

WIV  
J. Wytsmanstraat, 14  
B-1050 BRUSSEL

FEDERALE OVERHEIDSDIENST, VOLKSGEZONDHEID, VEILIGHEID VAN DE  
VOEDSELKETEN EN LEEFMILIEU  
COMMISSIE VOOR KLINISCHE BIOLOGIE

DIENST LABORATORIA VOOR KLINISCHE BIOLOGIE  
COMITES VAN DESKUNDIGEN

## Globaal Rapport

### Externe Kwaliteitsevaluatie voor Analyses Klinische Biologie

### Microbiologie/Serologie/Parasitologie

ENQUETE 01/2007

#### Microbiologie

*Clostridium difficile*, toxine positief  
Staal negatief op *Clostridium difficile*  
*Clostridium non-difficile* (*C. perfringens*), toxine negatief  
*Bacteroides fragilis*  
*Escherichia coli*

#### Parasitologie

*Giardia lamblia*  
*Entamoeba histolytica*  
Negatief staal

#### Serologie

Borrelia  
Rubella

**Alle rapporten zijn tevens te raadplegen op onze website :**

[http://www.iph.fgov.be/ClinBiol/bckb33/activities/external\\_quality/rapports/\\_nl/rapports\\_annee.htm](http://www.iph.fgov.be/ClinBiol/bckb33/activities/external_quality/rapports/_nl/rapports_annee.htm)

## COMITE VAN EXPERTEN VOOR MICROBIOLOGIE/SEROLOGIE

WIV (secretariaat) : 02/642.55.22 - FAX : 02/642.56.45  
(Dr. K. Vernelen) : 02/642.55.29 – FAX : 02/642.56.45  
(Coördinator) : e-mail : kris.vernelen@iph.fgov.be  
Dr. BODEUS Monique : 02/764.67.31 - FAX : 02/764.69.33  
: e-mail : bodeus@mblg.ucl.ac.be  
Dr. CLAEYS Geert : 09/240.36.45 – FAX : 09/240.36.59  
: e-mail : geert.claeys@ugent.be  
Dr. DE BEENHOUWER Hans : 053/72.42.72 – FAX : 053/72.45.88  
: e-mail : hans.de.beenhouwer@olvz-aalst.be  
Dr. DE GHELDRE Yves : 02/340.41.34 – FAX : 02/340.41.79  
: e-mail : yves.degheldre@chirec.be  
Dr. DEDISTE Anne : 02/535.45.42  
: 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. HAYETTE Marie-Pierre : 043/66.24.54 – FAX : 043/66.24.40  
: e-mail : mphayette@chu.ulg.ac.be  
Dr. LAGROU Katrien : 016/34.70.98 – FAX : 016/34.79.31  
: e-mail : katrien.lagrou@uz.kuleuven.ac.be  
Apr. LONTIE Marc : 016/31.01.72 – FAX : 016/31.01.88  
: e-mail : marc.lontie@mchlvwo.be  
Dr. LUYASU Victor : 010/43.73.30 - FAX : 010/43.71.88  
: e-mail : victor.luyasu@skynet.be  
Dr. MAGERMAN Koen : 011/30.97.40 – FAX : 011/30.97.50  
: e-mail : koen.magerman@virgajesse.be  
Dr. NAESSENS Anne : 02/477.50.02 – FAX : 02/477.50.15  
: e-mail : anne.naessens@uzbrussel.be  
Dr. PIERARD Denis : 02/477.50.02 – FAX : 02/477.50.15  
: e-mail : denis.pierard@uzbrussel.be  
Dr. REYNDERS Marijke : 02/535.45.35 – FAX : 02/535.46.56  
: e-mail : marijke\_reynders@stpierre-bru.be  
Dr. VAN ESBROECK Marjan : 03/247.64.37 – FAX : 03/247.64.40  
: e-mail : mvesbroeck@itg.be  
Dr. VERHAEGEN Jan : 016/34.70.73 – FAX : 016/34.79.31  
: e-mail : jan.verhaegen@uz.kuleuven.ac.be  
Dr. WOESTYN Sophie : 056/85.58.85 – FAX : 056/85.58.86  
: e-mail : sophie.woestyn@skynet.be

## I. ALGEMENE BEMERKINGEN

Voor de 1<sup>e</sup> evaluatie van het jaar 2007 (enquête 2007/1) werd volgend materiaal verzonden op 15 januari 2007.

- 1.1. 3 klinische en 2 gelyofiliseerde monsters voor identificatie.  
Voor 2 monsters werden de resultaten van de gevoeligheidstesten gevraagd.
- 1.2. Twee geformaliseerde fecesstalen voor parasitologisch onderzoek.
- 1.3. Twee plasmamonsters voor de bepaling van Borrelia en Rubella.

### AANTAL DEELNEMERS

Het aantal evalueerbare antwoordbulletins bedroeg :

1.	Voor identificatie en antibiogram	: 182
2.	Voor parasitologie	: 180
3.	Voor de serologie	:
	Borrelia	: 140
	Rubella	: 171

Wij danken Marc Lontie en Michel Delmée voor het ter beschikking stellen van de foto's in dit globaal rapport.

**2.1. Cultuur M/7103, M/7104 en M/7274** *Clostridium difficile* (toxine positief,) *Clostridium non-difficile* (*perfringens*) en staal negatief op *Clostridium difficile*

*C. difficile* is sinds 1977 gekend als causaal agens voor pseudomembraneuse colitis (PMC), een ernstige pathologie die optreedt in het kader van antibioticatherapie. We weten momenteel dat dit veruit de voornaamste etiologie is van antibiotic-associated diarrhoea (AAD). Het is de eerste oorzaak van diarree optredend tijdens hospitalisatie.

**Algemene kenmerken**

*C. difficile* is een Gram-positieve, anaërobe sporulerende bacil. De sporen zijn ovaal, subterminaal (zelden terminaal), en vervormend. Onder anaërobie, groeit hij gemakkelijk op een Brain Heart Infusion agar waaraan 5% paardenbloed is toegevoegd. De kolonies hebben een grootte van 2 à 4 mm na 24 incubatie en kunnen 8 à 12 mm bereiken na 48 h. Ze zijn grijs, mat, opaak en fluorescerend onder UV-licht. Hun omtrek is onregelmatig. Bij onderzoek met een binoculaire loep, vertonen ze een karakteristiek «gebroken glas» aspect. De bacteriën hebben slechts een korte levensduur op agarbodems (in aanwezigheid van O<sub>2</sub>).

*C. difficile* groeit gemakkelijk op een vloeibare thioglycolaatbodem of een thioglycolaatbodem met 3 promille agar. Na 72 h incubatie op deze bodem is de sporulatie maximaal. In een hermetisch gesloten tube kan een stam onder deze omstandigheden gedurende jaren bij kamertemperatuur bewaard worden. Het kiemen van de sporen kan ingeleid worden door taurocholaat of natriumcholaat 0,1 %.

*C. difficile* bevat geen protease, fosfolipase C of lipase. Alle stammen vergisten glucose en mannitol; ze vergisten geen galactose, arabinose, xylose, mannose, maltose, rhamnose, raffinose of lactose. De belangrijkste geproduceerde vluchtige zuren zijn azijnzuur, isoboterzuur, boterzuur, isovaleriaanzuur, valeriaanzuur en isocapronzuur.

De toxinogene stammen produceren twee toxines (toxine A of enterotoxine, toxine B of cytotoxine), die darmlaesies veroorzaken. Een derde toxine, «binary toxine» genaamd, wordt geproduceerd door sommige stammen. Zijn precieze rol is nog onvoldoende gekend maar recente observaties opperen de mogelijkheid dat er een verband bestaat tussen de aanwezigheid van dit toxine en de ernst van de diarree (Barbut *et al.*, 2005).

**Habitat, pathologie**

Bij de mens wordt *C. difficile* teruggevonden in de stoelgang van pasgeborenen met een frequentie tot 70% (Delmée *et al.*, 1988). Dit percentage vermindert gestaag gedurende de eerste levensmaanden, om omstreeks het tweede levensjaar de frequentie te bereiken die wordt aangetroffen in een volwassen populatie, die wordt geschat op 1 à 3%. *C. difficile* wordt eveneens teruggevonden in de darmen van talrijke dieren.

*C. difficile* is het causale agens van PMC, een acute pathologie die de mucosa van het colon en rectum aantast en gekarakteriseerd wordt door een uitgesproken inflammatoir infiltraat en door de aanwezigheid van fibrineuse pseudomembranen die adhereren aan de mucosa. De diarree is het voornaamste symptoom: deze is meestal waterig of muceus, zelden hemorragisch. *C. difficile* en de toxines die hij produceert worden in nagenoeg 100 % van de gevallen van PMC terug gevonden. Hun etiopathogene rol werd duidelijk aangetoond.

*C. difficile* is eveneens verantwoordelijk voor de antibiotic-associated diarrhoea (AAD) waar bij rectoscopie in plaats van de typische lesies van PMC eerder de tekenen van specifieke colitis aangetroffen worden. Het is momenteel duidelijk bewezen dat *C. difficile* een aanzienlijk aantal van de gevallen van AAD veroorzaakt, waarvan de symptomatologie minder uitgesproken is dan deze van PMC.

In de ambulante praktijk is de incidentie moeilijk te evalueren. Een Australische studie heeft nochtans aangetoond dat 10% van de stoelgangstalen die door huisartsen naar het laboratorium verstuurd werden, positief was wanneer er een voorgeschiedenis van recent antibioticagebruik was (Riley *et al.*, 1995).

De situatie bij pasgeborenen en kleine kinderen verschilt volledig van deze bij volwassenen. In vele gevallen waar *C. difficile* geïsoleerd wordt, betreft het niet-toxinogene stammen, wat de afwezigheid van symptomen verklaart. Nochtans bestaat het dragerschap van toxinogene stammen en we kunnen bij asymptomatische kinderen concentraties van toxine B terugvinden die gelijk zijn aan deze aangetroffen bij volwassenen met colitis. Er is bewezen dat sommige stammen die bij asymptomatische kinderen geïsoleerd werden, enkel toxine B produceren en niet toxine A, wat de afwezigheid van pathogeniciteit zou kunnen verklaren. Anderzijds werden gevallen van PMC en AAD gerapporteerd bij zeer jonge kinderen. Ze zijn dus niet helemaal ongevoelig voor dergelijke aandoeningen. Deze vaststellingen leiden er toe dat men de grootst mogelijke voorzichtigheid moet in acht nemen bij het interpreteren van resultaten die bij kleine kinderen bekomen worden.

### Fysiopathologie

De infecties die door *C. difficile* veroorzaakt worden treden slechts op na een reeks van gebeurtenissen die geschematiseerd worden in figuur 2.1.1.

1. Het proces wordt in gang gezet door een verstoring van de intestinale flora; deze situatie komt voor na het gebruik van antibiotica of is aanwezig bij pasgeborenen en kleine kinderen waar de flora nog gevormd moet worden. Bij volwassenen treden meer dan 98% van de gevallen op na antibioticatherapie maar de ziekte kan ook voorkomen na gebruik van chemotherapie bij tumoren. Spontane casussen zijn zeldzaam. Een persoon met een normale intestinale commensale flora is afdoende beschermd.
2. De besmetting met *C. difficile* kan van endogene of exogene oorsprong zijn. Het is zeer moeilijk om het asymptomatische dragerschap van *C. difficile* bij volwassenen te schatten omdat men over onvoldoende stalen beschikt. Zoals hierboven echter reeds vermeld, blijkt uit studies dat het dragerschap echter zeer gering is: 0 à 3%. Endogene besmetting is dus zeldzaam. Het is daartegen bewezen dat patiënten die aan *C. difficile* diarree leiden, zeer snel hun omgeving besmetten met sporen die een belangrijke exogene besmettingsbron vormen. Dit komt vooral voor in een ziekenhuismilieu waar vele gegroepeerde casussen of epidemieën vastgesteld worden. Het bevorderende effect van de antibioticatherapie wordt verklaard door de belangrijke wijziging in de intestinale flora die dit veroorzaakt terwijl de sporen van *C. difficile* resistent zijn aan alle antibiotica. Deze sporen doorlopen de vegetatieve cyclus en koloniseren de darm zodra de antibiotische druk vermindert.
3. De pathogeniciteit van *C. difficile* is te wijten aan de productie van 2 toxines, A en B (cfr. infra). Het spectrum van symptomatologieën is zeer uitgebreid, gaande van aan het ene uiterste, de ernstige gevallen van PMC die soms vergezeld zijn van een

toxische shock, tot het andere, met name banale diarree en asymptomatisch dragerschap. Dit laatste wordt vooral aangetroffen bij pasgeborenen en kleine kinderen terwijl oudere patiënten voornamelijk de ernstige vormen vertonen. Immuniteit laat toe om ten dele de verschillen in ernst te verklaren. Circulerende IgG antistoffen en IgA die in de darm gesecreteerd worden zijn beduidend minder hoog bij patiënten met een ernstige colitis of een relaps dan bij patiënten met een banale niet-recidiverende diarree (Warny *et al.*, 1994, Kyne *et al.*, 2000, Kyne *et al.*, 2001). Sommige *C. difficile* stammen, vooral bij de kleine kinderen, produceren geen toxines: de patiënten blijven dan ook asymptomatisch.

### Risicofactoren

Risicofactoren zijn ofwel gebonden aan de aard en de duur van de antibioticatherapie, ofwel aan de gastheer. Bignardi maakte een interessante meta-analyse van deze factoren (Bignardi, 1998).

Er zijn slechts weinig antibiotica die niet gerapporteerd zijn als occasionele oorzaak van *C. difficile* diarree. Bij dieren zijn de antibiotica die de darmflora sterk verstoren, zoals clindamycine en cefoxitine, de belangrijkste inductoren van de pathologie (Delmée et Avesani, 1990). Bij de mens nemen de  $\beta$ -lactams (amoxicilline/ampicilline, amoxicilline-clavulaanzuur), de cefalosporines, clindamycine en lincomycine de eerste plaatsen in. In recent in Canada en de VS beschreven epidemieën vormden de fluorochinolones de voornaamste risicofactor (Pepin *et al.*, 2005). De betrokken stammen hadden zeer hoge MIC-waarden voor de chinolones. Het is de duur van de behandeling die de frequentie van AAD significant beïnvloedt en niet de totale dosis of de toedieningswijze.

Andere risicofactoren hebben betrekking op de gastheer. De frequentiecurve van AAD naargelang de leeftijd toont verhoogde frequenties op zeer jonge en op oudere leeftijd (< 6 jaar en > 65 jaar). De ernst van een onderliggende ziekte, chronische spijsverteringsstoornissen, immunosuppressie, en meer bepaald AIDS, antecedenten van AAD en de duur van de hospitalisatie zijn significante risicofactoren. Het geslacht, de dosis en toedieningswijze van de antibiotica en chronische inflammatoire darmziekten zijn daarentegen geen risicofactoren.

Gegroepeerde casussen en epidemieën zijn frequent in een ziekenhuismilieu, voornamelijk in de eenheden waar de patiënten langdurig verblijven (meer in het bijzonder orthopedische chirurgie), ouder zijn en profylactisch of curatief antibiotica krijgen. *C. difficile* besmet zeer snel de kamer van de patiënt en de sporen kunnen meerdere weken in de omgeving aanwezig blijven.

### Virulentiefactoren

Er bestaan stammen die geen van beide toxines produceren: deze zijn niet pathogeen. Stammen die enkel het toxine B produceren, werden eveneens beschreven en kunnen verantwoordelijk zijn voor epidemieën. In onze ervaring, zijn deze stammen zeldzaam (<1%) maar het Britse referentiecentrum heeft 3% gevonden van de stammen die hen toegestuurd worden (Brazier 1998).

In 2004, hebben meerdere publicaties (Pépin *et al.*, 2004) een belangrijke en significante verhoging van de incidentie van AAD in Canada vermeld (Valiquette *et al.*, 2004 en Pepin *et al.*, 2004). De incidentie van CDD (*C. difficile* geassocieerde diarree) steeg er van 35 naar 156 per 100.000. Belangrijker nog is dat de ernst van deze casussen toenam en

sommige cijfers wijzen op een toename van de mortaliteit van gemiddeld 4% naar 13% met pieken tot 30% bij de oudste patiënten.

In 2005, hebben Warny en medewerkers de karakteristieken van de epidemische Canadese stammen beschreven: ze produceren grotere hoeveelheden toxine A en B dan gewoonlijk en ze secreteren een derde toxine dat CDT of « binary toxin » genoemd wordt en waarvan de rol onbekend is. Bovendien zijn ze resistent tegen vele antibiotica, en meer bepaald de fluorochinolones (Warny *et al.*, 2005). Ze behoren allen tot hetzelfde ribotype O27. Er werd eveneens een deletie in een regulatorgen van de toxineproductie aangetoond: identieke stammen werden sindsdien geïsoleerd in Engeland, Nederland en België (van Steenberghe *et al.*, 2005 ; Joseph *et al.*, 2005 ; Smith A., 2005)

Uit recente gegevens van het referentiecentrum blijkt dat stammen van ribotype O27 verspreid zijn in alle Belgische regio's.

### **Microbiologische diagnose**

De diagnose van *C. difficile* infecties berust op de isolatie van de kiem en de detectie van de toxines (Delmée M. 2001).

### **Isolatie van *C. difficile* in de stoelgang**

George en medewerkers (George *et al.*, 1979) hebben een selectief milieu beschreven, CCFA (Cycloserine Cefoxitine Fructose Agar). Dit is de bodem die het meest gebruikt wordt. Hij laat de isolatie toe van *C. difficile* van zodra er een minimum van  $2 \cdot 10^3$  organismen op een totaal  $6 \cdot 10^{10}$  bacteriën per gram (droog gewicht) fecaal materiaal aanwezig is. Deze samenstelling wordt in de meeste commerciële milieus gebruikt. Nochtans wordt het 10% paardenbloed soms vervangen door eigeel; dit wijzigt enkel het uitzicht van de kolonies maar niet de gevoeligheid van de bodem.

De toevoeging van natrium taurocholaat (1 g/L) verhoogt sterk de gevoeligheid van de bodem daar dit het kiemen van de sporen bevordert. Het natriumzout van cholinezuur heeft dezelfde performanties maar is goedkoper. De voorbehandeling van de stoelgang met alcoholshock (gelijke volumes ethanol en stoelgang die gedurende 1 uur voor het enten gemengd worden) laat eveneens toe om de gevoeligheid te verhogen.

De stoelgang wordt onmiddellijk geënt zonder voorafgaande verdunning en de platen worden onder anaerobiose geïncubeerd gedurende minimum 36 uur. Het is aangeraden de stalen snel na ontvangst te enten, hoewel de gesporuleerde vormen in de stoelgang bijna onbeperkt persisteren, zelfs bij kamertemperatuur. De kolonies van *C. difficile* op vaste bodems zijn zeer fragiel en de overenting moet binnen het halfuur na openen van de pot gebeuren.

### **Identificatie van *C. difficile***

De kolonies van *C. difficile* zijn gemakkelijk herkenbaar op CCFA. Op CCFA die eigeel bevat vertonen de kolonies een goudgeel aspect bij openen van de pot; ze zijn mat, onregelmatig en hebben een diameter van 2 à 12 mm ; ze hebben de neiging verder te lopen dan de entingszone. De karakteristieke « gebroken glas » structuur en goudachtige reflectie zijn met de binoculaire loep het best zichtbaar bij doorlichting. Op CCFA met bloed, zijn de kolonies grijs en mat en hebben ze eveneens een karakteristieke structuur.

Een verdere identificatie kan gebeuren door middel van gaschromatografie van de vluchtige zuren die geproduceerd worden door het metabolisme van de kiem of op basis van biochemische kenmerken. De belangrijkste vluchtige zuren geproduceerd door *C. difficile* zijn azijnzuur, isoboterzuur, boterzuur, isovaleriaanzuur, valeriaanzuur en isocaproonzuur. Deze identificatietechniek is snel (ongeveer 20 minuten) en betrouwbaar. Het gebruik ervan is niet duur maar vereist wel de investering in een chromatograaf.

Tabel 2.1.1. geeft de voornaamste biochemische kenmerken van *C. difficile* weer die de identificatie via klassieke biochemische testen toelaten. Commerciële galerijen als API kunnen gebruikt worden maar de gevoeligheid van deze technieken is niet schitterend. Head en Ratnam hebben het percentage correcte identificaties berekend dat bereikt werd met volgende technieken: AN-Ident : 77,9 % ; Rap ID-Ana : 88,6 % ; Minitex Anaerobe II : 90,9 % ; API 20A : 95,5 % (Head & Ratnam, 1988).

Een enzymatische test voor de detectie van toxines op de kolonies is eveneens mogelijk maar deze zal uiteraard enkel de toxinogene stammen identificeren. Er werd eveneens voorgesteld de productie van proline aminopeptidase in combinatie met het typische aspect van de kolonies te gebruiken voor de identificatie (Fedorko 1997). De aanwezigheid van een glutamaat dehydrogenase (GDH) biedt ook een identificatie mogelijkheid (Barbut et al. 2000)

### **Detectie van de toxines in de stoelgang**

Het opsporen van het cytopathogeen effect van een stoelgangfiltraat werd lange tijd beschouwd als de referentietechniek; het belangrijkste voordeel van deze techniek is zijn goede gevoeligheid: 1 pg toxine B volstaat om het cytopathogeen effect te veroorzaken (Lyerly et al., 1988). De neutralisatie van dit effect door een antiserum laat toe om de specificiteit van de reactie te bewijzen. Een serum dat gericht is tegen de toxines van *C. difficile* of een *C. sordellii* antiserum worden door elkaar gebruikt: er is inderdaad een antigeenverwantschap tussen de cytotoxines die door deze beide species geproduceerd worden (Popoff, 1987).

Het voornaamste nadeel van deze techniek is dat het onderhoud van continue cellijnen noodzakelijk is, wat uitrusting (laminaire airflow) en dure manipulaties vereist. Sommige cellen worden nochtans klaar-voor-gebruik verkocht (Eurobio). Deze techniek is ook trager dan de immuno-enzymatische methoden. Het toxine B is cytotoxisch voor de meeste cellijnen. Het meest worden Vero, HeLa, en MRC-5 cellen gebruikt, waarbij de eerste het gevoeligst zijn.

De test wordt op volgende manier uitgevoerd: een stoelgangssuspensie in fysiologisch water (1/5) wordt gecentrifugeerd (3000 g) gedurende 20 min bij 4°C. Het supernatans wordt gefilterd over een steriliserende filter (0,22 µm). Twee tubes die een confluerende groei bevatten worden gebruikt: 0,2 mL van het stoelgangfiltraat wordt in elk van deze tubes aangebracht; in de 2<sup>e</sup> tube werd voorafgaand 0,2mL antitoxine antiserum aangebracht. Het cultuurmedium wordt ververs (1,5 mL Minimum Essential Medium (MEM) waaraan 10 % kalfserum werd toegevoegd). De tubes worden geïncubeerd op 37°C. De cellen worden met de microscoop bekeken (x 100) na 6 uren (indien mogelijk), na 1 nacht en na 2 nachten incubatie. Het cytopathogeen effect uit zich door het uitrekken, het loslaten en de toename van het straalbrekend vermogen van de cellen, snel gevolgd door een volledige « globulatie » ervan. Dit cytopathogeen effect wordt geneutraliseerd door het antitoxine. De test kan ook uitgevoerd worden op microplaten waarbij eventueel seriële verdunningen van het filtraat gebruikt kunnen worden.



## Antigene detectie van de toxines in de stoelgang

Geurende de laatste 10 jaren werden meerdere immuno-enzymatische technieken (ELISA) op de markt gebracht. Sommigen gebruiken monoclonale antistoffen gericht tegen het toxine A; de recentere zijn ontworpen om zowel toxine A als B te detecteren. Deze laatste kits werden ontworpen omdat men recent stammen ontdekt heeft die enkel het toxine B produceren. Sommige kits worden aangeboden onder vorm van microtiterplaten met 96 wells, andere onder de vorm van individuele testen, die toelaten om snel een resultaat te bekomen (ongeveer 20 tot 30 minuten).

De nieuwe generatie ELISA testen biedt een duidelijke verbetering van de resultaten met een gevoeligheid die groter is dan deze van de cytotoxiciteitstesten (Van den berg *et al.*, 2005).

Tabel 2.1.2. geeft het algoritme weer dat aanbevolen wordt voor de diagnose van *C. difficile* infecties (Delmée *et al.*, 2005). Cultuur en detectie van toxines (via cytotoxiciteitstest of ELISA) moeten steeds samen uitgevoerd worden. Als beide testen negatief zijn kan de diagnose van *C. difficile* diarree uitgesloten worden. Als beide positief zijn, is de diagnose bewezen, wordt de therapie ingesteld en worden preventiemaatregelen toegepast in de kamer van de patiënt.

Als de cultuur positief is en het opsporen van de toxines negatief, moet een directe ELISA uitgevoerd worden op meerdere kolonies. Op deze wijze kan men vaststellen of de stam toxigeen is of niet. Als deze testen negatief zijn, is er geen behandeling nodig. Zijn de testen positief, dan is de betrokkenheid van *C. difficile* zeer waarschijnlijk en worden behandeling en preventiemaatregelen ingesteld.

In zeldzame gevallen is de cultuur negatief en de detectie van toxines positief (0.2% in onze ervaring). In deze gevallen wordt een controlestaal gevraagd en wordt de cultuur herhaald op een milieu dat taurocholaat bevat.

## Behandeling

In geval van AAD of PMC bestaat de eerste therapeutische behandeling in het stoppen van de oorzakelijke antibioticatherapie als deze nog bezig is en als dit geen gevaar vormt voor de patiënt. Dit kan in vele gevallen reeds volstaan, zeker bij jonge volwassenen.

Wanneer de symptomatologie of de algemene toestand van de patiënt het vereist, zijn er 2 antibiotische alternatieven mogelijk: vancomycine *per os* 125 à 500 mg, 3 à 4 maal per dag gedurende 5 tot 10 dagen of metronidazole 250 à 500 mg, 3 maal per dag gedurende 7 dagen. Metronidazole, dat een vergelijkbare efficiëntie en een lagere kostprijs heeft, is de laatste jaren de eerste keuze omdat men zoveel mogelijk het gebruik van vancomycine wil vermijden aangezien dit het ontstaan van glycopeptide-reistente enterokokken kan induceren.

Relapsen worden behandeld met dezelfde antibiotica als primo-infecties. Ondersteunende therapie waarbij polyvalente humane gamma-globulinen toegediend worden, bleken succesvol in geïsoleerde casussen (Warny *et al.* 1995 ; Wilcox *et al.*, 2004). Het toedienen van *S. boulardii* in een dosis van 1 g/d gedurende 4 weken is een nuttig hulpmiddel in de preventie van relapsen (McFarland *et al.* 1994).

## Preventie en controle.

De specifieke controlemaatregelen voor *C. difficile* zijn er op gericht om kruisbesmetting te voorkomen.

### 1. Contactmaatregelen

Het is duidelijk bewezen dat in geval van AAD de omgeving van de patiënt binnen de 24 uur besmet wordt met sporen die maanden persisteren ondanks een correcte reiniging.

Contactmaatregelen als isolatie in een individuele kamer of cohortorganisatie, handhygiëne en het dragen van handschoenen hebben hun nut bewezen in de beperking van de overdracht van *C. difficile* in de ziekenhuizen. Verschillende klinische studies hebben het nut van het dragen van handschoenen aangetoond.

Geen enkele van de bestanddelen (met inbegrip van alcohol, chlorhexidine, hexachlorofeen, iodoforen en triclosan) die gebruikt worden in de antiseptische zepen of de hydro-alcoholische oplossingen hebben een voldoende betrouwbaar sporicide effect tegen *Clostridium spp.* Het wassen van de handen met water en zeep (antiseptische of andere) helpt waarschijnlijk om de sporen te verwijderen van de handen omwille van de mechanische actie. Zorgverleners zouden er moeten op letten hun handen niet te besmetten en moeten daarom worden aangespoord om handschoenen te dragen bij het verzorgen van een patiënt met *C. difficile* diarree.

### 2. Reiniging en desinfectie van de omgeving

De directe omgeving van de patiënt speelt een belangrijke rol als secundair reservoir. Het dagelijks onderhoud met een desinfecterend product draagt op een efficiënte wijze bij aan de afname van de incidentie van nieuwe gevallen. Slechts 2 desinfectantia hebben hun efficiëntie bewezen in de vermindering van het aantal sporen van *C. difficile* in de kamers van geïnfecteerde patiënten (Hutin *et al.*, 1993 ; Mayfield *et al.*, 2000): javelwater in een verdunning die toelaat om ten minste 500ppm vrij chloor te bereiken en de associatie van aldehyden (0.04% formaldehyde et 0.03% glutaaraldehyde).

Een recente studie heeft het belang aangetoond van een ontsmetting met hypochloriet in vergelijking met het gebruik van detergenten voor het onderhoud van de omgeving, en zijn impact op de incidentie van infecties met *C. difficile*, de nadruk leggend op de kleine meerkost die het gebruik van een ontsmettingsmiddel heeft in vergelijking met de kost veroorzaakt door een nosocomiale diarree (Wilcox *et al.*, 2003).

Nieuwe ontsmettingstechnieken door verneveling van een ontsmettingsmiddel op basis van waterstofperoxide, doeltreffend in vitro op bacteriële sporen, kunnen misschien een oplossing betekenen voor het probleem. Enkele goed uitgevoerde studies zijn nog nodig maar we kunnen reeds met zekerheid bevestigen dat in deze specifieke context net zoals voor de rest van het onderhoud van het ziekenhuis, niets tegen diepgaande schoonmaak opkan.

Michel Delmée, UCL, Bruxelles

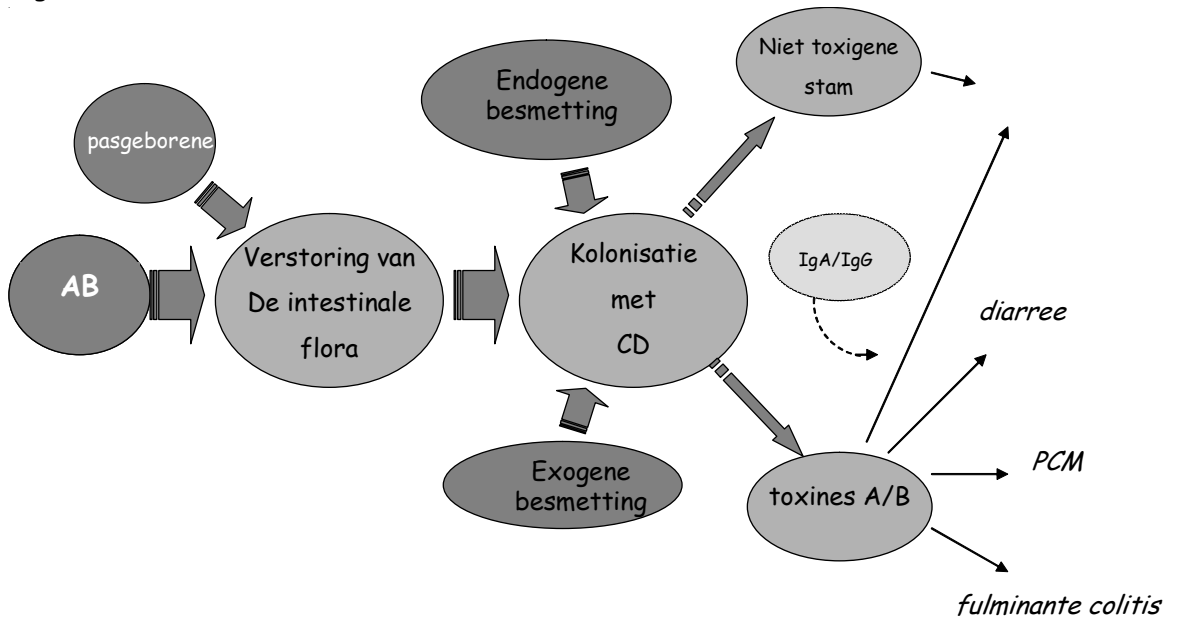
Tabel 2.1.1. Biochemische karakteristieken van *C. difficile*.

Lecithinase		-
Lipase		-
Hydrolyse van gelatine		variabel
Digestie van melk		-
Productie van indol		-
Vergisting:	glucose	+
	maltose	-
	lactose	-
	saccharose	-
	salicine	variabel
	sorbitol	variabel
	mannitol	+

Tabel 2.1.2. Algoritme voor de laboratoriumdiagnose van *C. difficile* diarree (CDD) op stoelgang

Cultuur	Toxine	Aan te nemen houding	Diagnose
+	+		CDD
+	-	Bepaal de in-vitro toxigeniciteit van de kolonies	
		<ul style="list-style-type: none"> <li>indien POSITIEF</li> <li>indien NEGATIEF</li> </ul>	CDD Dragerschap van niet-toxinogene stam
-	+	Herhaal de cultuur op een bodem die natrium taurocholaat bevat	
		<ul style="list-style-type: none"> <li>indien POSITIEF</li> <li>indien NEGATIEF</li> </ul>	CDD Onzekere diagnose (zeldzame gevallen)

Figuur 2.1.1.



Figuur 2.1.2. Macroscopisch aspect



Figuur 2.1.3. Microscopisch aspect



## REFERENTIES

1. Barbut, F., V. Lalande, G. Daprey, P. Cohen, N. Marle, B. Burghoffer, and J. C. Petit. 2000. Usefulness of simultaneous detection of toxin A and glutamate dehydrogenase for the diagnosis of *Clostridium difficile*-associated diseases. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 19:481-4.
2. Barbut, F., D. Decre, V. Lalande, B. Burghoffer, L. Noussair, A. Gigandon, F. Espinasse, L. Raskine, J. Robert, A. Mangeol, C. Branger, and J. C. Petit. 2005. Clinical features of *Clostridium difficile*-associated diarrhoea due to binary toxin (actin-specific ADP-ribosyltransferase)-producing strains. *J Med Microbiol* 54:181-185.
3. Bignardi, G. E. 1998. Risk factors for *Clostridium difficile* infection. *J. Hosp. Infect.* 40: 1-15.
4. Brazier JS. The epidemiology and typing of *Clostridium difficile*. *J Antimicrob Chemother* 1998; 41 suppl. C47-57.
5. Delmée, M., and V. Avesani. 1990. Virulence of ten serogroups of *Clostridium difficile* in hamsters. *J. Med. Microbiol.* 33: 85-90.
6. Delmée, M., G. Verellen, V. Avesani, and G. François. 1988. *Clostridium difficile* in neonates: serogrouping and epidemiology. *Eur. J. Pediatr.* 147: 36-40.
7. Delmee, M. 2001. Laboratory diagnosis of *Clostridium difficile* disease. *Clin Microbiol Infect* 7:411-6.
8. Delmee, M., J. Van Broeck, A. Simon, M. Janssens, and V. Avesani. 2005. Laboratory diagnosis of *Clostridium difficile*-associated diarrhoea: a plea for culture. *J Med Microbiol* 54:187-91.
9. Fedorko DP, Williams EC. 1997. Use of cycloserine-cefoxitin-fructose agar and L-proline-aminopeptidase (PRO Discs) in the rapid identification of *Clostridium difficile*. *J Clin Microbiol* 35: 1258-9.
10. George, W. L., V. L. Sutter, D. Citron, and S. M. Finegold. 1979. Selective and differential medium for isolation of *Clostridium difficile*. *J. Clin. Microbiol.* 9: 214-219.
11. Head, C. B., and S. Ratnam. 1988. Comparison of API ZYM System with API AN-Ident, API 20A, Minitex Anaerobe II, and RapID-ANA systems for identification of *Clostridium difficile*. *J. Clin. Microbiol.* 26: 144-146.
12. Hutin, Y., J. M. Molina, I. Casin, V. Daix, P. Sednaoui, Y. Welker, P. Lagrange, J. M. Decazes, and J. Modai. 1993. Risk factors for *Clostridium difficile*-associated diarrhoea in HIV-infected patients. *Aids* 7:1441-7.
13. Joseph, R., D. Demeyer, D. Vanrenterghem, R. van den Berg, E. Kuijper, M. Delmée. First isolation of *C. difficile* PCR ribotype 027, toxinotype III in Belgium. 2005. *Eurosurveillance weekly release* 10, is.42
14. Kyne, L., Warny M, Qamar A, Kelly CP. 2001. Association between antibody response to toxin A and protection against recurrent *Clostridium difficile* diarrhoea. *Lancet* 357: 189-93.
15. Kyne, L., Warny M, Qamar A, Kelly CP. 2000. Asymptomatic carriage of *Clostridium difficile* and serum levels of IgG antibody against toxin. *N Eng J Med* 342: 390-7.

16. Lyerly, D. M., L. M. Neville, D. T. Evans, J. Fill, S. Allen, W. Greene, R. Sautter, P. Hnatuck, D. J. Torpey, and R. Schwalbe. 1998. Multicenter evaluation of the *Clostridium difficile* TOX A/B TEST. *J Clin Microbiol* 36:184-90.
17. McFarland, L. V., C. M. Surawicz, R. N. Greenberg, R. Fekety, G. W. Elmer, K. A. Moyer, S. A. Melcher, K. E. Bowen, J. L. Cox, Z. Noorani, et al. 1994. A randomized placebo-controlled trial of *Saccharomyces boulardii* in combination with standard antibiotics for *Clostridium difficile* disease (published erratum appears in *JAMA* 1994 Aug 17; 272(7): 518). *JAMA* 271: 1913-1918.
18. Mayfield, J. L., T. Leet, J. Miller, and L. M. Mundy. 2000. Environmental control to reduce transmission of *Clostridium difficile*. *Clin Infect Dis* 31:995-1000.
19. Pepin, J., N. Saheb, M. A. Coulombe, M. E. Alary, M. P. Corriveau, S. Authier, M. Leblanc, G. Rivard, M. Bettez, V. Primeau, M. Nguyen, C. E. Jacob, and L. Lanthier. 2005. Emergence of fluoroquinolones as the predominant risk factor for *Clostridium difficile*-associated diarrhea: a cohort study during an epidemic in Quebec. *Clin Infect Dis* 41:1254-60.
20. Pepin, J., L. Valiquette, M. E. Alary, P. Villemure, A. Pelletier, K. Forget, K. Pepin, and D. Chouinard. 2004. *Clostridium difficile*-associated diarrhea in a region of Quebec from 1991 to 2003: a changing pattern of disease severity. *Cmaj* 171:466-72.
21. Popoff, M. R. 1987. Purification and characterization of *Clostridium sordelli* lethal toxin and crossreactivity with *Clostridium difficile* cytotoxin. *Infect. Immun.* 55: 35-43.
22. Riley, T. V., M. Cooper, B. Bell, and C. L. Gollledge. 1995. Community-acquired *Clostridium difficile*-associated diarrhea. *Clin. Infect. Dis.* 20 Suppl 2: S263-S265.
23. Smith A. 2005. Outbreak of *Clostridium difficile* infection in an English hospital linked to hypertoxin-producing strains in Canada and the US. *Eurosurveillance* 10 (6) : 050630
24. Valiquette, L., D. E. Low, J. Pepin, and A. McGeer. 2004. *Clostridium difficile* infection in hospitals: a brewing storm. *Cmaj* 171:27-9.
25. Van den Berg, R. J., L. S. Bruijnesteijn van Coppenraet, H. J. Gerritsen, H. P. Endtz, E. R. van der Vorm, and E. J. Kuijper. 2005. Prospective Multicenter Evaluation of a New Immunoassay and Real-Time PCR for Rapid Diagnosis of *Clostridium difficile*-Associated Diarrhea in Hospitalized Patients. *J Clin Microbiol* 43:5338-40.
26. Van Steenberghe J., S. Debast, E. van Kregten, R. van den Berg, D. Notermans and E. Kuijper. 2005. Isolation of *Clostridium difficile* ribotype 027, toxinotype III in the Netherlands after increase in *C. difficile*-associated diarrhoea. *Eurosurveillance* 10 (7) : 050714
27. Warny, M., C. Denie, M. Delmee, and C. Lefebvre. 1995. Gamma globulin administration in relapsing *Clostridium difficile*-induced pseudomembranous colitis with a defective antibody response to toxin A. *Acta Clin. Belg.* 50: 36-39.
28. Warny, M., J. P. Vaerman, V. Avesani, and M. Delmee. 1994. Human antibody response to *Clostridium difficile* toxin A in relation to clinical course of infection. *Infect. Immun.* 62: 384-389.
29. Warny, M., J. Pepin, A. Fang, G. Kilgore, A. Thompson, and C. McDonald. 2005. Increased toxins A & B production in an emerging strain of *Clostridium difficile*. In press.

30. Wilcox MH, Fawley WN, Wigglesworth N, Parnell P, Verity P, Freeman J. 2003 Comparison of the effect of detergent versus hypochlorite cleaning on environmental contamination and incidence of *Clostridium difficile* infection. *J Hosp Infect.* 54(2):109-14. Erratum in: *J Hosp Infect.* 2004 Jul;57(3):267
31. Wilcox M.H., Fawley WN. 2000 Hospital disinfectants and spore formation by *Clostridium difficile*, *Lancet* 356(9238):1324

## 2.2. Cultuur M/7021 *B. fragilis*

Voor de resultaten van de enquête: zie hoofdstukken 3.4 voor de identificaties en 4.1 voor het antibiogram.

De anaërobe Gram negatieve bacillen zijn verantwoordelijk voor 4% van alle septicemieën. *Bacteroides fragilis* is het frequentst aangetroffen species, hoofdzakelijk met een gastro-intestinale oorsprong.

Op basis van DNA-DNA hybridizatie en 16S rRNA sequentie werd de taxonomie van strikte anaëroben volledig herzien. Tegenwoordig bevat het genus *Bacteroides* enkel nog de gal resistente species, vroeger als "*Bacteroides fragilis* groep" (BAF) beschreven, en enkele species waarvan de juiste taxonomische plaats nog niet duidelijk is en die dus nog niet naar andere genera overgeplaatst werden, zoals *Bacteroides ureolyticus*. De meeste andere *Bacteroides* werden naar de genera *Prevotella* en *Porphyromonas* overgebracht. Omwille van de duidelijkheid spreekt men nog van BAF, maar deze benaming zal niet meer nodig zijn na een volledige taxonomische herziening.

De frequentst voorkomende anaëroben in klinische monsters zijn de leden van de *B. fragilis* groep. Bovendien zijn deze ook het meest virulent en het meest resistent tegen antibiotica. Na bevestiging van het strikt anaërobe karakter, d.m.v. een zuurstoftolerantietest (afwezigheid van groei onder aërobe atmosfeer of CO<sub>2</sub>) en Gram kleuring kan een differentiatie van de anaërobe Gram negatieve bacillen in grote groepen van isolaten uitgevoerd worden op basis van eenvoudige testen: groei op *Bacteroides* Bile Esculine agar (BBE), esculine hydrolyse, resistentie t.o.v. schijfjes van vancomycine (5 µg), colistin (10 µg), kanamycine (500 µg of 1000 µg) en galzouten. Verdere species bepaling is mogelijk met een breder panel van biochemische testen of met commerciële biochemische galerijen of kits, die zeer goede resultaten geven voor de BAF groep. Het is dus meestal niet nodig om een gaschromatografie uit te voeren om de vetzuren, ontstaan uit de fermentatie van glucose, te analyseren.

De meeste laboratoria scoorden goed voor de antibiotica gevoeligheidstesten, terwijl de meerderheid een disk diffusie techniek gebruikte. Nochtans wordt deze techniek door de CLSI afgeraden. Naast een β-lactamase test die predictief is voor de gevoeligheid t.o.v. penicillines, beschrijft dit instituut enkel de agar dilutie methode als referentietechniek en de broth microdilutie techniek voor snel groeiende micro-organismen. Deze methoden zijn echter niet toe te passen in het routine laboratorium. De alternatieven zijn beperkt: de disk elutie methode is totaal onbetrouwbaar maar een aantal commerciële methoden, zoals de Etest en de ATB ANA galerij, scoren goed. Volgens L. Dubreuil (hoofdstuk 46 in Courvalin et al. *Antibiogramme*, ed. ESKA, 2006) zou de meest kost efficiënte tactiek een combinatie zijn van disk diffusie (betrouwbaar voor clindamycine, carbapenems en metronidazole) en Etest (overige antibiotica) op *Brucella* agar of Wilkins-Chalgren met bloed.

Deze *Bacteroides fragilis* illustreert het opduiken van metallo-β-lactamase producerende isolaten binnen de BAF groep. Dit metalloenzyme wordt door het gen *cfiA* (ook *craA* genoemd) gecodeerd en wordt enkel tot expressie gebracht indien dit gen gekoppeld is aan een insertie sequentie die een sterke promotor vormt. Het enzyme wordt dan goed tot expressie gebracht en de stam groeit tot tegen het carbapenem schijfje. Met andere β-lactams is de resistentie niet altijd duidelijk, zoals hier het geval was, en men raadt aan om BAF isolaten altijd met een carbapenem te testen en alle β-lactam antibiotica als resistent te rapporteren indien de zone verminderd is. Twaalf van de 138 deelnemers rapporteerden de stam gevoelig voor amoxicilline/clavulaanzuur terwijl de anderen minstens een intermediaire resistentie rapporteerden. Het ging over 11 gebruikers van de Rosco NeoSensitabs en één gebruiker van de ATB galerij. Nochtans werd deze stam resistent gevonden met NeoSensitabs bij een controle in ons



laboratorium en door Rosco. De reden voor deze discrepanties zijn niet duidelijk en de firma dringt aan op het correct volgen van de procedure, inclusief het testen op *Brucella* agar + 5% bloed, haemine en vit. K1. Er moet wel opgemerkt worden dat de 6 labo's die de nieuwe "CLSI NeoSensitabs" gebruiken, goed scoorden.

Gelukkig is dit resistentie mechanisme nog zeldzaam in ons land: slechts 3% van de BAF isolaten van de Belgische multicentrische studie waren meropenem resistent of intermediair (Wybo et al. JAC, 2007: 59:132-139). Verontrustender is de 5% resistentie en 9% intermediaire resistentie t.o.v. amoxicilline/clavulaanzuur in België. Dit is hoofdzakelijk te wijten aan een hyperproductie van een *cepA*  $\beta$ -lactamase met verschuiving naar hogere MIC waarden, die moeilijk te detecteren is met disk diffusie. Dit is de reden waarom  $\beta$ -lactamase inhibitoren combinaties niet met disk diffusie maar met Etest of ATB moeten getest worden.

Bijna alle *Bacteroides* van de BAF groep produceren een  $\beta$ -lactamase en zijn resistent t.o.v. penicillines; de CLSI stelt voor om penicilline en ampicilline systematisch resistent te rapporteren zonder te testen. De cefalosporines zijn meestal ook resistent met relatief behoud van de activiteit van cefamycines. Nochtans waren in de laatste multicentrische studie in België (Wybo et al. JAC, 2007: 59:132-139) slechts 62% van de isolaten van deze groep gevoelig voor cefoxitine, die de hoogste activiteit op anaëroben uitoefent. Dit stelt de vraag naar zijn klinisch gebruik, zelfs in geval van profylaxe, waar activiteit tegen alle aanwezige micro-organismen niet absoluut noodzakelijk is.

De disk diffusie is betrouwbaar voor clindamycine, maar op voorwaarde dat de incubatie 48 uur bedraagt: de resistentie is vaak induceerbaar en in dit geval ziet de kiem er volledig gevoelig uit na 24 uur incubatie. Slechts 48% van de BAF zijn nog gevoelig voor dit antibioticum, dat niet meer bruikbaar is voor deze groep.

De disk diffusie is betrouwbaar voor metronidazole op voorwaarde dat de anaërobie correct is. Zelfs in lage concentraties inhibeert zuurstof de werking van imidazolen. Vermits de resistentie zeldzaam is (1% in België) moet men de anaërobie altijd controleren, alsook de zuiverheid van het isolaat.

We kunnen besluiten dat de bacteriologie van de anaëroben problematisch blijft. Dit verklaart waarom anaëroben vaak niet gekweekt worden en dat zij meestal behandeld worden op basis van een vermoeden dat gebaseerd is op het soort infectie, de aanwezigheid van een stinkende reuk, gas of zwavelkorrels in de weefsels of de etter en het rechtstreeks onderzoek dat een polymorfe of specifieke flora toont (zeker als de aërobe kweek de rijkheid van dit onderzoek niet bevestigt). Het is nochtans belangrijk dat de laboratoria over gevoeligheidstesten beschikken aangezien nieuwe resistentie mechanismen beginnen op te duiken, terwijl het recent duidelijk bewezen werd dat de resistentie van anaëroben ook gepaard gaat met een slechte prognose (Nguyen MH et al. CID, 2000; 30:870-6). In moeilijke gevallen (en meer bepaald ernstige infecties die niet aan de empirische therapie beantwoorden), moet men de activiteit van de combinaties met  $\beta$ -lactamase inhibitoren (amoxicilline-clavulaanzuur en/of piperacilline-clavulaanzuur) testen (en eventueel van de cefalosporines, die zelden getest worden vermits zij slechts een geringe activiteit vertonen) met de E-test of de galerij ATB ANA om de hyperproductie van  $\beta$ -lactamases te detecteren; het is daarentegen nog wel aanvaardbaar om de diskdiffusie te gebruiken voor het testen van de carbapenems (het is noodzakelijk deze te testen om de aanwezigheid van een metallo- $\beta$ -lactamase op te sporen: als ze resistent zijn moeten alle  $\beta$ -lactams als resistent geantwoord worden), clindamycine (induceerbare resistentie, meestal pas vastgesteld na 48h incubatie) en metronidazole. Penicilline en ampicilline moeten niet getest worden voor de BAF: ze moeten als resistent geantwoord worden op basis van de identificatie.

Denis Pierard, UZ VUB, Brussel

### 2.3. Cultuur M/7253 *E. coli*

Voor de resultaten van de enquête: zie hoofdstukken 3.5 voor de identificaties en 4.2 voor het antibiogram.

Stam M/7253 was een *E.coli* ATCC35218. De CLSI raadt het gebruik van deze stam, samen met *E.coli* ATCC25922, aan voor de kwaliteitscontrole van de antibiotica die de combinatie van een  $\beta$ -lactam en een  $\beta$ -lactam-inhibitor bevatten.

#### Commentaar

De *E. coli* ATCC 35218 bevat een plasmide dat drager is van een  $\beta$ -lactamase (geen ESBL) dat geïnactiveerd wordt door een inhibitor ; daardoor is deze stam resistent tegen amoxicilline maar gevoelig voor amoxicilline-clavulaanzuur en andere  $\beta$ -lactam/ $\beta$ -lactam-inhibitor associaties. Deze stam werd reeds bij een vroegere EKE-enquête gebruikt (enquête 1999/2). Het gebruik van *E. coli* ATCC 35218 laat toe om na te gaan of de inhibitor in de associaties amoxicilline-clavulaanzuur, ampicilline-sulbactam en piperacilline-tazobactam achteruit gaat. Het plasmide kan verloren gaan tijdens opeenvolgende overentingen of bij een slechte bewaring van de stam. Om zeker te zijn van de aanwezigheid van het plasmide moet men de stam testen met een  $\beta$ -lactam alleen (ampicilline, amoxicilline, piperacilline of ticarcilline) en met een  $\beta$ -lactam/ $\beta$ -lactam-inhibitor associatie (bvb. amoxicilline-clavulaanzuur). Als de stam zijn plasmide verliest, wordt hij gevoelig aan het  $\beta$ -lactam antibioticum ; dit geeft aan dat de kwaliteitscontrole niet voldoet en dat men dus een nieuwe cultuur moet gebruiken. De CLSI raadt aan de stam bij een zeer lage temperatuur te bewaren ( $-60^{\circ}\text{C}$  of lager) en het aantal overentingen tot een minimum te beperken om het verlies van het plasmide te vermijden (1,2).

De diameters en de MIC-waarden die door de CLSI en de firma ROSCO vastgelegd zijn voor de  $\beta$ -lactam/ $\beta$ -lactam-inhibitor associatie worden weergegeven in tabellen 2.3.1 en 2.3.2. De CLSI rapporteert een diameter van 6 mm voor ampicilline. Voor amoxicilline-clavulaanzuur bedraagt de verwachte diameter 17 tot 22 mm (disks met lading CLSI 20 + 10) en de MIC-waarde 4/2 tot 16/8  $\mu\text{g/ml}$ . De verwachte diameter voor de NEOSENSITABS schijfjes van de firma ROSCO (lading 30 + 15) is 21 tot 26 mm. De Société Française de Microbiologie vermeldt geen enkele diameter voor *E.coli* ATCC35218.

Alle laboratoria hebben de resistentie tegen ampicilline vastgesteld, wat dus bewijst dat alle geteste stammen het plasmide, met het  $\beta$ -lactamase, bevatten. De meerderheid van de laboratoria bekwamen een diameter of een MIC-waarde binnen de verwachte grenzen voor amoxicilline-clavulaanzuur. Twaalf van de 182 laboratoria (6 %) bekwamen een diameter of een MIC-waarde buiten de limieten. Acht laboratoria stelden een te grote diameter of te kleine MIC-waarde vast: 5 NEOSENSITABS-gebruikers (lading 30 + 15) (27, 27, 27, 33 en 43 mm voor een verwachte diameter van 21 tot 26 mm), één gebruiker van de papieren schijfjes van Becton Dickinson (25 mm voor een verwachte diameter van 17 tot 22 mm), één VITEK-gebruiker en één VITEK compact gebruiker ( $\text{MIC} \leq 2 \mu\text{g/ml}$  voor een verwachte MIC van 4/2 tot 16/8  $\mu\text{g/ml}$ ). De overige 4 laboratoria hebben een te kleine diameter vermeld: 3 gebruikers van papieren schijfjes (Oxoid, bioMérieux en Becton Dickinson) (9, 16 en 15 mm respectievelijk voor een verwachte diameter van 17 tot 22 mm) en één NEOSENSITABS-gebruiker (diameter van 12 mm).

Er zijn vele mogelijke oorzaken voor deze resultaten die buiten de grenzen liggen. De houding die men hiertegenover dient aan te nemen, hangt af van de oorzaak van het probleem en wordt beschreven in de documenten van de CLSI en de firma ROSCO (1, 2, 5). Een te grote diameter of een te kleine MIC-waarde kunnen te wijten zijn aan het verlies van het plasmide met het  $\beta$ -lactamase, wat zich uit in gevoeligheid voor ampicilline of amoxicilline. Een te kleine diameter of een te hoge MIC-waarde kunnen het gevolg zijn van instabiliteit van het clavulaanzuur of achteruitgang van het amoxicilline. In dit geval raadt de CLSI aan een ander lot te gebruiken en de bewaaromstandigheden en de kwaliteit van de verpakking van het antibioticum te controleren (3).

S. Woestyn (Laboratoire J. Woestyn, Mouscron)

Tabel 2.3.1. Diameters en MIC-waarden beschreven door de CLSI voor *E.coli* ATCC35218 (3)

Antibioticum	Diameters CLSI	MIC CLSI*
Amoxicilline-clavulaanzuur	17-22	4/2-16/8
Ampicilline	6	/
Ampicilline-sulbactam	13-19	8/4-32/16
Piperacilline	12-18	/
Piperacilline-tazobactam	24-30	0,5/4-2/4
Ticarcilline	6	/
Ticarcilline-clavulaanzuur	21-25	8/2-32/2 <sup>a</sup>

\* concentraties van het eerste en tweede bestanddeel.

<sup>a</sup> 16/2-64/2 bij gebruik van HTM milieu (haemophilus test medium).

Tabel 2.3.2. Diameters beschreven door de firma ROSCO voor *E.coli* ATCC35218 (4,5)

Lading ROSCO	Diameters	Lading CLSI	Diameters
Amoxicilline-clavulaanzuur (30+15)	21-26	Amoxicilline-clavulaanzuur (20+10)	17-22
Ampicilline	/	Ampicilline (10)	9
Ampicilline-sulbactam (30+30)	21-26	Ampicilline-sulbactam (10+10)	13-19
Piperacilline	/	Piperacilline (100)	12-18
Piperacilline-tazobactam (100+10)	26-31	Piperacilline tazobactam (100+10)	24-30
Ticarcilline	/	Ticarcilline (75)	9
Ticarcilline-clavulaanzuur (75+15)	25-31	Ticarcilline-clavulaanzuur (75+10)	21-25
Temocilline (30)	20-26	Temocilline (30)	20-26

## **REFERENTIES**

1. M2-A9. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard-Ninth Edition, 2006. Clinical and Laboratory Standards Institute.
2. M7-A7. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard-Seventh Edition, 2006. Clinical and Laboratory Standards Institute.
3. M100-S16. Vol. 26 N°1. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Sixteenth Informational Supplement, 2006. Clinical and Laboratory Standards Institute.
4. NEO-SENSITABS. User's guide susceptibility testing, potency according to CLSI. Supplement 2006.
5. NEO-SENSITABS. User's guide susceptibility testing. 18<sup>th</sup> Ed. 2005/2006.

#### 2.4. Cultuur M/2090 *E. faecium* van de enquête 2006/3

##### Commentaar

Door onvoorziene omstandigheden is het ons onmogelijk het commentaar over *Enterococcus faecium* te publiceren.

Onze excuses hiervoor.

### III. RESULTATEN VAN DE IDENTIFICATIES (N = 182)

De correcte of aanvaardbare resultaten zijn onderlijnd.

#### 3.1. Cultuur M/7103 Staal negatief op *Clostridium difficile* (stoelgang)

<u>Negatief</u>	122 (67.0%)
<u>Negatief voor <i>C. difficile</i></u>	25 (13.7%)
<u>Negatief voor <i>C. difficile</i> en andere enteropathogenen</u>	1 (0.5%)
<u>Commensale flora</u>	16 (8.8%)
<u>Antigen Negatief</u>	1 (0.5%)
<u>(<i>E. coli</i>)<sup>1</sup></u>	1 (0.5%)
<u>(Coliforme flora)<sup>1</sup></u>	1 (0.5%)
<u><i>E. coli</i></u>	1
<u><i>E. coli</i> doorstuur naar referentiecentrum voor EHEC, VTEC</u>	1
<u>Geen groei</u>	6 (3.3%)
<u>Niet uitgevoerd in routine (wordt doorgestuurd)</u>	7 (3.8%)

<sup>1</sup> Deze laboratoria plaatsen de hierboven vermelde antwoorden tussen haakjes. Deze resultaten worden beschouwd als niet aanvaardbaar omdat zij in routine tot verwarring zouden kunnen leiden bij de clinicus.

Resultaten van de toxine-bepaling (N = 172; 6 van de 7 laboratoria die geen kweek uitvoeren in routine, sturen hun stalen eveneens door voor toxine-bepaling; 1 (Luxemburgs) laboratorium dat geen kweek uitvoert, bepaalt wel het toxine; 3 laboratoria voerden de test niet uit gezien er geen pathogene kiem geïsoleerd werd uit de cultuur; 1 laboratorium gaf geen antwoord):

<u>Negatief</u>	160 (93.0%)
<u>Negatief voor toxine A</u>	7 (4.0%)
<u>Negatief voor toxine A en B</u>	3 (1.7%)
<u>Toxine A zwak positief</u>	1
<u>Zwak positief</u>	1

Beide laboratoria die een zwak positief resultaat voor het toxine bekwamen, vonden de cultuur negatief.

### 3.2. Cultuur M/7104 *Clostridium difficile*, toxine positief (stoelgang)

<u><i>Clostridium difficile</i></u>	81 (44.5%)
<u>Positief</u>	72 (39.6%)
<u><i>Clostridium difficile</i>, toxine positief</u>	7 (3.8%)
<u>Antigen positief</u>	1 (0.5%)
<u><i>Clostridium difficile</i> (+<i>E. coli</i>)<sup>1</sup></u>	1 (0.5%)
<u><i>Clostridium difficile</i> (+ coliforme flora)<sup>1</sup></u>	1 (0.5%)
<u><i>Clostridium difficile</i> +<i>E. coli</i></u>	2
Negatief	6
Negatief voor <i>C. difficile</i>	1
Negatief ( <i>C. perfringens</i> )	1
Commensale flora	2
<u>Niet uitgevoerd in routine (wordt doorgestuurd)</u>	7 (3.8%)

<sup>1</sup> Deze laboratoria plaatsen de vermelding *E. coli* of coliforme flora tussen haakjes.

Resultaten van de toxine- bepaling (N = 175; 6 van de 7 laboratoria die geen kweek uitvoeren in routine, sturen hun stalen eveneens door voor toxine-bepaling; 1 (Luxemburgs) laboratorium dat geen kweek uitvoert, bepaalt wel het toxine; 1 laboratorium voerde de test niet uit gezien er geen pathogene kiem geïsoleerd werd uit de cultuur):

<u>Positief</u>	142 (81.1%)
<u>Positief voor toxine A</u>	22 (12.5%)
<u>Positief voor toxine A en B</u>	4 (2.3%)
<u>Positief in stoelgang</u>	2 (1.1%)
<u>Positief voor toxine A en/of B</u>	1 (0.7%)
Positief op cultuur, twijfelachtig in stoelgang	1
Positief op cultuur, negatief in stoelgang	1
Positief voor A+B test, negatief voor toxine A	1
Negatief	1

Van de 10 laboratoria die een «negatief» resultaat bekwamen op de kweek, bekwamen 8 wel een positief resultaat voor de toxines; één van deze 10 laboratoria antwoordde «niet uitgevoerd want geen pathogene kiemen» (heeft mogelijk de stalen M/7104 en M/7274 verwisseld want de kweek van staal M/7274 was positief op *C. difficile* bij dit laboratorium); en één bekwam ook voor de toxines een negatief resultaat (doch heeft meer dan waarschijnlijk stalen M/7104 en M/7274 omgewisseld).



### 3.3. Cultuur M/7274 *Clostridium non-difficile* (*C. perfringens*) (stoelgang)

<u>Negatief</u>	91 (50.0%)
<u>Negatief voor <i>C. difficile</i></u>	25 (13.7%)
<u>Negatief voor <i>C. difficile</i> (aanwezigheid van <i>C. perfringens</i>)</u>	7 (3.8%)
<u>Negatief (<i>C. perfringens</i>)</u>	6 (3.3%)
<u>Negatief (<i>C. spp. non-difficile</i>)</u>	3 (1.6%)
<u>Negatief voor <i>C. difficile</i> en andere enteropathogenen</u>	1 (0.5%)
<u>Commensale flora</u>	11 (6.0%)
<u>Commensale flora (<i>C. perfringens</i>)</u>	2 (1.1%)
<u>Antigen negatief</u>	1 (0.5%)
<u>(<i>E. coli</i>)<sup>1</sup> + <i>C. perfringens</i></u>	1
<u>(Coliforme flora)<sup>1</sup> + <i>C. perfringens</i></u>	1
<u><i>Clostridium difficile</i></u>	4
<u>Positief</u>	7
<u>Positief (fluorescente stam)</u>	1
<u>Positief (<i>C. spp. non-difficile</i>)</u>	1
<u><i>C. perfringens</i></u>	9
<u><i>E. coli</i></u>	1
<u>Geen groei</u>	3
<u>Niet uitgevoerd in routine (wordt doorgestuurd)</u>	7 (3.8%)

<sup>1</sup>Deze laboratoria plaatsen de vermelding *E. coli* of coliforme flora tussen haakjes. Deze resultaten worden beschouwd als niet aanvaardbaar omdat zij in routine tot verwarring zouden kunnen leiden bij de clinicus.

Resultaten van de toxine-bepaling bepaling (N = 174; 6 van de 7 laboratoria die geen kweek uitvoeren in routine, sturen hun stalen eveneens door voor toxine-bepaling; 1 (Luxemburgs) laboratorium dat geen kweek uitvoert, bepaalt wel het toxine; 1 laboratorium voerde wel een kweek maar geen toxine-bepaling uit; 1 laboratorium gaf geen antwoord):

<u>Negatief</u>	162 (93.1%)
<u>Negatief voor toxine A</u>	8 (4.5%)
<u>Negatief voor toxine A en B</u>	2 (1.1%)
<u>Positief</u>	3

Van de 11 laboratoria die «positief» of «*C. difficile*» geantwoord hebben op de kweek, bekwamen 9 wel een negatief resultaat voor het toxine; 1 van deze 11 laboratoria bepaalde geen toxine (heeft mogelijk stalen M/7104 en M/7274 verwisseld want de kweek van staal M/7104 was negatief op *C. difficile* bij dit laboratorium); en één bekwam ook voor het toxine een positief resultaat (doch heeft meer dan waarschijnlijk stalen M/7104 en M/7274 omgewisseld).

De overige twee positieve resultaten voor het toxine werden bekomen door het laboratorium dat «Positief (fluorescente stam)» antwoordde en door één laboratorium dat een negatief resultaat bekwam voor de kweek.

### Opmerking: gebruikte technieken voor bepaling van toxine

156 laboratoria gebruikten 1 methode, 16 gebruikten 2 methoden en 3 gebruikten 3 methoden: er werden met andere woorden 197 technieken vermeld. Eén laboratorium dat twee technieken gebruikt vermeldt negatieve stalen met de 2<sup>e</sup> techniek te controleren; een tweede vermeldt dat in routine toxine A opgespoord wordt, is deze test negatief en de kweek positief, dan wordt een A+B test uitgevoerd.

4 laboratoria vermeldden cytotoxines op te sporen op Vero-cellen; 1 laboratorium vermeldde een in house techniek te gebruiken; en 2 specificeerden de gebruikte techniek(en) niet.

In onderstaande tabel wordt een overzicht gegeven van de gebruikte commerciële methoden:

Fabrikant	Kit	Aantal gebruikers
Becton Dickinson	BD ColorPAC Toxin A Test kit	1
bioMérieux	VIDAS C. difficile toxine A II (CDA2)	15
Biosite	Triage micro C. difficile Panel	12
Biostar	OIA CdTOX A	2
Meridian	ImmunoCard Toxins A & B	50
	Premier C. difficile Toxin A&B	8
	ImmunoCard STAT! Toxin A	8
Microgen	Microscreen C. difficile	3
Oxoid	C. difficile Toxin A Test	55
	Xpect Clostridium difficile Toxin A/B	2
Techlab	C. difficile Tox A/B II	17
	Tox A/B Quik chek	14
	C. difficile Toxin/Antitoxin Kit	3
Totaal		190

### 3.4. Cultuur M/7021 *Bacteroides fragilis* (hemocultuur)

<i>Bacteroides fragilis</i>	125 (68.7%)
<i>Bacteroides fragilis</i> groep	18 (9.9%)
<i>Bacteroides fragilis fragilis</i>	1 (0.5%)
<i>Bacteroides caccae</i>	1 (0.5%)
<i>Bacteroides caccae</i> (groep <i>B. fragilis</i> )	1 (0.5%)
<i>Bacteroides species</i>	21 (11.5%)
<u>Anaërobe Gram negatieve staafjes (in routine doorgestuurd voor verdere identificatie)</u>	1 (0.5%)
<u>Anaëroben (in routine doorgestuurd voor verdere identificatie)</u>	1 (0.5%)
<u>Anaëroben</u> (geen groei in subcultuur)	1 (0.5%)
<i>Prevotella species</i>	2
<i>Prevotella oralis</i>	1
Gecontamineerd met <i>E. coli</i> en <i>S. epidermidis</i>	2
Geen groei	5
<u>Niet uitgevoerd in routine (wordt doorgestuurd)</u>	2 (1.1%)

N.B. 2 laboratoria vermelden expliciet dat de *Bacteroides fragilis* b-lactamase positief is.

De resultaten *Bacteroides fragilis* (groep) en *Bacteroides species* zijn correct. De resultaten die de termen «anaëroben» en/of «doorstuur» bevatten worden als aanvaardbaar beschouwd.

### 3.5 Cultuur M/7253 *Escherichia coli* (urine)

<i>Escherichia coli</i>	182 (100%)
-------------------------	------------

N.B. 3 laboratoria vermelden expliciet dat de *Escherichia coli* ESBL negatief is.

## IV. ANTIBIOGRAM

Een algemeen overzicht van de resultaten wordt gegeven bij het begin van de bespreking. In de verdere verwerking worden de resultaten geanalyseerd naargelang de methode. Het type antibiogram werd opgesteld op basis van resultaten van de verschillende experts.

### 4.1. Cultuur M/7021 (*Bacteroides fragilis*)

Aantal deelnemers = 138

Het merendeel van de laboratoria die geen antibiogram voor deze stam bepaald hebben, vermeldden dit in routine niet uit te voeren voor anaëroben (en dergelijke stalen desgevallend door te sturen voor bepaling van het antibiogram; één laboratorium vermeldde expliciet dat diskdiffusie niet geschikt is doch dat een MIC-bepaling dient te gebeuren). Eén laboratorium verstreekte de opmerking: «Er wordt geen antibiogram uitgevoerd voor anaëroben. Er wordt telefonisch contact opgenomen met de behandelende geneesheer. Meestal betreft het een polymicrobiële infectie waarvoor volgende antibiotica worden aangeraden: piperacilline-tazobactam, amoxicilline-clavulaanzuur of imipenem.» Eén laboratorium dat verklaarde in routine geen antibiogram voor anaëroben uit te voeren, vermeldde wel dat de stam een  $\beta$ -lactamase bezit.

De laboratoria die geen groei verkregen hadden of verklaarden dat het staal besmet was (cfr. Hoofdstuk III Resultaten van de identificaties) hebben uiteraard geen antibiogram kunnen bepalen; ook vermeldden 3 laboratoria dat de groei die zij verkregen wel een identificatie toeliet maar onvoldoende was voor een bepaling van het antibiogram.

Niet alle deelnemers bepaalden de gevoeligheid voor alle antibiotica. Sommige deelnemers bepaalden de gevoeligheid met meer dan 1 methode; in nagenoeg alle gevallen kwamen deze resultaten overeen (twee laboratoria gaven geen finaal resultaat door voor de Neosensitabs schijfjes maar verwezen naar het resultaat van de E-test die ze uitvoerden).

Tabel 4.1.1. Resultaten der laboratoria voor de antibiogrammen voor staal M/7021 (*Bacteroides fragilis*).

Antibioticum	Verwachte resultaat	Totaal aantal labos	S	I	R
Metronidazole	S	121	120	-	1
Clindamycine	R	134	1	-	133
Amoxicilline-clavulaanzuur	R	138	12	31	95

Het in de tabellen 4.1.2. tot en met 4.1.9 weergegeven resultaat is het finale resultaat, na eventuele wijziging via toepassing der expert-regels.

Niet alle deelnemers vermeldden de gebruikte methode of lading. Voor zover deze aangegeven werd door de deelnemers, hebben wij voor de schijfjesmethode met de papieren schijfjes of Neosensitabs schijfjes 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. Eén laboratorium gaf als diameter voor clindamycine en amoxicilline-clavulaanzuur «0.5» op; dit antwoord werd evenmin in aanmerking genomen.

Tabel 4.1.2. Bekomen diameters met de papieren schijfjes volgens CLSI voor staal M/7021 (*Bacteroides fragilis*).

Antibioticum	Aantal gebruikers met vermelding van lading (Totaal aantal gebruikers)	Lading	Mediane diameter	Grenswaarden diameter	Resultaat (Totaal aantal gebruikers)		
					S	I	R
Metronidazole <sup>1</sup>	(14) 5 (5) 3 (3)	5 80	33 40	29 - 40 38 - 48	14 5 3	- - -	- - -
Clindamycine	18 (21)	2	6	5 - 10	-	-	21
Amoxicilline-clavulaanzuur	20 (22)	20 + 10	6	6 - 14	-	2	20

<sup>1</sup> Voor metronidazole werden verschillende ladingen gerapporteerd; de 2 meest vermelde waren 5 en 80 µg.

Voor de Neosensitabs schijfjes zijn er nu 2 ladingen beschikbaar: de gebruikelijke (met de ROSCO richtlijnen) en de «CLSI-ladingen» (waarbij de CLSI richtlijnen gevolgd dienen te worden). Beide ladingen worden in onderstaande tabel afzonderlijk vermeld.

Tabel 4.1.3. Bekomen diameters met de Neosensitabs schijfjes voor staal M/7021 (*Bacteroides fragilis*).

Antibioticum	Aantal gebruikers met vermelding van lading (Totaal aantal gebruikers)	Lading	Mediane diameter	Grenswaarden diameter	Resultaat (Totaal aantal gebruikers)			
					S	I	R	*
Metronidazole <sup>1</sup>	(77) 65 (69) 2 (2)	16 <sup>1</sup> 5	40 27	24 - 60 24 - 30	76 69 2	- - -	1 -	- -
Clindamycine	(82) 68 (75) 3 (3)	25 <sup>2</sup> 2	9,5 9	6 - 26 9 - 10	1 1 -	- -	81 74 3	- -
Amoxicilline-clavulaanzuur	(83) 69 (71) 6 (6)	30 + 15 20 + 10	22 20,5	14 - 33 14 - 22	11 10 -	23 22 1	47 37 5	2 <sup>3</sup> 2 <sup>3</sup> -

<sup>1</sup> Tevens antwoordde 1 laboratorium: > 35 mm.

<sup>2</sup> Tevens antwoordden 2 laboratoria: < 9 mm.

<sup>3</sup> Twee laboratoria hebben wel de diameter gemeten met de Neosensitabs (en het ruw resultaat geantwoord) maar verwijzen voor het finale resultaat naar het resultaat van de E-test.

Gezien de afwijkingen die vastgesteld werden met de Neosensitabs-schijfjes, en dan voornamelijk met de schijfjes met de lading 30+15 µg, hebben wij gevraagd aan de firma Rosco van de stam nader te onderzoeken. U vindt hieronder hun bevindingen en aanbevelingen:

Results from Rosco laboratory for the *Bacteroides fragilis* strain M/7103 repeated testing on supplemental Brucella blood agar against Metronidazole, Clindamycin and Amoxicillin+Clavulanic acid.

**Procedure:**

Media: Supplemented Brucella blood agar

Inoculum: McFarland 1.0

Incubation anaerobic environment 24 hours

**Results:**

Metronidazole 16 µg Neo-Sensitabs: Zone 38 mm (susceptible)

Clindamycin 2 µg and Clindamycin 25 µg: No zone (resistant)

Amoxicillin+Clavulanate 20+10 µg: mm (resistant). 19 mm. Interpretation zones ≥ 24 mm (S) and ≤ 20 mm (R)

Amoxicillin+Clavulanate 30+15 µg: mm (resistant). 22 mm. Interpretation zones ≥ 28 mm and < 23 mm (R)

Amoxicillin+Clavulanate has been tested on other medias as well (FAA, chocolate agar, MH+blood) to try to find an explanation for the bigger zones reported. No explanations were found. The zone for Amoxicillin+Clavulanate is not sharp and therefore the reading of the zone may differ, however, the zone size is not near susceptibility breakpoint.

**Conclusion:**

The strain M/7103 *Bacteroides fragilis* is resistant when testing with Amoxicillin+Clavulanate Neo-Sensitabs using a standardized method.

The recommended procedure for susceptibility testing of anaerobes by the diffusion method is the following:

- \* Use supplemented Brucella blood agar; it supports good growth for essentially all anaerobes. Brucella agar base is supplemented with 5 µg/ml haemin, 5% defibrinated sheep blood and 1 µg/ml vitamin K1 (haemin and vitamin K1 may be added before sterilisation).
- \* Direct suspension of colonies in broth to achieve turbidity equivalent to a 1.0 McFarland standard (3x10<sup>8</sup> CFU/ml). Streak the surface of the agar with a cotton swab.
- \* Allow the inoculated plate to remain at room temperature (5-10 min.) until the surface of the agar looks dry. For some fastidious isolates that do not grow on control plates, pre-reduction of plates in an anaerobic environment may be necessary. Apply Neo-Sensitabs tablets.
- \* Invert the inoculated plate and incubate at 35°C in an anaerobic jar or alternative anaerobic environment, for 24-48 hours.

De resultaten die met de E-test bekomen werden, zijn samengevat in onderstaande tabel.

Tabel 4.1.4. Resultaten bekomen MIC-waarden met de E-test voor staal M/7021 (*Bacteroides fragilis*).

	MIC (mg/l)											Resultaten			
	Aantal resultaten	0.032	0.19	0.25	0.5	1	8	16	32	64	128	≥	S	I	R
Metronidazole	14	2	2	6	4							14	-	-	
Clindamycine	13												-	13	
Amoxicilline-clavulaanzuur	17					3	5	4	1				-	2	15

Telkens 1 laboratorium bepaalde de gevoeligheid van deze kiem met Vitek 1 en met Vitek 2 compact: beide laboratoria bekwamen een resultaat «S» voor metronidazole en «R» voor clindamycine en amoxicilline-clavulaanzuur.

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 gaven geen waarden weer.

Tabel 4.1.5. Resultaten bekomen met de ATB methode voor M/7021 (*Bacteroides fragilis*).

Antibioticum	Resultaat		
	S	I	R
Metronidazole	13	-	-
Clindamycine	-	-	14
Amoxicilline-clavulaanzuur	1	1	12

De resultaten bekomen met de toestellen Osiris en Sirscan worden weergegeven in tabel 4.1.6. en 4.1.7. Er zijn momenteel nog te weinig gebruikers (of te weinig gebruikers die een kwantitatief resultaat antwoorden) van deze toestellen om de kwantitatieve resultaten statistisch zinvol te verwerken. Indien het aantal gebruikers toeneemt, zal dit uiteraard wel het geval zijn.

Tabel 4.1.6. Resultaten bekomen met de Osiris voor staal M/7021 (*Bacteroides fragilis*).

Antibioticum	Resultaat		
	S	I	R
Metronidazole	2	-	-
Clindamycine	-	-	3
Amoxicilline-clavulaanzuur	-	-	3

Tabel 4.1.7. Resultaten bekomen met de Sirscan voor staal M/7021 (*Bacteroides fragilis*).

Antibioticum	Resultaat		
	S	I	R
Metronidazole	3	-	-
Clindamycine	-	-	3
Amoxicilline-clavulaanzuur	-	2	1



Tot slot dient vermeld dat vier laboratoria niet vermeldden welke techniek zij gebruikt hebben ter bepaling van de gevoeligheid voor één of meer antibiotica.

De meeste laboratoria behielden het ruw resultaat voor het antwoorden van het finale resultaat. Toch wijzigden enkele laboratoria het ruw resultaat, al dan niet op basis van expert regels:

- Clindamycine :
  - ♣ S →R
  - Rosco: 1 labo
  
- Amoxicilline-clavulaanzuur:
  - ♣ I →R
  - Rosco: 1 labo
  - E-test: 1 labo

#### 4.2. Cultuur M/7253 (*Escherichia coli*)

Stam M/7253 was een *E.coli* ATCC35218. De CLSI raadt het gebruik van deze stam, samen met *E.coli* ATCC25922, aan voor de kwaliteitscontrole van de antibiotica die de combinatie van een  $\beta$ -lactam en een  $\beta$ -lactam-inhibitor bevatten.

Hieronder worden de resultaten van de kwaliteitscontrole vermeld. Het verwachte resultaat werd opgesteld op basis van de resultaten van de verschillende experts en wordt uitgedrukt als "gevoelig", "intermediair" of "resistent". Deze resultaten worden ter informatieve titel weergegeven. Van de vermelde antibiotica heeft de CLSI enkel voor amoxicilline-clavulaanzuur de diameters en MIC-waarden bepaald voor *E. coli* ATCC35218. Deze diameters en MIC-waarden worden in het commentaar besproken.

Aantal deelnemers = 182

Alle deelnemers hebben de stam als *E. coli* geïdentificeerd.

Niet alle deelnemers bepaalden de gevoeligheid voor alle antibiotica. Sommige deelnemers bepaalden de gevoeligheid voor meer dan één chinolone. Sommige deelnemers bepaalden de gevoeligheid met meer dan 1 methode; deze resultaten kwamen in alle gevallen overeen.

Tabel 4.2.1. Resultaten der laboratoria voor de antibiogrammen voor staal M/7253 (*Escherichia coli*).

Antibioticum	Verwachte resultaat	Totaal aantal labo's	S	I	R	*
Ampicilline	R	175	-	-	175	-
Amoxicilline <sup>1</sup>	R	6	-	-	6	-
Amoxicilline-clavulaanzuur	S	182	173	6	3	-
Amikacine	S	177	176	-	-	1 <sup>3</sup>
Gentamicine	S	168	167	-	-	1 <sup>3</sup>
Nitrofurantoïne	S	180	178	2	-	-
Co-trimoxazole	S	181	179	2	-	-
Chinolones						
Ciprofloxacin	S	103	103	-	-	-
Levofloxacin	S	17	17	-	-	-
Moxifloxacin	S	1	1	-	-	-
Norfloxacin	S	60	60	-	-	-
Ofloxacin	S	16	16	-	-	-
Nalidixinezuur	S	1	1	-	-	-
"Chinolone" <sup>2</sup>	S	11	11	-	-	-

<sup>1</sup> Een aantal laboratoria bepaalde de gevoeligheid voor amoxicilline in plaats van voor ampicilline.

<sup>2</sup> Een aantal laboratoria vermeldde de naam van het gebruikte chinolone niet.

<sup>3</sup> Eén laboratorium antwoordde wel het ruw resultaat voor amikacine en gentamicine, maar geen finaal resultaat.

Het in de tabellen 4.2.2. tot en met 4.2.9 weergegeven resultaat is het finale resultaat, na eventuele wijziging via toepassing der expert-regels.

Niet alle deelnemers vermeldden de gebruikte methode of lading. Voor zover deze aangegeven werd door de deelnemers, hebben wij voor de schijfjesmethode met de papieren schijfjes en Neosensitabs schijfjes 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 papieren schijfjes volgens CLSI voor staal M/7253 (*Escherichia coli*).

Antibioticum	Aantal gebruikers met vermelding van lading (Totaal aantal gebruikers)	Lading	Mediane diameter	Grenswaarden diameter	Resultaat (Totaal aantal gebruikers)		
					S	I	R
Ampicilline	32 (33)	10 <sup>1</sup>	6	6 - 10	-	-	33
Amoxicilline	1 (1)	25	6	6 - 6	-	-	1
Amoxicilline-clavulaanzuur*	32 (32)	20 + 10	19	9 - 25	29	2	1
Amikacine	31 (31)	30	20	17 - 24	31	-	-
Gentamicine	28 (28)	10	20	16 - 25	28	-	-
Nitrofurantoin	33 (34)	300	20	18 - 26	34	-	-
Co-trimoxazole	34 (34)	1.25 + 23.75	22	14 - 25	32	2	-
Chinolones							
Ciprofloxacin	18 (18)	5	31	24 - 35	18	-	-
Levofloxacin	5 (5)	5	33	30 - 35	5	-	-
Moxifloxacin	1 (1)	5	31	31 - 31	1	-	-
Norfloxacin	10 (11)	10	30	24 - 37	11	-	-
Ofloxacin	3 (3)	5	29	27 - 35	3	-	-
"Chinolone"	2 (2)	10	28	26 - 30	2	-	-

<sup>1</sup> Tevens antwoordde 1 laboratorium: < 7 mm.

\* De door de CLSI voor stam *E. coli* ATCC35218 vastgelegde diameters zijn voor Amoxicilline-clavulaanzuur 17-22 mm. De resultaten «I» en «R» zijn afkomstig van 3 laboratoria die diameters buiten deze grenzen bekwamen (16, 15 en 9 mm). De kritische diameters voor enterobacteriaceae voor Amoxicilline-clavulaanzuur zijn : ≤ 13 mm : R, 14-17 mm : I, ≥ 18 mm : S.

Voor de Neosensitabs schijfjes zijn er nu 2 ladingen beschikbaar: de gebruikelijke (met de ROSCO richtlijnen) en de «CLSI-ladingen» (waarbij de CLSI richtlijnen gevolgd dienen te worden). Beide ladingen worden in onderstaande tabel afzonderlijk vermeld.

Tabel 4.2.3. Bekomen diameters met de Neosensitabs schijfjes voor staal M/7253 (*Escherichia coli*).

Antibioticum	Aantal gebruikers met vermelding van lading (Totaal aantal gebruikers)	Lading	Mediane diameter	Grenswaarden diameter	Resultaat (Totaal aantal gebruikers)		
					S	I	R
Ampicilline	(52)				-	-	52
	39 (43)	33 <sup>1</sup>	10	9 - 15	-	-	43
	3 (3)	10	9	9 - 10	-	-	3
Amoxicilline	3 (3)	30	9	9 - 9	-	-	3
Amoxicilline-clavulaanzuur	(57)				54 <sup>4</sup>	2	1 <sup>4</sup>
'a)	49 (50)	30 + 15	24	21 - 43	48	2	-
'b)	3 (3)	20 + 10	20	20 - 22	3	-	-
Amikacine	(53)				53	-	-
	45 (46)	40	24	20 - 32	46	-	-
	3 (3)	30	21	20 - 25	3	-	-
Gentamicine	(47)				47	-	-
	40 (40)	40	25	22 - 30	40	-	-
	2 (2)	10	21.5	21 - 22	2	-	-
Nitrofurantoïne	(56)				54	2	-
	47 (48)	260	26	22 - 30	47	1	-
	3 (3)	300	23	21 - 23	3	-	-
Co-trimoxazole	(54)				54	-	-
	46 (48)	5.2 + 240 <sup>2</sup>	33	24 - 43	48	-	-
	3 (3)	1.25 + 23.75	24	23 - 25	3	-	-
Chinolones							
Ciprofloxacine	(21)				21	-	-
	17 (18)	10 <sup>3</sup>	33	21 - 40	18	-	-
	1 (1)	5	33	33 - 33	1	-	-
Levofloxacine	4 (4)	5	33.5	28 - 43	4	-	-
Norfloxacine	20 (20)	10	29	24 - 34	20	-	-
Ofloxacine	(8)				8	-	-
	5 (5)	10	28	25 - 37	5	-	-
	2 (2)	5	33.5	31 - 36	2	-	-
Nalidixinezuur	1 (1)	130	30	30 - 30	1	-	-
" Chinolone "	1 (1)	10	32	32 - 32	1	-	-

<sup>1</sup> Tevens antwoordde 1 laboratorium: < 9 mm.

<sup>2</sup> Tevens antwoordde 1 laboratorium: > 30 mm.

<sup>3</sup> Tevens antwoordde 1 laboratorium: > 30 mm.

<sup>4</sup> Enkele laboratoria hebben de lading van de schijfjes niet vermeld en worden dus niet verder onder (a) of (b) opgenomen.

(a) de verwachte diameters voor *E.coli* ATCC35218 voor amoxicilline-clavulaanzuur zijn 21 tot 26 mm (ROSCO richtlijnen). De 2 resultaten « I » zijn extrapolaties van ruwe resultaten « S » en zijn respectievelijk afkomstig van een resultaat buiten de voorziene grenzen (43 mm) en een resultaat binnen deze grenzen (25 mm). Van de laboratoria met resultaat « S » hebben er 4 een diameter buiten de grenzen gevonden (27, 27, 27 et 33 mm). De kritische diameters voor bacteriën met een snelle groei zijn voor amoxicilline-clavulaanzuur: ≤ 16 mm : R, 17-19 mm : I, ≥ 20 mm : S.

(b) de verwachte diameters voor *E.coli* ATCC35218 voor amoxicilline-clavulaanzuur zijn 17-22 mm voor de CLSI lading. De kritische diameters voor enterobacteriaceae voor amoxicilline-clavulaanzuur zijn: ≤ 13 mm : R, 14-17 mm : I, ≥ 18 mm : S.

De resultaten die met de E-test bekomen werden, zijn samengevat in onderstaande tabel.

Tabel 4.2.4. Resultaten bekomen MIC-waarden met de E-test voor staal M/7253 (*Escherichia coli*).

	Aantal resultaten	MIC (mg/l)										Resultaat		
		0.016	0.25	0.5	1	2	4	8	16	64	>	S	I	R
		-	-	-	-	-	-	-	-	-	256			
		0.25	0.5	1	2	4	8	16	64	256				
Ampicilline	1										1	-	-	1
Amoxicilline-clavulaanzuur*	2						1	1				2	-	-
Amikacine	2					2						2		
Gentamicine	2			1	1							2	-	-
Co-trimoxazole	1	1										1	-	-
Chinolones														
Ciprofloxacin	2	2										2	-	-

\* De verwachte MIC-waarden voor *E. coli* ATCC35218 zijn 4/2 tot 16/8 µg/ml. De kritische MIC-waarden voor enterobacteriaceae voor Amoxicilline-clavulaanzuur zijn ≤ 8/4 µg/ml : S, 16/8 µg/ml : I, ≥ 32/16 µg/ml : R.

De resultaten bekomen met de Vitek worden weergegeven in tabel 4.2.5.

Tabel 4.2.5. Resultaten bekomen met de Vitek voor staal M/7253 (*Escherichia coli*).

Antibioticum	Finaal resultaat			Vitek 2			Vitek 2 compact				
	S	I	R	Meest vermelde MIC waarde	Aantal labo's dat deze MIC waarde vermeldde (Totaal aantal gebruikers)	S	I	R	*	Meest vermelde MIC waarde	Aantal labo's dat deze MIC waarde vermeldde (Totaal aantal gebruikers)
Ampicilline	-	-	58	≥ 32	48 (58)	-	-	17	-	≥ 32	12 (17)
Amoxicilline-clavulaanzuur**	58	-	-	4	44 (58)	17	-	-	-	4	11 (17)
Amikacine	57	-	-	≤ 2	41 (57)	16	-	-	1	≤ 2	12 (17)
Gentamicine	58	-	-	≤ 1	48 (58)	16	-	-	1	≤ 1	12 (17)
Nitrofurantoïne	55	-	-	≤ 16	43 (55)	17	-	-	-	≤ 16	11 (17)
Co-trimoxazole	58	-	-	≤ 20	48 (58)	17	-	-	-	≤ 20	12 (17)
Chinolones											
Ciprofloxacin	39	-	-	≤ 0.25	32 (39)	8	-	-	-	≤ 0.25	5 (8)
Levofloxacin	6	-	-	≤ 0.25	5 (6)	-	-	-	-	-	-
Norfloxacin	17	-	-	≤ 0.5	13 (17)	6	-	-	-	≤ 0.5	5 (6)
Ofloxacin	5	-	-	≤ 0.25	3 (5)	1	-	-	-	≤ 0.25	1 (1)
"Chinolone"	3	-	-	≤ 0.25	2 (3)	3	-	-	-	≤ 0.25	1 (3)

\* Eén laboratorium antwoordde wel het ruw resultaat voor amikacine en gentamicine, maar geen finaal resultaat voor de Vitek 2 compact.

\*\* De verwachte MIC-waarden voor *E. coli* ATCC35218 zijn 4/2 tot 16/8 µg/ml. De kritische MIC-waarden voor enterobacteriaceae voor Amoxicilline-clavulaanzuur zijn ≤ 8/4 µg/ml : S, 16/8 µg/ml : I, ≥ 32/16 µg/ml : R.

In de meeste gevallen is de 'meest vermelde MIC waarde' de enige die vermeld werd door de deelnemers; een aantal laboratoria vermeldden immers de gevonden MIC waarde niet. In enkele gevallen werden ook andere waarden gerapporteerd:

- voor amoxicilline-clavulaanzuur vonden 3 laboratoria een MIC van 8 mg/l met Vitek 2; zowel met Vitek 2 als met Vitek 2 compact vond telkens 1 laboratorium een MIC van ≤ 2 mg/l
- voor amikacine vonden 4 laboratoria een MIC van 4 mg/l en 2 laboratoria een MIC van ≤ 1 mg/l met Vitek 2
- voor nitrofurantoïne vonden 2 deelnemers een MIC van 32 mg/l met Vitek 2; en 1 deelnemer vond een MIC van ≤ 20 mg/l met Vitek 2 compact
- voor norfloxacin vond 1 laboratorium een MIC van ≤ 0.25 mg/l met Vitek 2

De resultaten bekomen met de ATB methode worden weergegeven in tabel 4.2.6. De meeste laboratoria antwoordden enkel het resultaat (S, I of R) en gaven geen waarden weer.

Tabel 4.2.6. Resultaten bekomen met de ATB methode voor M/7253 (*Escherichia coli*).

Antibioticum	Resultaat		
	S	I	R
Ampicilline	-	-	7
Amoxicilline	-	-	2
Amoxicilline-clavulaanzuur	8	1	-
Amikacine	10	-	-
Gentamicine	9	-	-
Nitrofurantoïne	9	-	-
Co-trimoxazole	9	-	-
Chinolones			
Ciprofloxacin	7	-	-
Norfloxacin	5	-	-
«Chinolone»	1	-	-

De resultaten bekomen met Phoenix worden weergegeven in tabel 4.2.7.

Tabel 4.2.7. Resultaten bekomen met de Phoenix voor M/7253 (*Escherichia coli*)

Antibioticum	Resultaat			Meest vermeldde MIC waarde	Aantal labo's dat deze MIC waarde vermeldde (Totaal aantal gebruikers)
	S	I	R		
Ampicilline	-	-	8	> 16	8 (8)
Amoxicilline-clavulaanzuur*	7	1	-	8/4	8 (8)
Amikacine	8	-	-	≤ 8	6 (8)
Gentamicine	8	-	-	≤ 2	8 (8)
Nitrofurantoïne	8	-	-	≤ 16	8 (8)
Co-trimoxazole	8	-	-	≤ 0.5/9.5	8 (8)
Chinolones					
Ciprofloxacin	8	-	-	≤ 0.5	6 (8)
Norfloxacin	1	-	-	< 2	1 (1)

\* De verwachte MIC-waarden voor *E. coli* ATCC35218 zijn 4/2 tot 16/8 µg/ml. Het resultaat «I» is een extrapolatie van een ruw resultaat «S» en komt overeen met een MIC-waarde van 8 µg/ml. De kritische MIC-waarden voor enterobacteriaceae voor Amoxicilline-clavulaanzuur zijn ≤ 8/4 µg/ml : S, 16/8 µg/ml : I, ≥ 32/16 µg/ml : R.

Eén laboratorium verstreekte de antwoorden ≤ 2 voor amikacine en ≤ 0.125 voor ciprofloxacin; een ander laboratorium antwoordde respectievelijk 4 en ≤ 0.13 voor deze beide antibiotica.

De resultaten bekomen met de toestellen Osiris en Sirscan worden weergegeven in tabel 4.2.8. en 4.2.9. Wij stellen vast dat deze toestellen toelaten om uitgaande van de diameter ook de MIC te bepalen; voor de EQC geven sommige laboratoria het resultaat van de MIC-bepaling door, de meeste gebruikers antwoorden enkel de diameter voor de EQC. De laboratoria dienen de EQC op dezelfde wijze behandelen als routine-stalen en dus het «kwantitatief resultaat» door te geven dat zij in routine antwoorden; indien zij in routine ook de MIC-waarde berekenen, zouden zij deze best ook voor de EQC antwoorden. Gezien de resultaten momenteel op verschillende kwantitatieve wijzen doorgegeven worden, zijn er momenteel nog te weinig gebruikers om de kwantitatieve resultaten statistisch zinvol te verwerken. Indien het aantal gebruikers toeneemt, zal dit uiteraard wel het geval zijn.

Tabel 4.2.8. Resultaten bekomen met de Osiris voor staal M/7253 (*Escherichia coli*).

Antibioticum	Resultaat		
	S	I	R
Ampicilline	-	-	6
Amoxicilline-clavulaanzuur	6	-	-
Amikacine	6	-	-
Gentamicine	5	-	-
Nitrofurantoïne	6	-	-
Co-trimoxazole	4	2	-
Chinolones			
Ciprofloxacin	4	-	-
Levofloxacin	2	-	-
Norfloxacin	2	-	-

Tabel 4.2.9. Resultaten bekomen met de Sirscan voor staal M/7253 (*Escherichia coli*).

Antibioticum	Resultaat		
	S	I	R
Ampicilline	-	-	6
Amoxicilline-clavulaanzuur*	6	1	-
Amikacine	7	-	-
Gentamicine	6	-	-
Nitrofurantoïne	7	-	-
Co-trimoxazole	6	-	-
Chinolones			
Ciprofloxacin	3	-	-
Levofloxacin	2	-	-
Norfloxacin	1	-	-
Ofloxacin	1	-	-

\* Het resultaat «I» is een extrapolatie van een ruw resultaat «S» en komt overeen met een diameter buiten de grenzen (43 mm). Alle resultaten «S» komen overeen met diameters die binnen de grenzen liggen voor *E. coli* ATCC35218

Tot slot dient vermeld dat twee laboratoria niet vermeldden welke techniek zij gebruikt hebben ter bepaling van de gevoeligheid voor één of meer antibiotica.

De meeste laboratoria behielden het ruw resultaat voor het antwoorden van het finale resultaat. Toch wijzigden enkele laboratoria het ruw resultaat, al dan niet op basis van expert regels:

- amoxicilline-clavulaanzuur:
  - ♣ S→I
    - Rosco: 2 labo's
    - Phoenix : 1 labo
    - Sirscan : 1 labo

## V. PARASITOLOGIE

### 5.1. De monsters

Er werden 2 fecessuspensies in formol verstuurd: P/7254 en P/7255.

Er namen 180 laboratoria deel aan deze enquête: 180 stuurden een antwoord in voor staal P/7254 en 178 voor staal P/7255. Wij willen vragen om, als u geen parasieten in een staal aantreft, het antwoord «Afwezigheid van parasieten» in te vullen in plaats van geen antwoord te geven.

**Het aantal toolkit gebruikers bedroeg 36%. Wij zouden willen vragen om zoveel mogelijk van deze antwoordmogelijkheid gebruik te maken. Bovendien een snellere verwerking, biedt de toolkit tevens het voordeel dat een aantal fouten vermeden kunnen worden: schrijffouten, gebruik van oudere codes, encodagefouten,...**

De monsters waren vergezeld van volgende klinische inlichtingen:

P/7254:

Een man van 32 jaar heeft 3 weken in Rwanda verbleven.

P/7255:

Een vrouw van 68 jaar keert terug van een rondreis door Zuid-Europa en Noord-Afrika. Na haar terugkeer meldt ze zich bij haar huisarts met diarree en abdominale krampen.

Staal P/7254 bevatte cysten van *Giardia lamblia* en van *Entamoeba histolytica*.

Het bewijs voor de aanwezigheid van *E. histolytica* werd geleverd via PCR; deze methode laat toe *E. histolytica* te differentiëren van *E. dispar*; een onderscheid dat op morfologische basis onmogelijk te maken is. Alle antwoorden die *E. histolytica* en/of *E. dispar* bevatten worden dan ook als correct beschouwd.

In een aantal stalen konden ook cysten van *Blastocystis hominis* aangetroffen worden; gezien de geringere hoeveelheid hiervan, is het mogelijk dat deze in een aantal stalen niet aangetoond konden worden.

Staal P/7255 bevatte geen parasieten.

Beide stalen werden eveneens ter gelegenheid van de enquête 2006/1 verstuurd, respectievelijk als P/6231 en P/6695.



## 5.2. Resultaten

### 5.2.1 Staal P/7254

De 180 laboratoria leverden 406 antwoorden in. 2 laboratoria antwoordden «Afwezigheid van parasieten», 30 laboratoria antwoordden één parasiet, 83 antwoordden 2 parasieten, 54 antwoordden 3 parasieten, 9 laboratoria antwoordden 4 parasieten en 2 laboratoria antwoorden 5 parasieten. De 2 laboratoria die «Afwezigheid van parasieten» geantwoord hebben, hebben vermoedelijk beide stalen omgewisseld.

De resultaten worden in onderstaande tabel weergegeven:

Tabel 5.2.1. Resultaten voor staal P/7254

Resultaat	Aantal
<i>Giardia lamblia</i>	178
<i>Entamoeba histolytica</i>	68
<i>Entamoeba histolytica /dispar</i> <sup>1</sup>	34
<i>Entamoeba dispar</i>	4
<i>Entamoeba coli</i>	10
<i>Entamoeba hartmanni</i>	15
<i>Entamoeba species</i>	11
<i>Entamoeba histolytica /dispar/hartmanni</i> <sup>2</sup>	1
<i>Blastocystis hominis</i>	55
<i>Endolimax nana</i>	15
<i>Cyclospora cayetanensis</i>	5
<i>Iodamoeba butschlii</i>	4
<i>Ascaris lumbricoides</i>	2
<i>Isospora belli</i>	2
Afwezigheid van parasieten <sup>3</sup>	2
Total	406

<sup>1</sup> Deze 34 laboratoria hebben geantwoord dat het onmogelijk is *E. histolytica* en *E. dispar* op morfologische basis te onderscheiden; een groot aantal onder hen zouden in routine het staal doorsturen naar het referentiecentrum (het Instituut voor Tropische Geneeskunde te Antwerpen), al dan niet met de vermelding dat een PCR hiervoor noodzakelijk is.

<sup>2</sup> Dit laboratorium vermeldde dat voor differentiatie tussen *E. histolytica*, *E. dispar* en *E. hartmanni*, de stalen steeds naar het referentiecentrum verstuurd worden.

<sup>3</sup> Wellicht hebben deze beide laboratoria de twee stalen omgewisseld.

De combinaties van parasieten welke door de laboratoria geantwoord werden, worden in onderstaande tabellen weergegeven.

Tabel 5.2.2. Combinatie van 2 parasieten geantwoord voor staal P/7254

Combinatie van parasieten	Aantal
<i>Giardia lamblia</i> + <i>Entamoeba histolytica</i>	41
<i>Giardia lamblia</i> + <i>E. histolytica</i> / <i>dispar</i>	12
<i>Giardia lamblia</i> + <i>Entamoeba species</i>	8
<i>Giardia lamblia</i> + <i>E. dispar</i>	3
<i>Giardia lamblia</i> + <i>Entamoeba coli</i>	3
<i>Giardia lamblia</i> + <i>Entamoeba hartmanni</i>	1
<i>Giardia lamblia</i> + <i>Blastocystis hominis</i>	11
<i>Giardia lamblia</i> + <i>Ascaris lumbricoides</i>	1
<i>Giardia lamblia</i> + <i>Cyclospora cayetanensis</i>	1
<i>Giardia lamblia</i> + <i>Iodamoeba butschlii</i>	1
<i>Giardia lamblia</i> + <i>Isospora belli</i>	1
<b>Totaal</b>	<b>83</b>

Tabel 5.2.3. Combinatie van 3 parasieten geantwoord voor staal P/7254

Combinatie van parasieten	Aantal
<i>Giardia lamblia</i> + <i>Entamoeba histolytica</i> + <i>Blastocystis hominis</i>	13
<i>Giardia lamblia</i> + <i>Entamoeba histolytica</i> + <i>Entamoeba hartmanni</i>	2
<i>Giardia lamblia</i> + <i>Entamoeba histolytica</i> + <i>Endolimax nana</i>	4
<i>Giardia lamblia</i> + <i>Entamoeba histolytica</i> + <i>Iodamoeba butschlii</i>	1
<i>Giardia lamblia</i> + <i>E. histolytica</i> / <i>dispar</i> + <i>Blastocystis hominis</i>	13
<i>Giardia lamblia</i> + <i>E. histolytica</i> / <i>dispar</i> + <i>Entamoeba hartmanni</i>	2
<i>Giardia lamblia</i> + <i>E. histolytica</i> / <i>dispar</i> + <i>Endolimax nana</i>	3
<i>Giardia lamblia</i> + <i>E. histolytica</i> / <i>dispar</i> + <i>Cyclospora cayetanensis</i>	2
<i>Giardia lamblia</i> + <i>E. histolytica</i> / <i>dispar</i> /hartmanni + <i>Entamoeba coli</i>	1
<i>Giardia lamblia</i> + <i>Entamoeba species</i> + <i>Blastocystis hominis</i>	2
<i>Giardia lamblia</i> + <i>Entamoeba hartmanni</i> + <i>Entamoeba coli</i>	2
<i>Giardia lamblia</i> + <i>Entamoeba hartmanni</i> + <i>Blastocystis hominis</i>	2
<i>Giardia lamblia</i> + <i>Entamoeba coli</i> + <i>Cyclospora cayetanensis</i>	1
<i>Giardia lamblia</i> + <i>Entamoeba coli</i> + <i>Endolimax nana</i>	1
<i>Giardia lamblia</i> + <i>Endolimax nana</i> + <i>Blastocystis hominis</i>	3
<i>Giardia lamblia</i> + <i>Endolimax nana</i> + <i>Iodamoeba butschlii</i>	1
<i>Giardia lamblia</i> + <i>Blastocystis hominis</i> + <i>Ascaris lumbricoides</i>	1
<b>Totaal</b>	<b>54</b>

Tabel 5.2.4. Combinatie van 4 parasieten geantwoord voor staal P/7254

Combinatie van parasieten	Aantal
<i>Giardia lamblia</i> + <i>Entamoeba histolytica</i> + <i>Entamoeba hartmanni</i> + <i>Blastocystis hominis</i>	3
<i>Giardia lamblia</i> + <i>Entamoeba histolytica</i> + <i>Entamoeba coli</i> + <i>Blastocystis hominis</i>	1
<i>Giardia lamblia</i> + <i>Entamoeba histolytica</i> + <i>Endolimax nana</i> + <i>Blastocystis hominis</i>	1
<i>Giardia lamblia</i> + <i>Entamoeba histolytica</i> + <i>Blastocystis hominis</i> + <i>Isospora belli</i>	1
<i>Giardia lamblia</i> + <i>E. dispar</i> + <i>Entamoeba hartmanni</i> + <i>Endolimax nana</i>	1
<i>Giardia lamblia</i> + <i>E. histolytica</i> / <i>dispar</i> + <i>Blastocystis hominis</i> + <i>Iodamoeba butschlii</i>	1
<i>Giardia lamblia</i> + <i>Entamoeba</i> species + <i>Endolimax nana</i> + <i>Blastocystis hominis</i>	1
Totaal	9

Tabel 5.2.5. Combinatie van 5 parasieten geantwoord voor staal P/7254

Combinatie van parasieten	Aantal
<i>Giardia lamblia</i> + <i>Entamoeba histolytica</i> + <i>Entamoeba hartmanni</i> + <i>Entamoeba coli</i> + <i>Blastocystis hominis</i>	1
<i>Giardia lamblia</i> + <i>E. histolytica</i> / <i>dispar</i> + <i>Entamoeba hartmanni</i> + <i>Blastocystis hominis</i> + <i>Cyclospora cayetanensis</i>	1
Totaal	2

De door de laboratoria geantwoorde evolutiestadia voor *Giardia lamblia* worden in volgende tabel weergegeven. Twee laboratoria hebben 2 evolutiestadia voor *Giardia lamblia* geantwoord. De 3 laboratoria die «rhabditoïde larve» als evolutiestadium geantwoord hebben, hebben waarschijnlijk oude codes gebruikt; wij wensen te benadrukken dat men steeds de meest recente codes moet gebruiken; in geval men hier niet meer over beschikt, kan men steeds een nieuw exemplaar aanvragen; tevens staan deze codes op onze website op de pagina:

[http://www.iph.fgov.be/ClinBiol/bckb33/activities/external\\_quality/\\_nl/parasitologie.htm](http://www.iph.fgov.be/ClinBiol/bckb33/activities/external_quality/_nl/parasitologie.htm)

en vervolgens klikt men op «codes». Het gebruik van de toolkit vermijdt dit probleem aangezien men hier de naam en evolutiestadia van de parasiet kan kiezen uit een aflopende lijst.

Tabel 5.2.6. Evolutiestadia voor *Giardia lamblia* voor staal P/7254

Evolutiestadium	Aantal laboratoria
Cyste	173
Rhabditoïde larve	3
Oöcyste	2
Trofozoïet	1
Vegetatieve vorm	1
<b>Totaal</b>	<b>180</b>

Alle laboratoria die *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba dispar* of *Entamoeba* species geantwoord hebben, hebben als evolutiestadium «cyste» geantwoord. Van de 34 laboratoria die *Entamoeba histolytica/dispar* geantwoord hebben, hebben 32 «cyste» geantwoord en 2 «rhabditoïde larve»; dit betreft vermoedelijk eveneens laboratoria die oude codes gebruikt hebben.

De door de laboratoria geantwoorde evolutiestadia voor *Blastocystis hominis* worden in volgende tabel weergegeven.

Tabel 5.2.7. Evolutiestadia voor *Blastocystis hominis* voor staal P/7254

Evolutiestadium	Aantal laboratoria
Cyste	44
Niet gepreciseerd	8
Oöcyste	1
Rhabditoïde larve	1
Vegetatieve vorm	1
<b>Totaal</b>	<b>55</b>

### 5.2.1 Staal P/7255

De 178 laboratoria leverden 184 antwoorden in. 164 laboratoria antwoordden «Afwezigheid van parasieten», 11 laboratoria antwoordden één parasiet, 1 laboratorium antwoordde 2 parasieten, 1 antwoordde 3 parasieten en 1 antwoordde 4 parasieten. Deze 2 laatste laboratoria hebben waarschijnlijk beide stalen verwisseld.

De antwoorden worden in onderstaande tabel weergegeven:

Tabel 5.2.8. Antwoorden voor staal P/7255

Parasiet	Aantal
Afwezigheid van parasieten	164
<i>Ascaris lumbricoides</i>	3
<i>Blastocystis hominis</i>	3
<i>Cyclospora cayetanensis</i>	2
<i>Entamoeba hartmanni</i>	2
<i>Entamoeba histolytica</i>	2
<i>Giardia lamblia</i>	2
<i>Strongyloides stercoralis</i>	2
<i>Dicrocoelium dendriticum</i>	1
<i>Endolimax nana</i>	1
<i>Entamoeba species</i>	1
<i>Fasciola hepatica</i>	1
Totaal	184

### 5.3. Vergelijking met de resultaten van de enquête 2006/1 parasitologie

Dezelfde stalen werden (onder de staalnummers P/6231 en P/6695) reeds verstuurd in de enquête 2006/1. In onderstaande tabel vindt u een vergelijking van de correcte resultaten van beide enquêtes.

Tabel 5.3.1. Vergelijking van de correcte resultaten van de enquêtes 2006/1 en 2007/1: de % geven het aantal laboratoria weer dat de betreffende parasiet weergevonden hebben; hoewel *B. hominis* niet in alle stalen terug gevonden kon worden, geven wij het % ervan hier, ter inlichting, toch aan.

N labos: 189 (P/6231), 189 (P/6695), 180 (P/7254), 178 (P/7255)

	P/6231 (2006/1)	P/7254 (2007/1)
<i>Giardia lamblia</i>	97,9%	98,9%
<i>Entamoeba histolytica</i>	28,6%	37,8%
<i>Entamoeba histolytica /dispar</i>	12,2%	18,9%
<i>Entamoeba dispar</i>	2,1%	2,2%
<i>Entamoeba species</i>	6,3%	6,1%
<i>Blastocystis hominis</i>	26,4%	30,6%
	P/6695 (2006/1)	P/7255 (2007/1)
Afwezigheid van parasieten	86,8%	92,1%

#### 5.4. Commentaar op de resultaten van de enquête 2007/1 parasitologie

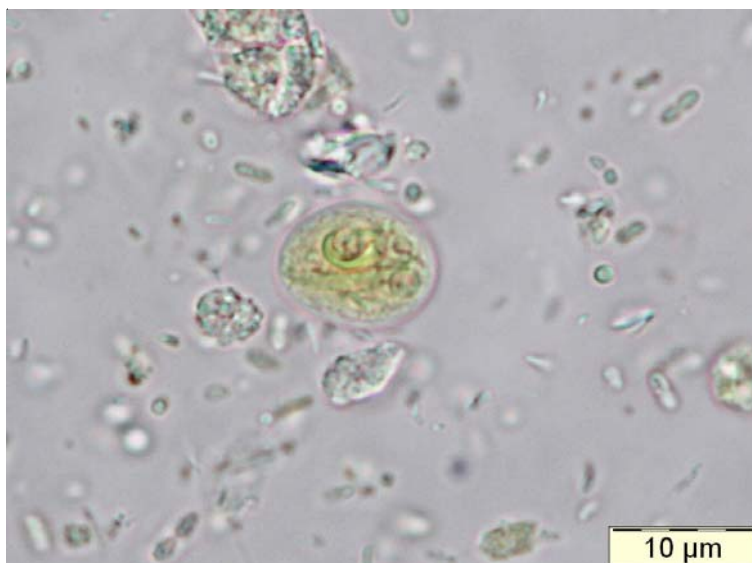
Wij verwijzen voor de bespreking eveneens naar de globale rapporten van 2006/1 en 2002/3 voor *Entamoeba histolytica* en 2006/1, 2005/3 en 2003/3 voor *Giardia lamblia*.

##### P/7254

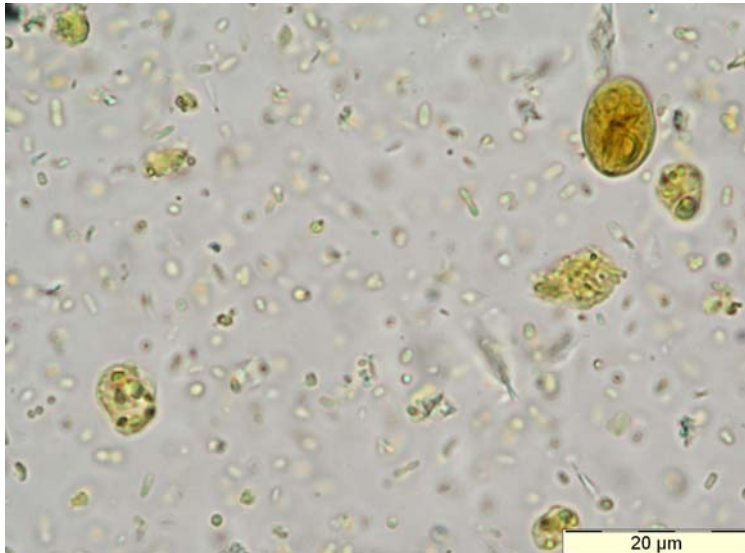
178 laboratoria op 180 hebben *Giardia lamblia* geantwoord. 173 maal werd er gespecificeerd dat het cysten van *G. lamblia* betrof. Deze cysten vertoonden, alhoewel het staal vrij oud was, de typische kenmerken. De ovale cyste met een fijne scherpe rand van *G. lamblia* bevat twee opgeplooide trofozoïeten elk met twee kernen zodat we in totaal 2 x 2 kernen kunnen waarnemen en een centraal gelegen flagellenbundel. Het is zeer moeilijk om op niet gekleurde preparaten al deze elementen te zien en nog moeilijker om ze te fotograferen ondermeer wegens de beperkte dieptescherpte van de objectieven (figuur 1, 2 en 3).



Figuur 1: Cyste van *Giardia lamblia* in staal P/7254. Twee kernen zijn duidelijk zichtbaar.

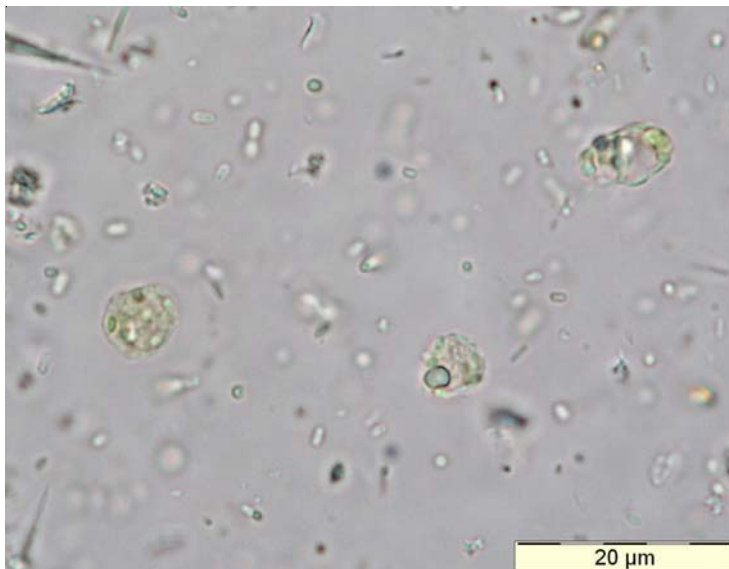


Figuur 2: Cyste van *Giardia lamblia* in staal P/7254. Eén kern is zichtbaar.



Figuur 3: Links trofozoïet van *Blastocystis hominis* en rechts bovenaan cyste van *Giardia lamblia* in staal P/7254. Twee kernen zijn zichtbaar in deze cyste.

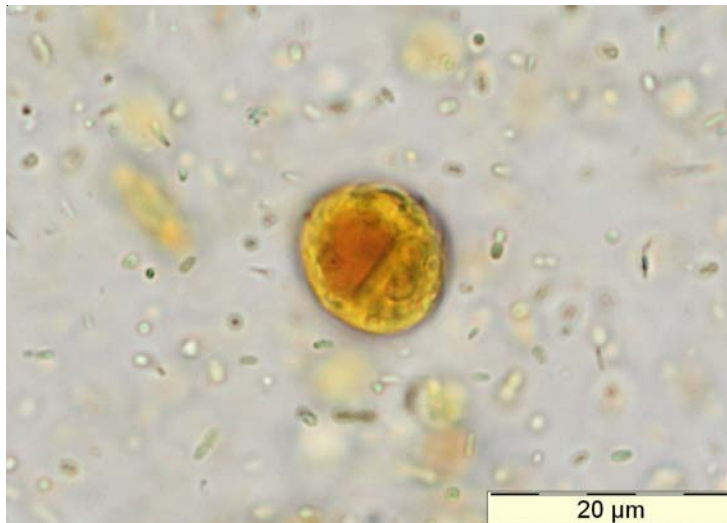
55 laboratoria vermeldden eveneens de aanwezigheid van trofozoïeten van *Blastocystis hominis*. Deze waren minder talrijk dan de *G. lamblia* maar steeds herkenbaar (Figuur 3 en 4).



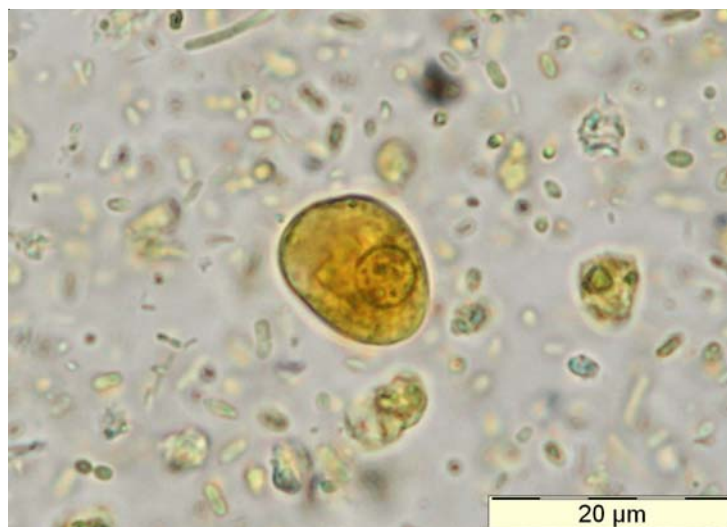
Figuur 4: Twee trofozoïeten van *Blastocystis hominis* in staal P/7254. De perifere kernen zijn zichtbaar.



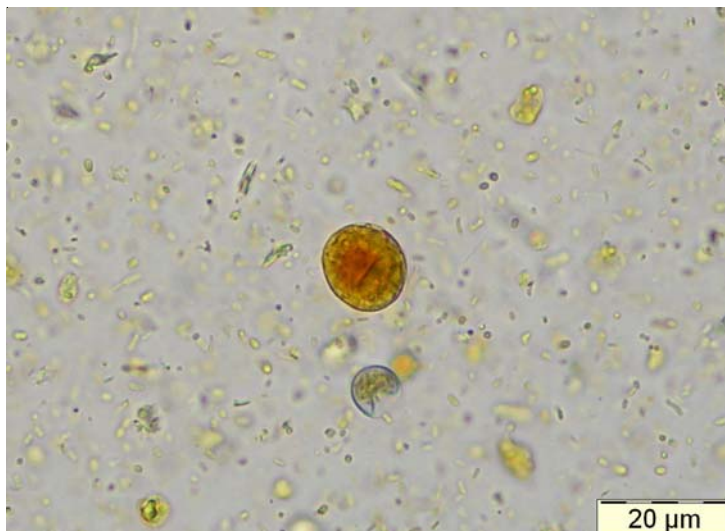
106 laboratoria hebben *Entamoeba histolytica* en/of *dispar* gevonden (figuur 5, 6 en 7). De cysten (10-20  $\mu\text{m}$  en één tot vier kernen met gewoonlijk een centraal karyosoom) van deze twee amoeben zijn morfologisch niet te onderscheiden. Aangezien enkel de eerste pathogeen is zal een onderscheid veelal nuttig zijn. Dit onderscheid kan worden gemaakt ondermeer met PCR (beschikbaar in het laboratorium van het Instituut voor Tropische Geneeskunde te Antwerpen).



Figuur 5: Cyste ( $> 10 \mu\text{m}$ ) van *Entamoeba histolytica/dispar* in staal P/7254. Twee kernen en een ioodvacuool zijn duidelijk zichtbaar.



Figuur 6: Cyste ( $> 10 \mu\text{m}$ ) van *Entamoeba histolytica/dispar* in staal P/7254. Eén grote ronde kern is duidelijk zichtbaar.



Figuur 7: Cyste ( $> 10 \mu\text{m}$ ) van *Entamoeba histolytica/dispar* in staal P/7254. Eén chromatinestaaf en een ioodvacuool zijn zichtbaar.

### P/7255

In dit staal waren er geen parasitaire elementen aanwezig. Zoals in 2006 (staal P/6695) kon men af toe rechthoekige (gelijkend op arthrosporen) *Geotrichum*-like elementen aantreffen (figuur 8). *Geotrichum* sp. kon niet bevestigd worden omdat er geen fungale kweek werd ingezet alvorens het staal te fixeren met formol.



Figuur 8: *Geotrichum*-like rechthoekige arthrospore in staal P/7255.

M. Lontie, MCH, Leuven, K. Vernelen en L. Sourdeau, WIV, Brussel

## VI. SEROLOGIE

### 6.1 Beschrijving van de monsters

Er werden 2 stalen rondgestuurd.

Er was 1 gelyofiliseerd plasmamonster, S/6387 waarop antistoffen tegen Rubella bepaald dienden te worden.

Het staal was vergezeld van volgende klinische inlichtingen:

«Een jonge vrouw biedt zich aan bij haar huisarts voor een pre-zwangerschapsonderzoek. Zij kan zich niet meer herinneren of zij als kind gevaccineerd werd voor Rubella. De arts neemt een bloedstaal af ter controle van de antistoffen.»

Dit staal werd negatief bevonden door sommige referees en borderline positief door andere referees. Dit staal werd verstuurd om te evalueren wat de resultaten voor dit staal waren met de kits beschikbaar op de Belgische markt.

Er was 1 gelyofiliseerd plasmamonster, S/7075 waarop antistoffen tegen Borrelia bepaald dienden te worden.

Het staal was vergezeld van volgende klinische inlichtingen:

S/7075:

«Patiënt, die 5 dagen na de extractie van een teek door de behandelende geneesheer in juli 2005 klachten had van koorts (39°C), hoofdpijn en spierpijn.»

De verwachte interpretatie was: «Afwezigheid van antistoffen.»

Dit staal bevatte wel antistoffen tegen anaplasrose (cfr. commentaar op de resultaten).

## 6.2 Rubella

### 6.2.1 De deelnemers

171 laboratoria stuurden hun enquêteformulier terug. Ze voerden 333 testen uit.

12 laboratoria voerden 1 test uit, 157 laboratoria voerden 2 testen uit, 1 laboratorium 3 testen en 1 laboratorium 4 testen.

Alle laboratoria die 1 test uitvoerden bepaalden de IgG antistoffen. 156 laboratoria die 2 bepalingen uitvoerden bepaalden IgG en IgM; 1 laboratorium bepaalde totale antistoffen en IgM.

Het laboratorium dat 3 bepalingen uitvoerde bepaalde totale antistoffen, IgG en IgM; het laboratorium dat 4 bepalingen uitvoerde tenslotte bepaalde 2 maal IgG en 2 maal IgM (met verschillende methoden).

In totaal werden dus 171 bepalingen van IgG, 160 van IgM en 2 bepalingen van totale antistoffen uitgevoerd.

Eén laboratorium bepaalde de IgG en IgM 2 maal met dezelfde technieken (met dezelfde kwalitatieve en vergelijkbare kwantitatieve resultaten); we hebben dit laboratorium hierboven gerangschikt onder de groep die 2 bepalingen uitvoerde.

De firma Euribel stuurde de resultaten in van de Mikrogen IgG blottesten met de nadrukkelijke opmerking dat deze testen alleen geen interpretatie toelaten maar dat hiervoor ELISA testen voor IgG (en IgM) noodzakelijk zijn.

### 6.2.2 Gebruikte reagentia

#### 6.2.2.1 Voor de totale antistoffen

De beide laboratoria die de totale antistoffen bepaalden, gebruikten hiervoor de Rubella hemagglutinatie inhibitie kit van Dade Behring.

#### 6.2.2.2 Voor de IgG

Tabel 6.2.1. Reagentia gebruikt voor de bepaling van Rubella IgG

Fabrikant	Kit	S/6387
Abbott	AxSYM Rubella IgG	62
Beckman (verdelers Analis)	Access Rubella IgG	24
	DxI Rubella IgG	1
	LXi Rubella IgG	1
bioMérieux	VIDAS Rub IgG II	31
	VIDIA Rub IgG	3
DiaSorin	Liaison Rubella IgG	24
	ETI-RUBEK-G Plus	2
Ortho	Vitros immunodiagnosics products Rubella IgG	1
Siemens (Bayer)	ADVIA Centaur Rubella IgG	15
Siemens (DPC)	Immulite Rubella IgG	7
Totaal		171

### 6.2.2.3 Voor de IgM

Tabel 6.2.2. Reagentia gebruikt voor de bepaling van Rubella IgM

Fabrikant	Kit	S/6387
Abbott	AxSYM Rubella IgM	55
Beckman (verdelers Analis)	Access Rubella IgM	21
	DxI Rubella IgM	1
	LXi Rubella IgM	1
bioMérieux	VIDAS Rub IgM	30
	VIDIA Rub IgM	5
DiaSorin	Liaison Rubella IgM	24
	ETI-RUBEK-M Reverse Plus	2
Siemens (Bayer)	ADVIA Centaur Rubella IgM	14
Siemens (DPC)	Immulite Rubella IgM	7
Totaal		160

## 6.2.3 Resultaten

### 6.2.3.1 Opmerking betreffende het staal

Dit staal werd negatief bevonden door sommige referees en borderline positief door andere referees. Dit staal werd verstuurd om te evalueren wat de resultaten voor dit staal waren met de kits beschikbaar op de Belgische markt.

### 6.2.3.2 Totale antistoffen

De beide laboratoria die de totale antistoffen bepaalden, vonden deze negatief.

### 6.2.3.3 IgG

De resultaten van de IgG bepaling zijn weergegeven in tabel 6.2.3.

Tabel 6.2.3. Resultaten van Rubella IgG voor staal S/6387

Resultaat	Aantal laboratoria
Negatief	89
Positief	44
Borderline	38
Totaal	171

De positieve resultaten werden bekomen met de kits AxSYM Rubella IgG (36) en ADVIA Centaur Rubella IgG (8).

De borderline resultaten werden bekomen met de kits AxSYM Rubella IgG (25), ADVIA Centaur Rubella IgG (7), VIDIA Rub IgG (3), Access Rubella IgG (1), LXi Rubella IgG (1) en Immulite Rubella IgG (1).

Het blijkt met andere woorden dat 61/62 gebruikers van de kit AxSYM Rubella IgG, en alle gebruikers van de kits ADVIA Centaur Rubella en VIDIA Rub IgG een «niet-negatief» resultaat bekwamen. Dit gegeven wordt verder besproken in het commentaar op de enquête (cfr. hoofdstuk 6.2.4). Tevens werden de betrokken firmas gecontacteerd om dit nader te onderzoeken. Het onderzoek van de firma bioMérieux bevestigde het "equivocal" resultaat bekomen met de kit de VIDIA Rub IgG en het negatieve resultaat bekomen met de kit VIDAS Rub IgG, evenals de resultaten bekomen met verschillende andere kits.

Het onderzoek van de firma Siemens bevestigde eveneens de borderline positiviteit van het staal met hun kit: "The assay (Centaur test) is certainly meeting performance claims and detected this sample as a borderline positive, as it should, and as nearly all AxSym installations did".

Ook het onderzoek van de firma Abbott bevestigde deze resultaten: "We performed calibrations across several AxSYM instruments, and tested several replicates of the returned proficiency sample, using an approved lot of AxSYM Rubella IgG.

All of the materials used for these tests were stored here at Abbott. The calibration runs were performed per the assay package insert. No system or assay error codes were observed. All replicates of the proficiency sample generated either grayzone (6/18 replicates) or positive (12/18 replicates) results. Since the evaluation of your proficiency sample generated grayzone/positive results, we performed further testing to determine if the AxSYM Rubella IgG reagent is performing acceptably. We performed calibrations across several AxSYM instruments and tested several replicates of two in-house panels (one panel was a known negative and the second panel was a known positive). All instrument calibrations and panel replicates met specifications. Therefore, there is no indication that the AxSYM Rubella IgG assay is performing contrary to it's intended use."

Deze resultaten van de verschillende firma's bevestigen dus dat dit staal in functie van de techniek verschillende resultaten kan geven (cfr. de bespreking in hoofdstuk 6.2.4).

Ter informatie geven wij in tabel 6.2.4. een overzicht van de mediaan, minimum en maximum voor de AxSYM Rubella IgG en ADVIA Centaur Rubella in functie van het kwalitatieve resultaat (indien de laboratoria een kwantitatief resultaat weergaven).

Tabel 6.2.4. Mediaan, minimum en maximum bekomen voor IgG voor staal S/6387 voor AxSYM Rubella IgG en ADVIA Centaur Rubella IgG in functie van het kwalitatieve resultaat.

Kit (eenheid)	Kwalitatief resultaat	N labo's	Mediaan	Minimum	Maximum
AxSYM Rubella IgG (IU/ml)	Positief	36	12,05	10	20,5
	Borderline	25	9,6	6,9	11
	Negatief	1	7	7	7
ADVIA Centaur Rubella IgG (IU/ml)	Positief	8	10,45	10,1	18,3
	Borderline	6	9,85	8,5	10,8

#### 6.2.3.4 IgM

Alle laboratoria bekwamen een negatief resultaat voor de IgM bepaling.

Eén laboratorium dat de IgM wel bepaalde, vermeldde in een opmerking: «Er wordt meermaals geadviseerd om zeker geen Rubella IgM bepaling uit te voeren zonder verdachte kliniek, dus zeker niet ter controle voor vaccinatiestatus».

Wij wensen te benadrukken dat wij aan de laboratoria vragen enkel deze testen uit te voeren welke zij in routine ook voor een dergelijk type staal zouden uitvoeren; het staat de labo's dus vrij om geen IgM uit te voeren indien zij dit in routine niet uitvoeren op dergelijk staal.



6.2.3.5 Interpretatie  
Een overzicht van de interpretaties wordt weergegeven in tabel 6.2.5.

Tabel 6.2.5. Interpretaties voor staal S/6387

Interpretatie	Aantal laboratoria
Geen immuniteit	102
Geen immuniteit; toedienen booster indien zwangerschap negatief	1
Geen immuniteit + Geen indicatie in de anamnese voor bepaling van Rubella IgM antistoffen	1
Geen immuniteit of Mogelijkheid van een recente infectie <sup>1</sup>	1
Immuniteit	41
Zwakke immuniteit	3
Lage immuniteit; boostervaccinatie te overwegen	1
Grenswaarde immuniteit	3
Twijfelachtige immuniteit	2
Twijfelachtige immuniteit; vaccinatie aanbevolen <sup>2</sup>	3
Lage IgG waarde: immuniteit niet met zekerheid te garanderen	4
Lage IgG; immuniteit niet te garanderen; controle + vaccinatie indien lage waarde geconfirmeerd wordt <sup>3</sup>	4
Onvoldoende immuniteit. Hervaccinatie wenselijk	1
Te controleren op een nieuw staal na 3 weken	1
Vermoedelijk immuniteit bij suggestieve kliniek of recent contact met Rubella patiënt. Graag controlestaal na +/- 2 weken	1
Geen interpretatie <sup>4</sup>	2
Totaal	171

<sup>1</sup> Dit laboratorium bepaalde enkel de IgG (en vond deze negatief).

<sup>2</sup> Eén van deze laboratoria gaf aan dat de vaccinatie onder gebruik van contraceptiva dient te gebeuren en minimum 1 maand voor de conceptie.

<sup>3</sup> Eén van deze laboratoria vermeldde dat «Op het ogenblik van vaccinatie mogen zij niet zwanger zijn en zwangerschap moet uitgesloten worden tot 2 maanden na vaccinatie»

<sup>4</sup> Twee laboratoria hebben de interpretatie opengelaten; het ene laboratorium heeft enkel IgG bepaald (borderline resultaat); het andere IgG (positief resultaat) en IgM (negatief resultaat).

Alle laboratoria die een negatief resultaat bekwamen voor de IgG gaven de interpretatie «geen immuniteit», al dan niet vergezeld van een aanvulling (cfr. tabel 6.2.5.)

Van de 44 laboratoria die een positief resultaat bekwamen voor de IgG gaven er 42 een interpretatie die naar «immuniteit» verwijst («immuniteit», «zwakke immuniteit», «lage immuniteit; boostervaccinatie te overwegen»); 1 laboratorium antwoordde «geen immuniteit» en 1 laboratorium gaf geen interpretatie weer. Van de 38 laboratoria die een borderline resultaat bekwamen voor de IgG, gaven er 15 de interpretatie «geen immuniteit» en 1 de interpretatie «immuniteit» zonder aanvulling; 1 laboratorium gaf geen interpretatie. De overige 21 laboratoria gaven 1 van de andere in tabel 6.2.5. opgenomen interpretaties.



## 6.2.4 Commentaar op de resultaten van het onderzoek

### **Inleiding**

Door een goede vaccinatie campagne in België zijn de meeste personen immuun. De serologie wordt hoofdzakelijk gebruikt voor het bepalen van de immuniteit bij zwangere vrouwen. Vandaar het belang om op een adequate manier, immune van niet immune patiënten te onderscheiden.

### **Klinische inlichtingen**

«Een jonge vrouw biedt zich aan bij haar huisarts voor een pre-zwangerschapsonderzoek. Zij kan zich niet meer herinneren of zij als kind gevaccineerd werd voor Rubella. De arts neemt een bloedstaal af ter controle van de antistoffen.»

### **Bespreking rubella resultaten**

#### **IgG**

89 van de 171 laboratoria (52%) rapporteerden het staal als negatief voor IgG. De andere labo's vonden een positief (n = 44, 26%) of borderline positief resultaat (n = 38; 22%). Opvallend is dat alle positieve resultaten werden bekomen met de AxSYM Rubella IgG en de ADVIA Centaur Rubella IgG.

Van de 11 geteste kits waren er slechts 2 die positieve resultaten vertoonden en 6 borderline positieve resultaten. Wanneer we kijken naar de resultaten in functie van de gebruikte kits dan zien we dat 61 op de 62 gebruikers van AxSYM niet negatief antwoordden, en voor ADVIA Centaur was dat bij alle gebruikers het geval.

Het is gekend dat wanneer verschillende kits gebruikt worden om borderline positieve stalen te testen, de resultaten kunnen variëren van negatief naar positief en dit afhankelijk van de gebruikte test. De reden hiervoor is de cut off waarde die door de fabrikanten worden gekozen. Sommigen verkiezen een eerder lagere cut off voor hun test en beschouwen hun kit als «gevoeliger» voor de detectie van antistoffen, anderen nemen een ietwat hogere cut off waardoor dergelijke stalen eerder negatief worden gevonden. Beide opties bieden zowel voor als nadelen.

Hoewel dergelijke probleem stalen in de routine weinig frequent voorkomen, is het toch belangrijk genoeg om de aandacht erop te vestigen. Het kan aanleiding geven tot verkeerde interpretaties wanneer patiënten zich laten testen in verschillende laboratoria. Bij discordante resultaten tussen de laboratoria is het dus noodzakelijk om na te gaan met welke technieken de stalen werden getest. Een goede kennis van de test eigenschappen van de kit kan in vele gevallen nutteloze bijkomende testen en ongerustheid bij de patiënten vermijden.

Uit deze kwaliteitscontrole blijkt dat AxSYM en ADVIA duidelijker «gevoeliger» zijn dan de andere kits op de markt. De variatie in de resultaten bekomen met deze 2 kits varieert tussen borderline/negatief en duidelijk positief. Een variatie die toch wel voor problemen kan zorgen.

Het zou nuttig kunnen zijn om na te gaan of een dergelijke variatie te wijten is aan staal specifieke factoren (patiënt, bewaring), of aan de performantie van de kits. Deze vraag moet dus gesteld worden aan de betreffende fabrikanten.

De VIDIA Rub IgG lijkt eveneens tot de «gevoelige» generatie te behoren gezien de 3 labo's die deze techniek gebruikten een borderline positieve waarde vonden.

### **IgM**

Er waren geen problemen met de IgM bepalingen, ze waren allemaal negatief

### **Interpretatie**

Patiënten waarvan het serologisch resultaat voor IgG antistoffen zich bevindt in de grijze zone, moeten beschouwd worden als niet immuun voor Rubella. Bij deze patiënten kan een vaccinatie worden aangeraden. Er wordt aangenomen dat een eenmalige toediening van het vaccin voldoende is, en dat het controleren van de serologie na vaccinatie niet echt noodzakelijk is.

### **Aanbevelingen**

1. Alhoewel er geen congenitaal Rubella syndroom wordt beschreven na accidentele vaccinatie tijdens de zwangerschap wordt er toch aangeraden om maatregelen te nemen om niet zwanger te worden binnen de eerste 4 weken na vaccinatie.
2. Het vaccineren van een vrouw in de periode onmiddellijk na de bevalling, net voor zij de materniteit verlaat, laat toe het aantal vrouwen te verminderen die het risico lopen een infectie door te maken tijdens een volgende zwangerschap. Deze strategie wordt in ons land door een groot aantal gynaecologen toegepast.

Anne Naessens, AZ VUB, Brussel

## 6.3 Borrelia

### 6.3.1 Informatie betreffende de verstuurde stalen

Het staal S/7075 werd opgestuurd voor de bepaling van anti-Borrelia antistoffen vanuit didactische gronden. Het staal was immers negatief op anti-Borrelia antistoffen (bewezen door leden van het expert comité aan de hand van blottechnieken), maar bevatte anti-anaplasrose antistoffen. Het doel van deze EKE was om na te gaan of er kruisreacties optraden met bepaalde kits voor deze anti-anaplasrose antistoffen en de laboratoria vertrouwd te maken met het bestaan van deze kruisreacties.

### 6.3.2. De deelnemers

140 laboratoria stuurden hun enquêteformulier terug. Ze voerden 215 testen uit op staal S/7075.

75 laboratoria voerden 1 test uit, 57 laboratoria voerden 2 testen uit, 6 laboratoria 3 testen en 2 laboratoria 4 testen.

De uitgevoerde testen kunnen als volgt gegroepeerd worden:

- IgG+M (één kit die beide antistoffen tegelijkertijd bepaalt):
  - «algemene» antistofbepaling
  - bepaling van specifiek tegen het C6 proteïne gerichte antistoffen
- IgG:
  - ELISA, EIA, IFA, ELFA,...
  - blot bepalingen (immunoblot, dot blot, western blot)
- IgM:
  - ELISA, EIA, IFA, ELFA,...
  - blot bepalingen (immunoblot, dot blot, western blot)

(NB In de verdere bespreking van de verwerking zijn de ELISA, EIA, IFA, ELFA, ... technieken gegroepeerd onder de benaming «niet-blot» om de leesbaarheid te vergemakkelijken)

De verdeling van deze testen is als volgt:

Staal S/ 7075:

- IgG+M:	81
- «algemeen»:	74
- anti-C6:	7
- IgG:	67
- «niet-blot»:	64
- blot:	3
- IgM:	67
- «niet-blot»:	64
- blot:	3

De verdeling van de gebruikte testen in functie van de gebruikte technieken wordt weergegeven in tabel 6.3.1.

Tabel 6.3.1. Verdeling der gebruikte testen in functie van de techniek voor bepaling van anti-Borrelia antistoffen, enquête 2007/1, staal 7075

Aantal testen	Aard kit	Type techniek	S/7075
1 test	Tot As	Algemeen anti-C6	69
2 testen	IgG en IgM	nietblot - nietblot	6
		blot - blot	56
3 testen	Tot As en IgG en IgM	algemeen- nietblot - nietblot	1
		algemeen- blot - blot	4
		antiC6 - nietblot - nietblot	1
4 testen	IgG en IgG en IgM en IgM	nietblot - blot - nietblot - blot	1
		nietblot - nietblot - nietblot - nietblot	1

### 6.3.3 Gebruikte reagentia

#### 6.3.3.1 Voor de totale As (alle methoden samen)

Tabel 6.3.2.: Reagentia gebruikt voor de bepaling van Borrelia totale antistoffen.

Fabrikant	Kit	S/7075
bioMérieux	VIDAS Lyme IgG+IgM	69
	VIDIA Lyme IgG+IgM	1
Genbio (BMD)	Borrelia (Lyme G + M) EIA	1
Immunitics		
(verdelers Lucron)	C6 B. burgdorferi (Lyme) ELISA	7
Virion/Serion		
(verdelers Labconsult)	Rapid Scope Borrelia IgG/IgM	3
Total		81

#### 6.3.3.2 Voor IgG (alle methoden samen)

Hoewel een aantal kits de benaming IgG+IgM vermelden, laten zij toch toe om IgG en IgM afzonderlijk te bepalen. Deze kits worden dan ook onder IgG en IgM afzonderlijk vermeld.

Tabel 6.3.3.: Reagentia gebruikt voor de bepaling van Borrelia IgG.

Fabrikant	Kit	S/7075
Alphadia	Vir Elisa anti-Borrelia IgG/IgM	1
Biognost	Borrelia burgdorferi IFA IgG	1
Dade Behring	Enzygnost Borreliosis	9
	Enzygnost Lyme link	2
Dako	IDEIA Borrelia burgdorferi, IgG	1
Diasorin	Liaison Borrelia IgG	31
	Borrelia burgdorferi IgG Elisa	1
Euroimmun		
(verdelers Biognost)	Borrelia burgdorferi IgG Elisa	13
	Euroline WB IgG	2
Genbio (BMD)	Dot Blot Borrelia IgG	1
Hycor Biomedical	Borrelia burgdorferi IgG	1
Mikrogen		
(verdelers Euribel)	recomWell Borrelia IgG	1
Novatec	Lyme Borrelia IgG Elisa	1
Virion/Serion		
(verdelers Labconsult)	Borrelia burgdorferi IgG Elisa	1
Niet gespecificeerd	Niet gespecificeerd	1
Totaal		67

### 6.3.3.3 Voor IgM (alle methoden samen)

Tabel 6.3.4.: Reagentia gebruikt voor de bepaling van Borrelia IgM.

Fabrikant	Kit	S/7075
Alphadia	Vir Elisa anti-Borrelia IgG/IgM	1
Biognost	Borrelia burgdorferi IFA IgM	1
Dade Behring	Enzygnost Borreliosis	11
Dako	IDEIA Borrelia burgdorferi, IgM	1
Diasorin	Liaison Borrelia IgM	31
	Borrelia burgdorferi IgM Elisa	1
Euroimmun (verdelers Biognost)	Borrelia burgdorferi IgM Elisa	13
	Western Blot IgM	2
Genbio (BMD)	Dot Blot Borrelia IgM	1
Hycor Biomedical Mikrogen (verdelers Euribel)	Borrelia burgdorferi IgM	1
	recomWell Borrelia IgM	1
Novatec	Lyme Borrelia IgM Elisa	1
Virion/Serion (verdelers Labconsult)	Borrelia burgdorferi IgM Elisa	1
Niet gespecificeerd	Niet gespecificeerd	1
Totaal		67

## 6.3.4. Resultaten

### 6.3.4.1 IgG+M

#### 6.3.4.1.1 Algemeen

Alle laboratoria die de "algemene" totale antistoffen bepaalden bekwamen een negatief resultaat voor staal S/7075.

#### 6.3.4.1.2 Anti-C6

Alle laboratoria die deze test uitvoerden bekwamen een negatief resultaat voor staal S/7075.

### 6.3.4.2 IgG

#### 6.3.4.2.1 Niet blot bepalingen

61 laboratoria bekwamen een negatief resultaat (het laboratorium dat deze test met 2 verschillende technieken uitvoerde bekwam met beide een negatief resultaat).

1 laboratorium bekwam een positief resultaat en 1 laboratorium een borderline resultaat.

#### 6.3.4.2.2 Blot bepalingen

2 laboratoria bekwamen een negatief resultaat en 1 een borderline.

### 6.3.4.3 IgM

#### 6.3.4.3.1 Niet blot bepalingen

Alle resultaten waren negatief (het laboratorium dat deze test met 2 verschillende technieken uitvoerde bekwam met beide een negatief resultaat).

#### 6.3.4.3.2 Blot bepalingen

Alle 3 resultaten waren negatief.

## 6.3.4.4 Interpretatie

### 6.3.4.1.1 Eigenlijke interpretatie

Een overzicht van de interpretaties wordt weergegeven in tabel 6.3.5.

Tabel 6.3.5. Interpretaties voor staal S/7075

Interpretatie	aantal laboratoria
Afwezigheid van antistoffen	135
Afwezigheid van antistoffen (mogelijks te vroeg geprikt)	1
Momenteel afwezigheid van antistoffen maar controlestaal aangewezen binnen 2 à 3 weken	1
Mogelijk aanwezigheid van antistoffen: confirmatie aangewezen	2
Geen antwoord <sup>1</sup>	1
Totaal	140

<sup>1</sup> Eén laboratorium liet de interpretatie open. Dit laboratorium gaf wel de opmerking "Foutieve indicatie?".

De antwoorden "Mogelijk aanwezigheid van antistoffen: confirmatie aangewezen" werden gegeven door de laboratoria die een positief of borderline resultaat bekwamen voor de niet-blottesten voor IgG. Het laboratorium dat een borderline resultaat met de blottest voor de IgG bekam (p30 band), concludeerde "Afwezigheid van antistoffen".

### 6.3.4.1.2 Opmerkingen bij "Afwezigheid"

Een overzicht van de opmerkingen bij het antwoord "Afwezigheid van antistoffen" (al dan niet voorzien van een bijkomend element in de interpretatie) wordt weergegeven in tabel 6.3.6

Tabel 6.3.6. Opmerkingen bij het antwoord "Afwezigheid van antistoffen" voor staal S/7075.

Opmerking	Aantal laboratoria
Een bevestiging door middel van Western Blot is niet noodzakelijk	69
Geen opmerking	40
Een opvolgingsstaal is aangewezen <sup>1</sup>	14
Een opvolgingsstaal is aangewezen; de mogelijkheid van anaplasrose dient overwogen te worden <sup>2</sup>	2
De datum van de staalname is niet gekend (antistoffen worden slechts 2-4 weken na infectie detecteerbaar)	2
Een bevestiging door middel van Western Blot is noodzakelijk	2
Het laboratorium heeft zelf een Western Blot uitgevoerd	1
Een bevestiging door middel van Western Blot is niet noodzakelijk, een 2 <sup>e</sup> staalname wel	1
Een bevestiging door middel van Western Blot is niet noodzakelijk; het is niet duidelijk uit klinische info met welke klachten komt patiënt nu	1
De staalname gebeurde te vroegtijdig	1
Patiënt moet zelf opvolgen of een erythema chronicum migrans verschijnt. Zo ja: bij voorkeur doxycycline toedienen	1
Behandelen want er zijn symptomen; serologie controleren binnen 3-4 weken	1
Onder voorbehoud dat de staalname dateert van 5 dagen na de extractie van de teek geldt commentaar uit de CBO richtlijn 2004 <sup>3</sup>	1
Opmerking werd niet gepreciseerd	1
Totaal	137

<sup>1</sup> Enkele van deze laboratoria vermelden wel dat deze 2<sup>e</sup> staalname enkel dient gebeuren als de klinische symptomen aanwezig blijven.

<sup>2</sup> Eén van beide laboratoria raadt aan de serologie voor *Anaplasma phagocytophilum* verwekker van HGA (Human Granulocytic Anaplasmosis) te controleren, evenals andere parameters (leucopenie, trombopenie, transaminasen) te controleren.

<sup>3</sup> CBO = Centraal BegeleidingsOrgaan van het Kwaliteitsinstituut voor de Gezondheidszorg (Nederland). De richtlijn vermeldt: "Bij vroege of gedissimineerde Lyme-borreliose met een ziekte duur <6-8 weken is de sensitiviteit van serologie (IgG en IgM) slechts 50-80% waardoor seronegativiteit de diagnose niet uitsluit. Bij vroege of gedissimineerde Lyme-borreliose met een ziekte duur <6-8 weken verhoogt testen van een vervolgs serum de sensitiviteit van de serologie."

Opvallend is dat er geen eensgezindheid bestaat over de duur van het tijdsinterval voor een tweede staalname: 10 dagen, 2 weken, 2-3 weken, 3 weken, 4 weken, 2-4 weken, 6-8 weken.



### 6.3.5. Commentaren op de enquête

De gebeurtenissen die de clinicus toelieten om de diagnose van anaplasmose te stellen en tegelijkertijd Lyme Borreliose uit te sluiten, verliepen als volgt:

#### **Dag 1 :**

De patiënt, een man van 52 jaar in goede gezondheid, ontdekt plots een zwarte aanwas op de posterolaterale zijde van zijn linker dij. Hij gaat onmiddellijk naar zijn behandelende geneesheer. Deze herkent een met bloed beladen teek, die hij onmiddellijk verwijdert zoals het hoort. De patiënt herinnert zich dat hij de week voordien op bezoek geweest is in een risicorijke omgeving zonder gepaste beschermingsmaatregelen tegen teken.

#### **Dag 8 :**

De patiënt vertoont de symptomen van een grippaal syndroom: koorts tot 39 °C gedurende 24 uur, hoofdpijn, spier- en gewrichtspijnen.

#### **Dag 9 :**

De behandelende geneesheer verricht een bloedname en vraagt, op aanraden van een expert in « tick-borne diseases », testen voor het opsporen van anaplasmose aan. Op basis van de eerste bevindingen van het laboratorium lijkt deze diagnose zeer verdacht.

Parameter	Resultaat	Diagnostisch criterium
Witte bloedcellen	2.900/mm <sup>3</sup>	Leucopenie
Bloedplaatjes	75.000/mm <sup>3</sup>	Trombopenie
CRP	4,5 mg/dl (N<0.50)	Positief
Transaminasen GOT	96 U/L (N<34)	Verhoogd
Transaminasen GPT	73 U/L (N<44)	Verhoogd

Het opsporen van morulae was overigens negatief. De anaplasmose-serologie uitgevoerd met indirecte immunofluorescentie was 1/128 voor IgG (een zwak positief resultaat maar niet kenmerkend voor een recente infectie) en 1/20 voor IgM (borderline positief).

De Borrelia-serologie, die als screening uitgevoerd werd, was negatief. Er werd geen PCR voor anaplasmose op EDTA-bloed aangevraagd.

Op basis van dit eerste bilan werd een behandeling met 200 mg doxycycline per dag gedurende 10 dagen ingesteld. Indien een tweede serum, afgenomen tijdens de convalescentie-fase een co-infectie met een Lyme-Borreliose zou aantonen, zou er een tweede kuur met deze behandeling gestart worden

**Dag 19 :**

De patiënt vertoont geen klachten meer. De gestoorde biologische parameters van de eerste week zijn genormaliseerd.

**Dag 45 :**

Een significante stijging van de IgG wordt aangetoond op het laattijdige serum afgenomen tijdens de convalescentie-fase.

Anaplasrose IgG : 1/1024

Anaplasrose IgM : negatief

Deze resultaten bevestigen de diagnose van anaplasrose. Tegelijkertijd blijft de Borrelia-serologie volledig negatief. Het is dit tweede staal dat in de EKE 2007/1 voor Borrelia verstuurd werd.

## **EKE Lyme borreliose : performanties van de serologische technieken**

De specificiteit van de verschillende technieken die door de laboratoria gebruikt werden is uitstekend gezien 94.8% van de deelnemers een negatief resultaat voor IgG en 96.6% een negatief resultaat voor IgM bekwamen met de niet-blot testen. De uiteindelijke diagnose is anaplasrose. Momenteel voert enkel het referentiecentrum van het militair hospitaal de serologie en de PCR voor anaplasrose uit:

Christel Cochez, Paul Heyman en Christian Vandenvelde  
Research Laboratory for Vector-borne Diseases, Hôpital  
Militaire Reine Astrid, Bruynstr.1, B-1120 Brussels  
Tel: 02 264 40 44 Fax: 02 264 46 08  
E-mail: paul.heyman@mil.be

### ***Wat weten we over anaplasrose ?***

Historische gegevens over anaplasrose (Bakken 1996; Foley 2004)

1994 : 1<sup>e</sup> geval in de Verenigde Staten  
Aantal gevallen tussen 1994-2004: 2300

1995 : 1<sup>e</sup> geval in Europa  
Aantal gevallen tussen 1995-2004: 100

1996 : Cultuur van de verwekker van HGE (Human Granulocytic Ehrlichiosis) op HL 60 cellen

Het causale agens : *Anaplasma phagocytophilum* (Bakken 1996)

Behoort tot de familie van de Anaplasmatatacae  
Gram-negatieve cocco-bacil  
Obligaat intracellulair: infecteert de neutrofielen  
De replicaties gebeuren in de fagosomen  
Pathoogeen voor de mens en sommige diersoorten

Transmissie van de kiem, incubatie en eerste klinische symptomen (Heyman 2003; Brouqui 2004)

Vector in België: teek *Ixodes ricinus*

Elders in Europa: teken *Ixodes ricinus* en *Ixodes persulcatus*

Interval vooraleer de arts geraadpleegd wordt: 4-8 dagen

Incubatieduur: 5-11 dagen

Prodromen:  $T^{\circ} > 39^{\circ}C$ , spierpijnen, rillingen, hoofdpijn, gewrichtspijnen

Andere klinische symptomen (Brouqui 2004; Wormser 2006)

In 30% van de gevallen:

Anorexie

Gewrichtspijnen

Niet-productieve hoest

Interstitiële pneumonie

In 11% van de gevallen:

Niet-specifieke, erythemateuse of pustuleuse rash

Follow-up van de niet-behandelde patiënten

Duur van de ziekte: van enkele dagen tot 60 dagen

Opname op de afdeling Inwendige Ziekten: 50% van de patiënten

Opname op Intensieve Zorgen: 7% van de patiënten

Ernstige verwickelingen (Remy 2003)

Septische shock

ARDS (Acute respiratory distress syndrome)

Perifere neuritis

Surinfectie met opportunistische kiemen

Mortaliteit (%): 0.5 tot 3 en zelfs 7%

Laboratoriumresultaten (Bakken 1996; Bakken 2006)

1<sup>e</sup> week

- Leucopenie (53% der gevallen)
- Lymfopenie
- Trombopenie (78%)
- GOT en GPT↑ (81%)
- CRP +++
- Morulae

2<sup>e</sup> week

- Normale leucocytose
- Atypische lymfocyten
- Variabele trombopenie
- Trend naar normalisatie
- CRP +

Serologie en moleculaire diagnostiek (Brouqui 2004; Wormser 2006)

Moet uitgevoerd worden vooraleer de behandeling te starten

1. Opsporen van IgG en IgM antistoffen op een vroegtijdig staal
2. PCR op EDTA-bloed (10 ml): moet op 4°C verstuurd worden naar het referentiecentrum van het militair hospitaal

Aantonen van een seroconversie of een duidelijke titerstijging:  
3 tot 4 weken na de eerste bloedname

Serologische technieken (Lotric-Furlan 2006; Brouqui 1995; Walder 2006)

1<sup>e</sup> generatie: immunofluorescentie

IgG As: verdunning: 1/64

Significante titer voor een infectie: > 1/640

IgM As: verdunning: 1/20

Profiel dat op een infectie wijst: IgG-, IgM+

2<sup>e</sup> generatie: Elisa IgG en IgM

Definitie van een bevestigde anaplasrose (Brouqui 2004; Lotric-Furlan 2006)

Hoge koorts na een tekenbeet, vergezeld van  
een seroconversie

**of**

een significante titerstijging van de IgG (minstens 4 maal de  
begintiter)

**en/of**

een positieve PCR test

Vergelijking tussen de VS en Europa: 1994-2004 (Lillini 2006; Qreszcsuk 2004; Swanson 2006)

	Verenigde Staten	Europa
Aantal gevallen	2300	100
Ernst van de infecties	Matig tot zeer ernstig	0
Mortaliteit	0-5%	0
Morulae	Ongeveer 60%	2 gevallen
Kweek	61-94%	Zelden +
Teken	<i>Ixodes scapularis</i> <i>Ixodes pacificus</i>	<i>Ixodes ricinus</i> <i>Ixodes persulcatus</i>

Behandeling van anaplasmosis (The Sanford Guide 2005-2006)

Behandeling op basis van een klinisch vermoeden zonder verdere serologische bevestiging. Therapeutische respons binnen de 48 uur.

Doxycycline:

Volwassene: 2 x 100 mg/d gedurende 10 dagen

Kind >8 jaar: 2 x 2 mg/kg/12h po gedurende 10 dagen

In geval van co-infectie met Lyme Borreliose: behandeling tot 14 dagen verlengen

Behandeling van kinderen <8 jaar: raadpleeg de referenties

Opvolging is onontbeerlijk

**Besluit en aanbevelingen**

1. Op het analytisch vlak: het serum van de EKE is negatief voor *Borrelia*. De meerderheid van de laboratoria hebben geen enkele interferentie aangetoond.
2. Op het diagnostisch vlak, kunnen, in een eerste tijd, enkel de biologische parameters de clinicus helpen om de diagnose van anaplasmosis te vermoeden of uit te sluiten. Deze eerste biologische criteria, die een anaplasmosis doen vermoeden, zijn slechts kortdurend. Ze kunnen opgespoord worden met eenvoudige routine-testen.
3. De zekerheidsdiagnose is vaak retrospectief aangezien men 3-4 weken moet wachten om een seroconversie of een significante titerstijging te zien optreden.
4. Voor een vroegtijdige diagnose is het van essentieel belang een PCR te vragen vóór het starten van een specifieke behandeling. Hiervoor moet men:
  - a. Een EDTA tube van 10 ml afnemen
  - b. Deze bewaren bij 4°C en op deze temperatuur naar het referentielaboratorium versturen, ten laatste 2 tot 3 dagen na de afname.

5. Voor bijkomende informatie wendt u zich best tot het referentiecentrum:

Christel Cochez, Paul Heyman en Christian Vandenvelde  
Research Laboratory for Vector-borne Diseases, Hôpital Reine  
Astrid, Bruynstr. 1, B-1120 Brussels Tel: 02 264 40 44 Fax:  
02 264 46 08 E-mail: [paul.heyman@mil.be](mailto:paul.heyman@mil.be)

Dr Victor Luyasu, Groupe de Recherches et d'Informations  
sur la Borreliose de Lyme et pathologies exotiques,  
Centre de vaccinations internationales et  
maladies parasitaires,  
Clinique St-Pierre, 1340 Ottignies

## REFERENTIES

1. Bakken JS, Dumler JS. Clinical diagnosis and treatment of human granulocytotropic anaplasmosis. *Ann N Y Acad Sci* 2006; 1078:236-247.
2. Bakken JS, Krueth C, Wilson-Nordskog C, Tilden K, Asanovich K, Dumler JS. Clinical and laboratory characteristics of human granulocytic ehrlichiosis. *JAMA* 1996; 275:199-205.
3. Brouqui P, Bacellar PF, Baranton G, Birtles RJ, Bjoersdorff A, Blanco JR, Caruso G, Cinco M, Fournier PE, Jensenius M, Kazar J, Lotric FS, Maurin M, Oteo JA, Parola P, Perez-Eid C, Peter O, Postic D, Raoult D, Tellez A, Tselentis Y, Wilske B; Guidelines for the diagnosis of tick-borne bacterial diseases in Europe. *Clin Microbiol Infect* 2004; 10:1108-1132.
4. Brouqui P, Dumler JS, Lienhard R, Brossard M, Raoult D. Human granulocytic ehrlichiosis in Europe. *Lancet* 1995; 346:782-783.
5. Ducoffre G, Heyman P, Luyasu V. Anaplasrose, une maladie émergente en Belgique ? *IPH-Epi-Scoop* 2005 ; 2 :2-3.
6. Foley JE, Foley P, Brown RN, Lane RS, Dumler JS, Madigan JE. Ecology of *Anaplasma phagocytophilum* and *Borrelia burgdorferi* in the western United States. *J Vector Ecology* 2004; 29: 41-50.
7. Grzeszczuk A, Puzanowska B, Miegoé H, Prokopowicz D. Incidence and prevalence of infection with *Anaplasma phagocytophilum*. Prospective study in healthy individuals exposed to ticks. *Ann agric Environ Med* 2004; 11:155-157.
8. Heyman P, Cochez C, Bigaignon G, Guillaume B, Zizi M, Vandenvelde C. Human granulocytic ehrlichiosis in Belgium: an underestimated cause of disease. *J Infect* 2003; 47:129-132.
9. Heyman P, Cochez C, Ducoffre G, Vandenvelde C, Luyasu V. Anaplasrose. *Focus Diagnostica* 2006 ; 5 :131-135.
10. Heyman P, Cochez C, Ducoffre G, Luyasu V, Vandenvelde C. Anaplasmosis in Belgium; a six year surveillance. Poster 16.008 in International meeting on emerging diseases and surveillance, Vienna, Austria, February 23-25, 2007.
11. Lillini E, Macri G, Proietti G, Scarpulla M. New findings on anaplasmosis caused by infection with *Anaplasma phagocytophilum*. *Ann N Y Acad Sci* 2006; 1081:360-370.
12. Lotric-Furlan S, Rojko T, Petrovec M, Avsic-Zupanc T, Strle F. Epidemiological, clinical and laboratory characteristics of patients with human granulocytic anaplasmosis in Slovenia. *Wien Klin Wochenschr* 2006; 118:708-713.
13. Remy V, Hansmann V, De Martino S, Christmann D, Brouqui P. Human anaplasmosis presenting as atypical pneumonitis in France. *CID* 2003; 37: 846-848.
14. Swanson SJ, Neitzel D, Reed KD, Belongia EA. Coinfections acquired from ixodes ticks. *Clin Microbiol Rev* 2006; 19:708-727.
15. The Sanford Guide to Antimicrobial therapy. 19<sup>th</sup> Edition of the Belgium/Luxembourg 2005-2006.



16. Walder G, Fuchs D, Sarcletti M, et al. Human granulocytic anaplasmosis in Austria : epidemiological, clinical, and laboratory findings in five consecutive patients from Tyrol, Austria. *Int J Med Microbiol* 2006; 296:297-301.
16. Walder G, Fuchs D, Sarcletti M, et al. Human granulocytic anaplasmosis in Austria : epidemiological, clinical, and laboratory findings in five consecutive patients from Tyrol, Austria. *Int J Med Microbiol* 2006; 296:297-301.
17. Wormser GP, Dattwyler RJ, Shapiro ED, Halperin JJ, Steere AC, Klempner MS, Krause PJ, Bakken JS, Strie F, Stanek G, Bockenstedt L, Fish D, Dumler JS, Nadelman RB. The clinical assessment, treatment, and prevention of lyme disease, human granulocytic anaplasmosis, and babesiosis: clinical practice guidelines by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 2006; 43 :1089-1134.