naar positief. Gezien de waarden van deze 4 labo's in dezelfde range lagen als de andere labo's die negatief hebben geantwoord, is er hier geen sprake van verkeerde techniek of analyse, maar eerder een andere interpretatie. Andere antwoordopties hadden deze verschillen waarschijnlijk voorkomen.

A. Naessens, AZ VUB, Jette