

**FEDERALE OVERHEIDSDIENST, VOLKSGEZONDHEID, VEILIGHEID
VAN DE VOEDSELKETEN EN LEEFMILIEU**

COMMISSIE VOOR KLINISCHE BIOLOGIE

**DIENST VOOR LABORATORIA VAN KLINISCHE BIOLOGIE
COMITE VAN DESKUNDIGEN**

Globaal Rapport

**EXTERNE KWALITEITSEVALUATIE VOOR
ANALYSEN KLINISCHE BIOLOGIE**

MICRO/SERO/PARA

ENQUETE 2011/03

DIT RAPPORT WORDT NIET MEER VERSTUURD MET DE POST

Microbiologie

Neisseria meningitidis
Shigella sonnei
Clostridium difficile, toxine -
Clostridium difficile, toxine +
Clostridium non-difficile (C. tertium)

Parasitologie

Ancylostomidae
Giardia lamblia
Endolimax nana
Blastocystis hominis

Serologie

HIV
Brucella
Chlamydomphila pneumoniae

WIV-11/03/Micro/Sero/Para/85

Dienst Klinische Biologie
J. Wytsmanstraat, 14
1050 Brussel | België

www.wiv-isp.be

COMITE VAN EXPERTEN VOOR MICRO/SERO/PARA

WIV (secretariaat)	:	02/642.55.22 – FAX : 02/642.56.45
(Dr. VERNELEN K.)	:	02/642.55.29 – FAX : 02/642.56.45
(Coördinator)	:	e-mail : kris.vernelen@wiv-isp.be
Apr. BOEL An	:	053/72.47.85 - FAX : 053/72.45.88
	:	e-mail : an.boel@olvz-aalst.be
Dr. CLAEYS Geert	:	09/332.36.45 – FAX : 09/332.49.85
	:	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. 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. MAGERMAN Koen	:	011/30.97.40 – FAX : 011/30.97.50
	:	e-mail : koen.magerman@jessazh.be
Dr. NAESSENS Anne	:	02/477.50.02 – FAX : 02/477.50.15
	:	e-mail : anne.naessens@uzbrussel.be
Dr. PADALKO Elizaveta	:	09/332.21.08 – FAX : 09/332.49.85
	:	e-mail : elizaveta.padalko@uzgent.be
Dr. REYNDERS Marijke	:	050/45.39.27 – FAX : 050/45.26.19
	:	e-mail : marijke.reynders@azsintjan.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

Alle rapporten zijn tevens te raadplegen op onze website:

http://www.wiv-isp.be/ClinBiol/bckb33/activities/external_quality/rapports/_nl/rapports_annee.htm

I. Algemene bemerkingen

Voor de 3^e evaluatie van het jaar 2011 (enquête 2011/3) werd volgend materiaal verzonden op 3 oktober 2011.

1.1 Een gelyofiliseerd monster en 4 klinische monsters (feces) voor identificatie

Voor 1 monster werden de resultaten van de gevoeligheidstesten gevraagd. Voor 3 klinische monsters (*Clostridium* species in stoelgang) werd eveneens de bepaling van het *Clostridium difficile*-toxine gevraagd.

1.2. fecesstalen voor parasitologisch onderzoek.

1.3. Vier plasmamonsters voor de serologie van **Brucella**, **C. pneumoniae** en HIV.

AANTAL DEELNEMERS

Het aantal evalueerbare antwoordbulletins bedroeg:

1. Voor identificatie en antibiogram:	165
2. Voor parasitologie:	160
3. Voor de sérologie	
Brucellose:	72
C. pneumoniae:	93
HIV :	165

Alle stalen gebruikt in de EKE zijn voorafgaandelijk goedgekeurd door de leden van de onderscheiden expertencomités.

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

U kan de overzichten van alle stalen die in de verschillende enquêtes verzonden werden terugvinden op onze website op volgende pagina's:

Bacteriologie:

http://www.wiv-isp.be/ClinBiol/bckb33/activities/external_quality/nl/microbiologie.htm

en vervolgens klikt u onder "Codes" op "Overzicht verstuurde kiemen"

Parasitologie:

http://www.wiv-isp.be/ClinBiol/bckb33/activities/external_quality/nl/parasitologie.htm

en vervolgens klikt u onder "Codes" op "Overzicht verstuurde parasieten"

Infectieuze serologie:

http://www.wiv-isp.be/ClinBiol/bckb33/activities/external_quality/nl/inf_serologie.htm

en vervolgens klikt u op "Lijst van de geëvalueerde parameters"

II. Identificaties

2.1. Cultuur M/11022 *Neisseria meningitidis* werd gediagnosticeerd bij een man met urethritisklachten.

Op Gramkleuring waren boonvormige intracellulaire en extracellulaire gram-negatieve diplokokken manifest aanwezig.

Op het eerste gezicht dus een typisch beeld van een *Neisseria gonorrhoeae* urethritis.

Cultuurresultaten tonen echter dat deze klassieke (microscopische) diagnose hier niet klopt. De meeste laboratoria rapporteerden terecht een *Neisseria meningitidis* (82.4%). Een niet zo voor de hand liggende diagnose: menig laboratorium zal de klassieke testen een tweede zoniet een derde maal herhaald hebben. Nochtans werd er in eerdere externe kwaliteitscontroles (M/6899, van 2006/2) gesuggereerd dat “voor urethritis bij mannen een Gram-kleuring kan volstaan voor een correcte diagnose: de specificiteit van een rechtstreeks microscopisch onderzoek is zo hoog dat bijkomende identificatie niet strikt nodig is.” Uit deze casus blijkt dat men toch moet oppassen met dergelijke diagnostische ‘vuistregels’. De kweek is en blijft een noodzakelijke aanvulling op de Gram-kleuring, niet in het minst omwille van het resistentieprofiel van een mogelijke *N. gonorrhoeae*.

Zoals daarnet aangehaald heeft merendeel van de laboratoria de diagnose correct gesteld. Dit was ook zo bij eerdere enquêtes: slechts 6% van de laboratoria in 1997 misten de *N. meningitidis*. In 2000 misten toch 15% van de laboratoria een *N. gonorrhoeae*. In deze kwaliteitscontrole misten 17.6% van de laboratoria de diagnose. In deze enquête vermeldden sommige laboratoria dat *N. meningitidis* niet als pathogeen kan beschouwd worden. Dit is een onterechte melding. Karolus JJ *et al.* publiceerden in 1980 een mooi artikelje in de Journal of Clinical Microbiology (1). Het is vrij opvraagbaar in PubMed. In 1942 rapporteerden Carpenter and Charles al 7 gevallen van *N. meningitidis* urethritis (2). Zowel Karolus als Carpenter verklaarden dit fenomeen door te verwijzen naar de gewijzigde seksuele gewoontes en sociale attitudes. De *N. meningitidis* huist bij de gezonde populatie namelijk ter hoogte van de nasopharynx. Overdracht via oraal seksueel contact lijkt hier de route van transmissie te zijn. Het aantal publicaties dat een pharyngeale gonokokkeninfectie beschrijft na oro-genitaal contact ligt evenwel veel hoger dan het aantal gevallen van meningokokkenurethritis.

Verder onderzoek leerde Carpenter *et al.* dat mannen ook asymptomatische drager kunnen zijn van de meningokok. Het is tot op heden niet helemaal duidelijk of bepaalde serotypes meer verantwoordelijk zouden zijn voor symptomatische urethritis.

Ongeveer gelijktijdig aan dit klinisch geval diagnosticeerde men in het Onze-Lieve-Vrouwziekenhuis Aalst bij een man met perianale pijn en pijnlijke defecatie een proctitis met in biopt een aanwezigheid van *S. pyogenes*, *N. meningitidis* en *C.trachomatis*. Ook bij deze homoseksuele man mag men veronderstellen dat een orogenitale-anale transmissie aan de oorzaak ligt. (3)

De diagnose een infectie met een *N. meningitidis* werd eerder al uitvoerig beschreven (1996/2)(1997/2)(2001/1). Klassiek groeit de meningokok strikt aëroob bij 37°C in een CO₂ rijke atmosfeer (8-10%) op een aangerijkte bodem (type Thayer-Martin). De gonokok is in deze delicateser dan de meningokok. De stam gebruikt voor deze kwaliteitscontrole kon uiterst gemakkelijk gekweekt worden. Zoals gekend is de meningokok oxydase en catalase positief en verzuurt enkel glucose en maltose. De identificatie van de kiem door middel van

massaspectrometrie verliep optimaal, wat te verwachten viel aangezien massaspectrometrie een zeer performant identificatiemiddel is, doch helaas nog steeds duur in aanschaf.

De doorgestuurde stam is zeer gevoelig voor penicilline (MIC: 0.032 mg/L) en uiteraard ook voor cefotaxime (MIC: 0.002 mg/L). Dat deze stam uiterst gevoelig is voor penicilline is geen evidente zaak. Uit het jaarverslag van het WIV (Bertrand en Carion) blijkt immers dat slechts in 54.5% van de gevallen *N. meningitidis* benzylpenicilline gevoelig was (MIC \leq 0.06 mg /L). 37.5% was intermediair gevoelig en 8% resistent (MIC \geq 0.5 mg/L) (n=88). Agglutinatie van de doorgestuurde kiem toonde aan dat het een serogroep B betrof.

Sociale gedragingen en seksuele gewoontes zijn fors veranderd sinds vorige eeuw. Vandaag de dag is het dus niet zo ongewoon om genitale infecties te diagnosticeren ten gevolge van pathogenen die niet direct in verband worden gebracht met dergelijke infecties. In tegendeel, sommige anatomische locaties die nooit te voren in verband werden gebracht met seksuele handelingen, lijken vandaag bloot te staan aan de klassieke STD-pathogenen. Dat op korte tijd twee gevallen werden gevonden bewijst de stelling dat we attentief moeten zijn. En eigenlijk weten we dat al langer. De tijd dat *Herpes simplex* 1 en 2 netjes respectievelijk oraal en genitaal werden opgesplitst ligt al langer achter ons (4). Breder dus, moeten we als klinisch microbioloog er ons bewust van zijn dat de omgeving, migratie, andere zeden en gewoonten, sociale gewoontes, klimaatveranderingen, reizen... een impact hebben op ons werk in het laboratorium (5). De a priori kans dat zogezegd "iets niet kan voorkomen" is achterhaald. Het theorema van Bayes bewijst nogmaals dat de kennis van de prevalentie van ziekten of de epidemiologie ook voor de microbioloog bijzonder waardevol zijn. Zeer nuttig hiervoor zijn (kosteloze) hulpmiddelen zoals ProMED mail (6). Maar essentieel is en blijft dat de microbioloog een klinisch microbioloog is (of wordt) die communiceert met zijn clinici.

Louis Ide (Jan Palfijn Gent)

Referenties

1. Karolus JJ, Gandelman AL, Nolan BA. Urethritis caused by *Neisseria meningitidis*. J Clin Microbiol. 1980 Aug;12(2):284-5.
2. Carpenter CM, Charles R. Isolation of Meningococcus from the Genitourinary Tract of Seven Patients. Am J Public Health Nations Health. 1942 Jun;32(6):640-3.
3. Claes P., Flipse W., Laisnez V. Proctitis door *Neisseria meningitidis*. Infectieziektebulletin 2011-3-77.
4. <http://bacterio.wiv-isp.be/reporting/reportspdf/JaarverslagMeningo2010.pdf>
5. Brugha R., Keersmaekers K., Renton A., Meheus A. Genital herpes infection: a review. Int J Epidemiol. 1997. Aug. 26(4): 698-709.
6. Ide L., Bonamie A., Rodenbach J., Thibo P. Think mycology! Clinical Microbiology Newsletter. July 1, 2011.
7. <http://www.promedmail.org>

2.2. Cultuur M/11064, M/11065 et M/11066 *Clostridium tertium*, *Clostridium difficile* (toxine negatief) en *Clostridium difficile* (toxine positief)

Inleiding

Sinds het eind van de jaren zeventig heeft *Clostridium difficile* zich ontpopt als een belangrijke nosocomiale pathogeen. Deze anaërobe, Grampositieve sporenvormende bacterie is de voornaamste oorzaak van antibiotica geassocieerde diarree, met een ziektebeeld gaande van milde diarree tot levensbedreigende colitis. Naar schatting zou ze verantwoordelijk zijn voor 10-25% van alle antibiotica geassocieerde diarreegevallen en voor bijna alle gevallen van pseudomembraneuze colitis. De voornaamste virulentiefactoren zijn twee exotoxines van hoogmoleculair gewicht, namelijk toxine A en B die beide een cytotoxische en enterotoxische activiteit vertonen. Bij sommige stammen vinden we eveneens een binair toxine, maar haar exacte rol is nog niet duidelijk aangetoond. Er bestaan eveneens niet-toxinogene stammen maar zij worden als niet virulent beschouwd.

In het eerste jaren van de 21^e eeuw is de epidemiologie van *C. difficile* infecties (CDI) dramatisch veranderd in Noord-Amerika en Europa (1,2). Een significante stijging van de incidentie en morbiditeit van CDI werden langs weerskanten van de Atlantische Oceaan gemeld. Het ziektebeeld veranderde met een stijging van het aantal toxische megacolon gevallen, septische shocks, colectomies, resistenties bij standaard therapie en recidieven. Vrij vlug werd een nieuwe opduikende en zich verspreidende *C. difficile* stam aangetoond. Deze nieuwe stam behoort tot het B1 restrictie-enzyme analysis type, PCR-ribotype « 027 ». De verhoogde virulentie van deze stam wordt gelinkt aan een overproductie van toxine A en B en de productie van een binair toxine (3). Aanvankelijk gedetecteerd in Noord-Amerika werd deze *C. difficile* « 027 » vrij vlug aangetoond in tal van epidemieën in verschillende Europese landen (Verenigd Koninkrijk, Nederland, België en Frankrijk). Bij oudere patiënten bereikte de mortaliteit van CDI gelinkt aan het 027 ribotype soms percentages hoger dan 10% (4).

Hospitaal epidemieën van CDI komen frequent voor. De oorzaak ligt meestal bij de vlugge besmetting van de omgeving door sporen die verspreid worden door diarreeïsche stoelgang. Het is sinds tientallen jaren bekend dat de kamer van een CDI patiënt vrij vlug besmet wordt, reeds in de eerste 24 uren van een diarree periode. Deze sporen kunnen maanden aantoonbaar blijven en vormen een bron van besmetting voor andere patiënten (5).

Daarom is een vroege en juiste diagnose van CDI de sluitsteen van een optimale beheersing van deze nosocomiale ziekte. Ze laat niet alleen toe een adequate therapie te starten maar ze laat ons tevens toe maatregelen te implementeren in de kamer van de patiënt betreffende hygiëne en infectiecontrole. Tot deze maatregelen behoort de isolatie van de patiënt en de dagelijkse desinfectie van de kamer, waarvan aangetoond werd dat ze efficiënt waren in het voorkomen van epidemieën.

Alle strategieën zouden hetzelfde doel moeten nastreven, namelijk een diagnose op de dag zelf bij een verdenking van CDI. Bij een positief resultaat zal de onmiddellijke behandeling de patiënt ten goede komen en het risico op besmetting vanuit de kamer beperken. De vlugge implementatie van hygiënische maatregelen zal de verdere verspreiding van de ziekte tegengaan.

Met dit doel en zijn implicaties is de accuraatheid van de laboratoriumdiagnose van cruciaal belang. Vals positieve resultaten kunnen tot verkeerde behandeling leiden en kostenverhogend werken door onnodige isolatie en vals negatieve resultaten kunnen epidemieën of een vertraging in de behandeling veroorzaken.

We beschrijven hierbij de verschillende methoden en strategieën beschikbaar voor CDI diagnose.

C. difficile moet vermoed worden bij elke gehospitaliseerde patiënt die een acute diarree vertoont, en inzonderheid bij een patiënt die antibiotica gekregen heeft in de zes voorgaande weken. Ouderdom (> 65 jaar), het gebruik van antacida en chemotherapie worden eveneens beschouwd als risicofactoren. Een patiënt met een recente voorgeschiedenis van CDI moet eveneens het vermoeden wekken gezien het belangrijke aantal van hervallen (>20%). Koorts en leucocytose, abdominale pijn en krampen,....kunnen geassocieerde symptomen zijn.

Kinderen op jonge leeftijd (<2 jaar) zijn vaak asymptomatische dragers en veel minder verdacht in geval van diarree.

De klinische definitie van diarree kan sterk verschillen maar omvat meestal de vloeibare aard van de stoelgang (de stoelgang neemt de vorm van de recipiënt aan) en de frequentie (>3/dag). Voor een optimale diagnose, zou enkel vloeibare stoelgang naar het laboratorium gestuurd mogen worden.

Een CDI geval is een patiënt waarop één of meerdere van volgende criteria toepasbaar zijn:

1. Patiënten met diarree of een toxisch megacolon EN een positieve laboratorium test voor *C. difficile* Toxine A en/of Toxine B in de stoelgang of een stoelgang waarin een toxine producerende *C. difficile* kan aangetoond worden door kweek of op een andere manier.
2. Wanneer pseudomembraneuze colitis kan aangetoond worden door colonoscopie.
3. Wanneer ter hoogte van het colon histopathologische karakteristieken van een *C. difficile* infectie (met of zonder diarree) worden aangetoond op een staal bekomen tijdens een endoscopie, colectomie of autopsie.

Deze definities sluiten diarree ten gevolge van andere gekende oorsprong uit alsook de asymptomatische patiënten met een positief laboratoriumresultaat.

Het aanvragen van de laboratoriumtesten door de clinicus is uiteraard een belangrijke voorafgaande voorwaarde en men moet goede informatie naar de clinici voorzien . In een interessante prospectieve studie bestudeerden vorsers in Nederland het aantal CDI gevallen in stalen die zij in hun laboratorium ontvingen met een specifieke aanvraag voor *C. difficile* en vonden een prevalentie van 8.5%. Bij het testen van fecesstalen bij gehospitaliseerde patiënten met diarree, maar voor wie geen *C. difficile* was aangevraagd, vonden zij verbazingwekkend een gelijkaardige prevalentie van 8%. De incidentie van CDI is daarom ten zeerste afhankelijk van de alertheid van de geneesheer om *C. difficile* te testen en aanbevelingen voor geneesheren zijn dus een noodzaak.

Laboratoriumdiagnose

De laboratoriumdiagnose van CDI is gebaseerd op de isolatie van de pathogeen door kweek en op de detectie van het toxine in stoelgangstalen, welke kan uitgevoerd worden via ofwel het nagaan van het cytopathisch effect van een stoelgangfiltraat op cellijnen of door een rechtstreekse enzyme immunoassay. Bepaling van het glutamaat dehydrogenase (GDH) in stoelgang via EIA, als een indicator van de aanwezigheid van *C. difficile* is een andere performante benadering. Tenslotte, worden moleculaire technieken, die focussen op de specifieke toxines, meer en meer uitgevoerd in routine.

In het verleden werden andere indirecte testen voorgesteld zoals directe “gas liquid chromatography” (GLC) op stoelgangstalen, latex agglutinatie of CT-scan maar deze technieken waren onvoldoende gevoelig en specifiek om aanvaardbaar te zijn als bijkomende testen.

Kweek

Onmiddellijk na de ontdekking van de pathogene rol of *C. difficile*, ontwikkelden George et al. een selectieve agar, CCFA (cycloserine cefoxitine fructose agar) voor de isolatie vanuit stoelgang (6). Dit medium wordt nog steeds gebruikt in de meeste laboratoria. Deze bodem is commercieel beschikbaar bij verschillende firma's. Stoelgang wordt rechtstreeks geënt en gedurende 36 tot 48 uur geïncubeerd onder anaërobe atmosfeer.

Er zijn verschillende wijzigingen voorgesteld om de gevoeligheid van de cultuur te verhogen. De meeste hebben als doel de sporen op te pikken en richten zich voornamelijk op epidemiologische studies en omgevingskweken. Toevoeging van zuiver natrium taurocholaat of cholaat in een concentratie van 1 g/L laat een betere ontkieming van de sporen toe en is geschikt voor omgevingskweken of voor gevallen van negatieve kweek met positief fecaal cytotoxine (cf. infra). Het natriumzout van cholinezuur is even efficiënt als zuiver taurocholaat om de sporen te laten ontkiemen maar is veel goedkoper.

Kweek biedt vele voordelen. Het is één van de meest gevoelige methoden hoewel ze een gebrek aan specificiteit vertoont wegens de mogelijkheid van isolatie van niet-toxinogene stammen. Ze is van het grootste belang in epidemiologie vermits ze de karakterisering en typering van stammen toelaat. Het voornaamste nadeel is dat de resultaten pas laattijdig gekend zijn na 36 - 48 uur incubatie. Er is echter recent een chromogeen milieu ontwikkeld en de eerste evaluaties tonen aan dat de incubatieduur verkort kan worden tot 24 uur met een grotere gevoeligheid (7).

Toxigene kweek

Om het gebrek aan specificiteit van de kweek tegen te gaan, kan de toxigeniciteit van een geïsoleerde *C. difficile* stam getest worden. Deze techniek wordt “toxigene kweek” genoemd. Een suspensie van kolonies (afgenomen van een selectieve bodem) kan rechtstreeks getest worden op toxigeniciteit via een immuno-enzymatische test (EIA) of via PCR (cfr infra).

In een retrospectieve studie (8) van meer dan tienduizend stoelgangculturen werd aangetoond dat van de 10% positieve kweken in slechts 4.4% een fecaal toxine aangetoond werd. Door het testen van de toxigene status van de overblijvende 5.6% positieve kweken, bleek dat meer dan de helft hiervan (3.4%) toxigene stammen waren. Toxigene kweek kan dus de toxigeniciteit van stammen aantonen in situaties waar het toxine niet rechtstreeks aangetoond werd.

De toxigene kweek wordt momenteel door de meeste personen beschouwd als de gouden standaard om andere diagnostische procedures te evalueren.

Toxine detectie

Cytotoxiciteit werd vaak beschouwd als de gouden standaard voor de diagnose van *C. difficile* infecties. De methode bestaat uit het enten van een steriel filtraat van een stoelgangssuspensie op een celcultuur en vervolgens het vaststellen van een cytopathisch effect (afronding en toename van het straalbrekend vermogen van de cellen). Het effect is voornamelijk te wijten aan het toxine B dat duizend maal meer cytotoxisch is dan het toxine A. Bevestiging van de specificiteit wordt bekomen door de test te herhalen met toevoeging van een specifiek antiserum gericht tegen *C. difficile* of tegen *C. sordellii* dat dezelfde antigenen draagt.

Nagenoeg alle cellijnen die gewoonlijk gebruikt worden in klinisch microbiologische laboratoria kunnen gebruikt worden om fecaal cytotoxine aan te tonen. Vero, Hep2, fibroblast, CHO of HeLa cellen worden het meest gebruikt. Vero cellijnen worden door velen beschouwd als de gevoeligste. Net zoals bij de kweek, wordt het cytotoxisch effect pas vastgesteld na 18 tot 48 uur incubatie. In sommige van de ernstigste klinische gevallen, kan de typische afronding al na 4 tot 6 uur vastgesteld worden, maar in de routinepraktijk is dit onmogelijk uit te voeren.

De methode is zeer specifiek maar, net zoals de cultuur, is ze traag. En ze is niet erg gevoelig wanneer ze vergeleken wordt met de toxigene kweek (percentage lager dan 60%). Bovendien is de techniek niet goed gestandaardiseerd; een ander nadeel is de noodzaak om cellijnen te onderhouden, wat zowel tijdrovend als duur is, zeker indien slechts een gering aantal stalen onderzocht worden.

Enzyme immune-assays voor toxines A en B (EIA)

Vele EIA voor *C. difficile* toxines begonnen meer dan 15 jaar geleden hun plaats op de markt te veroveren. Er werden twee types van immunoassays ontwikkeld: conventionele testen op 96-well microtiter platen of individuele immunochromatografische testen of nog testen op automaten. Deze testen gebruiken monoklonale of polyklonale antistoffen tegen Toxine A en/of Toxine B. De eerste generatie testen was enkel voor bepaling van Toxine A ontwikkeld en de 2e generatie voor zowel Toxine A als Toxine B, voornamelijk omdat sommige isolaten van gevallen van CDI enkel Toxine B bleken te produceren.

De performanties van deze testen werden in verschillende klinische studies geëvalueerd. In een uitgebreide studie die negen toxine EIA op 600 diarreeïsche stoelgangstalen evalueerde, met de toxigene kweek als gouden standaard, werden een gemiddelde gevoeligheid en specificiteit van 75% (range 60.0 tot 86.4%) en 96,1% (range 91.4 tot 99.4%) gerapporteerd (18). In vergelijking met de cytotoxiciteit, hebben deze EIA het voordeel dat de resultaten snel gekend zijn (minder dan één uur terwijl de cytotoxiciteit 18 tot 24 uur vergt) en hebben ze een licht hogere gevoeligheid.

Bepaling van glutamaat dehydrogenase (GDH)

In de vroege jaren 90, werd een agglutinatietest ontwikkeld voor bepaling van Toxine A. Het hierop volgende onderzoek toonde aan dat deze test niet met Toxine A reageerde maar met een specifiek antigeen van toxigene en niet toxigene stammen van *C. difficile*, het glutamaat-dehydrogenase (GDH). Gedurende de laatste jaren zijn EIA die GDH detecteren, op de markt gekomen. Deze testen hebben een uitstekende gevoeligheid en vertoonden een goede correlatie met kweek op selectieve bodems (10). De gevoeligheid is hoog maar de specificiteit is zeer laag. Het grote belang berust echter op de uitstekende negatieve voorspellende waarde (NVW). Als de prevalentie van positieve toxigene kweken 10 % bereikt (wat meestal het geval is) is de NVW meer dan 98% (11) wat betekent dat deze test een zeer goede screeningsmethode is.

Moleculaire methoden

Gedurende vele jaren werden moleculaire technieken voor de directe bepaling van *C. difficile* toxine genen in fecesstalen ontwikkeld. Een groot aantal publicaties vermeldde uitstekende performanties van home-made PCR. Recent werden, na positieve evaluaties, verschillende, door de FDA goedgekeurde, commerciële kits die real-time PCR of "loop mediated isothermal amplification" gebruiken om het gen dat voor de toxines codeert rechtstreeks op fecesstalen te detecteren, op de markt gebracht. Deze methoden vertonen een hogere concordantie met de resultaten van de toxigene kweek dan de enzyme immunoassays voor toxines, met gevoeligheden van 88 tot 98 %, en specificiteiten van 91 tot 99%. (12). Net als de EIA hebben deze methoden het grote voordeel dat hun resultaten in minder dan twee uur beschikbaar zijn.

Één van de nadelen daarentegen is dat zij merkbaar duurder zijn dan de EIA. Voor sommigen is de aanschaf van duur materiaal noodzakelijk. Een ander nadeel is dat zij niet de aanwezigheid van fecaal toxine detecteren, maar wel van de genen die voor het toxine coderen, wat kan leiden tot vals positieven bij patiënten die een vroegere infectie doorgemaakt hebben of die asymptomatische dragers zijn van. Bijkomende studies zijn noodzakelijk om deze gevallen te evalueren

Algorithmes

Het is dus duidelijk dat geen enkele test op afdoende wijze accuraatheid, snelheid en kosteneffectiviteit combineert. Dit leidde tot de evaluatie van algoritmes met verschillende testen. GDH EIA en moleculair biologische testen zijn duidelijk de meest geschikte testen voor de screening van stoelgangstalen omwille van hun uitstekende NVW. Op basis van de kosten vormt GDH de eerste keuze in vele laboratoria. We moeten er echter rekening mee houden dat een dergelijke screening geen perfecte gevoeligheid vertoont en een niet te verwaarlozen aantal vals negatieven tot gevolg zal hebben. Bij ons worden tussen 5 en 10 % van de positieve toxigene kweken bij deze screenings gemist maar in andere studies werden hogere aantallen bekomen (13). Deze positieve stoelgangskweken met negatieve GDH EIA of PCR vertonen echter een lager aantal kolonies dan deze met positieve resultaten. Het echte klinisch belang moet nog worden vastgesteld.

Eens een GDH test positief is, vereist de lage specificiteit van deze methode een bijkomende test. Een eerste optie is de EIA voor toxines A en B: een positief resultaat van zowel GDH als toxine vormt de definitieve bevestiging van de diagnose van CDI. De gevoeligheid van de methode is echter laag, waardoor een groot aantal resultaten negatief zullen zijn en dus een derde test zullen vereisen.

Door het combineren van GDH en toxine A en B in één enkel test zoals voorgesteld in een test die door ons gecommmercialiseerd werd bekomt men beide resultaten tegelijkertijd met eenzelfde

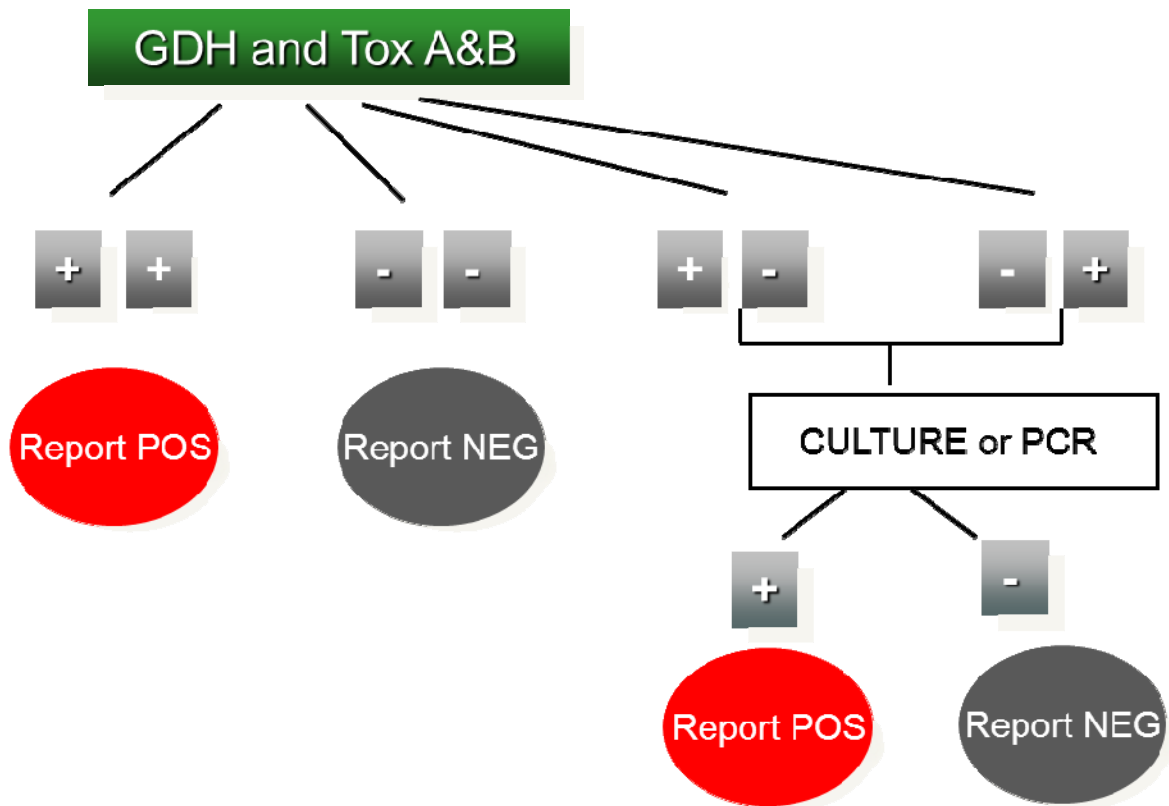
werkbelasting en turn-around-time. Sharp et al toonden aan dat deze test toelaat om in minder dan 30 minuten 88% van de stalen op een accurate wijze te screenen als positief (beide testen positief) of negatief (beide testen negatief) en dit met een minimale hands-on-time (14). Discordante resultaten moeten met een alternatieve methode als moleculaire biologie of toxigene kweek getest worden. Door gebruik te maken van een random-access PCR, bekwamen Sharp et al. een globale gevoeligheid en specificiteit van respectievelijk 100% (95%CI 89.6 tot 100%) en 99.6 % (97.3 tot 99.9%) Toxigene kweken gaven gelijkaardige resultaten en bleken kosteneffectiever maar het tijdsinterval van 24 tot 48 uur is een groot nadeel. Swindells et al. bekwamen gelijkaardige resultaten door het combineren van de associatie van GDH + toxine als screeningstest gevolgd door Gene Xpert (Cepheid) voor de discordante resultaten (15). Bijkomend toonden zij aan dat een positief resultaat voor zowel GDH als toxines A & B vaker vastgesteld werd in aanwezigheid van stammen met ribotype 027 in stoelgang.

De figuur op het einde van deze tekst vat het schema samen van een algoritme waar de 1e stap voor alle stoelgangstalen een combinatie is van een EIA voor GDH en toxines A en B. Indien we rekening houden met een prevalentie van 10% voor toxigene *C. difficile*, kunnen we veronderstellen dat, binnen 30 minuten, ongeveer 80% van de stalen als negatief zullen geantwoord worden (beide testen negatief) met uitsluiten van de diagnose van CDI en dat 5% gediagnosticeerd zullen worden als echte CDI (beide testen positief). De overblijvende 15% kan vervolgens onderzocht worden met een moleculair biologische methode die een bijkomende procedure van 120 minuten inhoudt en die de clinicus een definitief protocol geeft voor nog 5% positieve CDI en 10% negatieve. In gevallen waar moleculaire biologie niet beschikbaar is, moet de toxigene kweek uitgevoerd worden wat betekent dat de resultaten minstens 24 h later gekend zullen zijn.

Over- en onderdiagnose vormen een bekommernis bij zulke algoritmes. GDH is niet 100% gevoelig en kan leiden tot onderdiagnose. Moleculaire technieken zijn niet 100% specifiek en kunnen leiden tot overdiagnose. In deze gevallen is de klinische toestand van de patiënt van groot belang. Hierbij kunnen bijkomende testen die focussen op de inflammatoire toestand van de darm de clinicus helpen. Testen die het fecaal lactoferrine bepalen hebben recent bewezen een goede aanduiding te geven over CDI in gevallen van negatieve EIA voor de toxine en positieve GDH (16).

M. Delmée, UCL, Bruxelles

Figuur : Tweestaps algoritme voor de diagnose van *C. difficile*



Referenties

1. McDonald LC, Killgore GE, Thompson A, Owens RC, Jr., Kazakova SV, Sambol SP, et al. An epidemic, toxin gene-variant strain of *Clostridium difficile*. *N Engl J Med*. 2005 Dec 8;353(23):2433-41.
2. Kuijper EJ, Coignard B, Tull P. Emergence of *Clostridium difficile*-associated disease in North America and Europe. *Clin Microbiol Infect*. 2006 Oct;12 Suppl 6:2-18.
3. Warny M, Pepin J, Fang A, Killgore G, Thompson A, Brazier J, et al. Toxin production by an emerging strain of *Clostridium difficile* associated with outbreaks of severe disease in North America and Europe. *Lancet*. 2005 Sep 24-30;366(9491):1079-84.
4. Loo VG, Poirier L, Miller MA, Oughton M, Libman MD, Michaud S, et al. A predominantly clonal multi-institutional outbreak of *Clostridium difficile*-associated diarrhea with high morbidity and mortality. *N Engl J Med*. 2005 Dec 8;353(23):2442-9.
5. Mulligan ME, D. RR, George WG. Contamination of a hospital environment by *Clostridium difficile*. *Current Microbiol* 1979;3:173-5.
6. George WL, Sutter VL, Citron D, Finegold SM. Selective and differential medium for isolation of *Clostridium difficile*. *J Clin Microbiol*. 1979 Feb;9(2):214-9.
7. Perry JD, Asir K, Halimi D, Orenga S, Dale J, Payne M, et al. Evaluation of a chromogenic culture medium for isolation of *Clostridium difficile* within 24 hours. *J Clin Microbiol*. 2010 Nov;48(11):3852-8.
8. Delmee M, Van Broeck J, Simon A, Janssens M, Avesani V. Laboratory diagnosis of *Clostridium difficile*-associated diarrhoea: a plea for culture. *J Med Microbiol*. 2005 Feb;54(Pt 2):187-91.
9. Eastwood K, Else P, Charlett A, Wilcox M. Comparison of nine commercially available *Clostridium difficile* toxin detection assays, a real-time PCR assay for *C. difficile* tcdB, and a glutamate dehydrogenase detection assay to cytotoxin testing and cytotoxigenic culture methods. *J Clin Microbiol*. 2009 Oct;47(10):3211-7.
10. Vanpoucke H, De Baere T, Claeys G, Vanechoutte M, Verschraegen G. Evaluation of six commercial assays for the rapid detection of *Clostridium difficile* toxin and/or antigen in stool specimens. *Clin Microbiol Infect*. 2001 Feb;7(2):55-64.
11. Crobach MJ, Dekkers OM, Wilcox MH, Kuijper EJ. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID): data review and recommendations for diagnosing *Clostridium difficile*-infection (CDI). *Clin Microbiol Infect*. 2009 Dec;15(12):1053-66.
12. van den Berg RJ, Vaessen N, Endtz HP, Schulin T, van der Vorm ER, Kuijper EJ. Evaluation of real-time PCR and conventional diagnostic methods for the detection of *Clostridium difficile*-associated diarrhoea in a prospective multicentre study. *J Med Microbiol*. 2007 Jan;56(Pt 1):36-42.

13. Novak-Weekley SM, Marlowe EM, Miller JM, Cumpio J, Nomura JH, Vance PH, et al. Clostridium difficile testing in the clinical laboratory by use of multiple testing algorithms. J Clin Microbiol. 2010 Mar;48(3):889-93.
14. Sharp SE, Ruden LO, Pohl JC, Hatcher PA, Jayne LM, Ivie WM. Evaluation of the C.Diff Quik Chek Complete Assay, a new glutamate dehydrogenase and A/B toxin combination lateral flow assay for use in rapid, simple diagnosis of clostridium difficile disease. J Clin Microbiol. 2010 Jun;48(6):2082-6.
15. Swindells J, Brenwald N, Reading N, Oppenheim B. Evaluation of diagnostic tests for Clostridium difficile infection. J Clin Microbiol. 2010 Feb;48(2):606-8.
16. Wren MW, Sivapalan M, Kinson R, Shetty NR. Laboratory diagnosis of clostridium difficile infection. An evaluation of tests for faecal toxin, glutamate dehydrogenase, lactoferrin and toxigenic culture in the diagnostic laboratory. Br J Biomed Sci. 2009;66(1):1-5.

2.3. Cultuur M/11297 *Shigella sonnei*

Deze stam werd correct geïdentificeerd als een *Shigella sonnei* (*Shigella* groep D) door 94.6 % van de laboratoria en werd vooral rondgestuurd omwille van zijn resistentiepatroon.

De identificatie van deze stam stelde geen problemen. De stam had al de karakteristieke fenotypische kenmerken van dit species: op Kligler en TSI bodem het typische shigella-uitzicht (uitsluitend glucose fermentatie, zonder gas – en H₂S productie), ornithine decarboxylase positief, ONPG positief en indol negatief. Ook met de commerciële systemen API-20E, Vitek en Phoenix was identificatie van deze stam heel goed mogelijk. Met massaspectrometrie is identificatie van *Shigella* problematisch omwille van de sterke gelijkenis met *Escherichia coli* (1).

Tabel 1 geeft een overzicht van het correcte resultaat en de bekomen resultaten voor het antibiogram van deze *S. sonnei*. De resistentie tegen co-trimoxazol en fluorochinolones werd probleemloos gerapporteerd door meer dan 98% van de laboratoria. Ook de gevoeligheid voor derde generatie cefalosporines werd probleemloos gedetecteerd. De stam was daarnaast ook gevoelig voor ampicilline en amoxicilline. Door meer dan 14% van de laboratoria werd de stam echter als resistent gerapporteerd. Verdere analyse van de resultaten toonde aan dat gebruikers van diffusietechnieken met papieren schijfjes of RoscoNeosensitabs en gebruikers van Phoenix correcte resultaten voor deze aminopenicillines bekwamen. Drie en twintig van de 84 (27%) Vitek gebruikers rapporteerden echter een foutieve resistentie. Post factum zou het nuttig en ook noodzakelijk zijn het lotnummer van de gebruikte Vitek kaarten op te sporen en te vergelijken.

Antibioticum	Verwachte resultaat	Totaal	S	I	R
Ampicilline	S	159	135	1	23
Amoxicilline ¹	S	4	3	1	-
Co-trimoxazole	R	159	2	-	157
Ceftriaxone	S	92	89	-	3
Cefotaxime ²	S	30	30	-	-
Ceftazidime ³	S	8	8	-	-
Chinolones					
Nalidixinezuur	R	6	-	-	6
Ciprofloxacin	R	129	-	3	126
Levofloxacin	R	22	-	3	19
Norfloxacin	R	13	-	-	13
Ofloxacin	R	4	1	-	3
Chinolone ⁴	R	6	-	-	6

¹ Een aantal laboratoria hebben de gevoeligheid voor amoxicilline in plaats van voor ampicilline getest.

² Een aantal laboratoria hebben de gevoeligheid voor cefotaxime in plaats van voor ceftriaxone getest.

³ Een aantal laboratoria hebben de gevoeligheid voor ceftazidime in plaats van voor ceftriaxone getest.

⁴ Een aantal laboratoria vermelden de naam van het gebruikte chinolone niet.

Het jaarverslag van het Nationaal Referentielaboratorium voor *Salmonella* en *Shigella* geeft aan dat er in 2010, 357 *Shigella* stammen geanalyseerd werden met de volgende verdeling over de 4 species: *S. sonnei* (248), *S. flexneri* (94), *S. boydii* (12) en *S. dysenteriae*(3). In België was *S. sonnei* dus verantwoordelijk voor 69% van de infecties die door het centrum bevestigd werden. Op basis van de gegevens kan men een incidentiecijfer berekenen van 8/100.000 bij kinderen in de leeftijdscategorie van 1 tot 4 jaren, maar een incidentie van slechts 1/100.000 bij volwassenen boven de leeftijd van 65 jaren (2).

Shigella infecties verlopen dikwijls onder de vorm van kleine epidemies in families of gesloten gemeenschappen. In de periode april-augustus 2008 werd er een epidemie met *S. sonnei*

dysenterie beschreven bij 42 patiënten behorend tot 19 Joodse families in Antwerpen (3). Al de stammen hadden eenzelfde patroon met pulsed field gel elektroferese en dit patroon was identiek met de stam geïsoleerd bij de 'index case' die de stam vanuit Israël mee gebracht had. Al de isolaten hadden ook hetzelfde resistentiepatroon: gevoelig voor levofloxacin en derde generatie cefalosporines, maar resistent tegen amoxicilline en co-trimoxazol .

Het Nationaal Referentielaboratorium bewaakt ook de evolutie van de gevoeligheid voor antibiotica bij de ingestuurde isolaten. In 2010 werden 85 isolaten van *S. sonnei* geanalyseerd. De resistentiepercentages waren: ampicilline (10.6%), cefotaxime (2.6%), ciprofloxacin (24.6%), tetracycline (77.6%), chlooramfenicol (2.4%) gentamicine (1.2%), azithromycine (28.2%) en co-trimoxazol (85.9%). CLSI breekpuntconcentraties werden voor de interpretatie gebruikt, behalve voor azithromycine waarvoor geen CLSI richtlijnen bestaan.

De hoge fluorochinolone resistentie, die ook in België vastgesteld wordt is wellicht geïmporteerd vanuit Azië. Bij deze stammen vindt men zowel puntmutaties in het 'Quinolone Resistance Determining Regions (QRDR)' van het *gyrA* (Serine 83 en Aspartinezuur 87) als het *parC*(serine 80). In een minderheid van de fluorochinoloneresistente isolaten worden ook plasmiden met *qnr*genen gevonden. Fenotypisch vertonen de stammen met mutaties in de *gyrA* en *parC* genen steeds resistentie tegen nalidixinezuur (MIC > 32 µg/ml) stammen met plasmiden gecodeerde resistentie daarentegen blijven gevoelig voor nalidixinezuur (MIC ≤ 8 µg/ml) (4).

Ook bij *Shigella* wordt productie van extended spectrum β-lactamasen (ESBLs) vooral in Azië maar ook elders in toenemende mate gesignaleerd. Een recente publicatie uit China maakt ons alert op hun voorkomen bij *S. flexneri* en *S. sonnei*; belangrijk is de grote verscheidenheid van *bla*types die gevonden worden: CTX-M, CTM-M en CMY (5). In sommige stammen werd ook reeds de combinatie van fluorochinolone-resistentie en ESBL productie vastgesteld (6).

Vele standaardwerken blijven fluorochinolones aanraden voor de empirische therapie, maar de toenemende resistentie zal ons waarschijnlijk tot een aanpassing van deze richtlijnen nopen. Azithromycine in een dosis van 500 mg/d gedurende drie dagen is een te overwegen alternatief (7). Fluorochinoloneresistentie in *Shigella* is in tegenstelling met *Salmonella Typhi* waarschijnlijk een minder groot therapeutische probleem omdat de infectie beperkt blijft tot een invasie van de darmepitheelcellen zonder bacteriëmie.

J. Verhaegen, UZ Gasthuisberg

Referenties

1. Steensels D, Verhaegen J, Lagrou K. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for the identification of bacteria and yeasts in a clinical microbiological laboratory: a review. *Act Clin Belg* 2011, 66(4), 267-73.
2. Jaarverslag Nationaal Referentiecentrum voor *Salmonella* en *Shigella* 2010
3. De Schrijver K, Bertrand S, Gutiérrez Garitano I, Van den Branden D, Van Schaeren J. Outbreak of *Shigella sonnei* infections in the Orthodox Jewish Community of Antwerp, Belgium, April to August 2008. www.eurosurveillance.org
4. Folster JP, Pecic G, Bowen A, Rickert R, Carattoli A, Whichard J. Decreased susceptibility to ciprofloxacin among *Shigella* isolates in the United States, 2006-2009. *Antimicrob Agents Chemother* 2011, 55(4), 1758-60.
5. Wenli Zhang, Yanping Luo, Lan Li, Yue Ma, Changqin Hu, Shaohong Jin, Lu Ran, Shenghui Cui. Wide dissemination of multidrug-resistant *Shigella* isolates in China. *J Antimicrob Chemother* 2011, 66, 2527-35.
6. Soham Gupta, Baijayanti Mishra, Sethumadhavan Muralidharan, Hiresave Srinivasa. Ceftriaxone resistant *Shigella flexneri*, an emerging problem. *Indian Journal of Medical Sciences*, 2010, 64, 556-559.
7. Dupont HL. Approach to the patient with infectious colitis. *Current Opinion in Gastroenterology* 2011, Epub ahead of print.

III. Resultaten van de identificaties

168 laboratoria hebben een antwoord ingestuurd. Naast 165 Belgische en Luxemburgse waren dit 2 buitenlandse en één firmalaboratorium. Deze laatste 3 werden niet in de verwerking der resultaten opgenomen.

De correcte of aanvaardbare resultaten zijn onderlijnd.

3.1. Cultuur M/11022 *Neisseria meningitidis* (urine)

Het staal was voorzien van volgende klinische inlichtingen: “Een man dient zich in het ziekenhuis aan met klachten wijzend op urethritis. Rechtstreeks onderzoek eerste urine portie: neutrofielen ++++. Identificatie tot op het speciesniveau is voldoende.”

<u><i>Neisseria meningitidis</i></u> ¹	132	80.0%
<u><i>Neisseria meningitidis</i> serogroep C</u>	4	2.4%
<i>Neisseria meningitidis</i> + contaminanten (Bacillus,...) ²	1	
<i>Neisseria</i> species	6	
<i>Neisseria gonorrhoeae/meningitidis</i>	1	
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	5	
<i>Neisseria cinerea</i>	1	
<i>Neisseria mucosa</i>	1	
<i>Neisseria sicca/mucosa</i>	1	
<i>Enterococcus faecalis</i>	1	
<i>Escherichia coli</i>	1	
<i>Moraxella nonliquefaciens</i>	1	
<i>Oligella urealytica</i>	1	
<i>Oligella urethralis</i>	1	
<i>Pasteurella</i> species	1	
Afwezigheid van pathogenen ³	4	
Geen groei	3	

¹ Twee laboratoria vermeldden dat ze deze kiem voor de betrokken afnameplaats als niet pathogeen beschouwen. Twee andere vermeldden dat ze deze kiem in routine niet opsporen voor deze oorsprong. Drie laboratoria vermeldden dat *N. meningitidis* geen klassieke verwekker is van UTI maar dat er wel case reports beschreven zijn.

² Dit labo vermeldt dat in routine zou geantwoord worden: “Gecontamineerd, drie verschillende kiemen. Controle op een nieuw midstream staal gewenst.”

³ Twee van deze laboratoria vermeldden wel dat ze *N. meningitidis* gekweekt hebben.

Overzicht van de antwoorden op de vraag of dit staal in routine doorgestuurd zou worden:

Antwoord	N labo's
Epidemiologische redenen	55
Confirmatie van identificatie en/of antibiogram ¹	20
Epidemiologische redenen + confirmatie van identificatie en/of antibiogram	29
Epidemiologische redenen + typering	1
Epidemiologische redenen + andere redenen (niet gepreciseerd)	1
Aanwezigheid in urine	1
Andere redenen (niet gepreciseerd)	1
Reden van doorstuur niet vermeld	1
Wordt niet doorgestuurd	48
Geen antwoord op de vraag	8
Totaal	165

¹ Eén laboratorium geeft aan dat het enkel de confirmatie van het antibiogram betreft.

3.2. Cultuur M/11064 afwezigheid van *Clostridium difficile* (wel *C. tertium*) (stoelgang)

De stalen M/11064, M/11065 en M/11066 waren voorzien van volgende klinische inlichtingen: "Drie stoelgangstalen die afkomstig zijn van patiënten met vloeibare diarree, verblijvend in een revalidatiecentrum en die recent meerdere kuren antibiotica gekregen hebben. Er wordt u gevraagd om zowel kweek als toxinebepaling voor *C. difficile* uit te voeren."

<u>Negatief</u> ¹	154	93.3%
<u>Afwezigheid van pathogenen</u>	3	1.8%
<u>Banale coliforme flora</u>	1	0.6%
<u>Niet uitgevoerd</u> ²	1	0.6%
<i>Clostridium difficile</i>	1	
Geen groei	2	
Doorstuur naar andere campus/ziekenhuis	3	

¹ Negatief betekent "afwezigheid van *C. difficile*"

² Eén laboratorium voert enkel bepaling van GDH (glutamaat dehydrogenase) uit (negatief op dit staal).

Acht laboratoria (waaronder het hierboven reeds aangehaalde laboratorium) vermelden dat GDH negatief is.

Resultaten van de toxine-bepaling (N = 162; de 3 laboratoria die geen kweek uitvoeren in routine, sturen hun stalen eveneens door voor toxine-bepaling):

<u>Negatief</u>	156	93.3%
<u>Negatief voor toxine A</u>	1	0.6%
Niet uitgevoerd	4	
Positief voor toxine A en B	1	

Overzicht van de antwoorden op de vraag of dit staal in routine doorgestuurd zou worden:

Antwoord	N labo's
Epidemiologische redenen	1
Eén van de laboratoria die deze stalen in routine doorsturen	1
Wordt niet doorgestuurd	138
Geen antwoord op de vraag	25
Totaal	165

3.3. Cultuur M/11065 *Clostridium difficile*, toxine negatief (stoelgang)

<u><i>Clostridium difficile</i></u> ¹	76	46.1%
<u>Positief</u>	71	43.0%
Negatief	14	
Banale coliforme flora	1	
Doorstuur naar andere campus/ziekenhuis	3	

¹ Vijftien laboratoria vermeldden expliciet dat het een niet-toxinogene *C. difficile* betreft.

Tien laboratoria vermelden dat GDH positief is.

Resultaten van de toxine-bepaling (N = 162):

<u>Negatief</u>	158	97.5%
<u>Negatief voor toxine A en B</u>	3	1.9%
<u>Negatief voor toxine A</u>	1	0.6%

Overzicht van de antwoorden op de vraag of dit staal in routine doorgestuurd zou worden:

Antwoord	N labo's
Epidemiologische redenen	8
Confirmatie van identificatie en/of antibiogram	2
Uitsluiten van ribotype 027	2
Indien meerdere gevallen in zelfde instelling	1
Toxinebepaling op kolonies	1
Eén van de laboratoria die deze stalen in routine doorsturen	1
Wordt niet doorgestuurd	142
Geen antwoord op de vraag	8
Totaal	165

3.4. Cultuur M/11066 Clostridium difficile, toxine Positief (stoelgang)

<u>Positief</u>	80	48.5%
<u>Clostridium difficile</u> ¹	76	43.0%
<u>Clostridium difficile ribotype 087</u>	1	0.6%
<u>Niet uitgevoerd</u> ²	1	
Negatief	3	
Banale coliforme flora	1	
Doorstuur naar andere campus/ziekenhuis	3	

¹ Tien laboratoria vermeldden expliciet dat het een toxigene *C. difficile* betreft.

² Eén laboratorium voert enkel bepaling van GDH (glutamaat dehydrogenase) uit (positief op dit staal).

Twee van de 3 labo's die "negatief" antwoorden voor de cultuur, bekwamen een positief resultaat voor de toxines; het derde labo bekwam ook voor de toxines een negatief resultaat.

Negen laboratoria (waaronder het hierboven reeds aangehaalde laboratorium) vermelden dat GDH positief is.

Resultaten van de toxine-bepaling (N = 162):

<u>Positief</u>	153	94.4%
<u>Positief voor toxine A en B</u>	6	3.7%
<u>Positief voor toxine A en/of B</u>	1	0.6%
<u>Positief voor toxine A</u>	1	0.6%
Negatief	1	

Overzicht van de antwoorden op de vraag of dit staal in routine doorgestuurd zou worden:

Antwoord	N labo's
Epidemiologische redenen ¹	65
Epidemiologische redenen + confirmatie van identificatie en/of antibiogram	4
Epidemiologische redenen + ribotypering i.g.v. hospitalisatie in kader van NSIH protocol	1
Uitsluiten van ribotype 027	4
Typering	1
I.g.v. hospitalisatie in kader van NSIH protocol	2
Indien meerdere gevallen in zelfde instelling	1
Eén van de laboratoria die deze stalen in routine doorsturen	1
Enkel in kader van onderzoek en studies	1
Andere redenen (niet gepreciseerd)	1
Wordt niet doorgestuurd	79
Geen antwoord op de vraag	5
Totaal	165

¹ Vier laboratoria vermelden dat het de 1^e 5 stammen/semester betreft, één dat het de 1^e 5 stammen/jaar betreft en één dat het de eerste 5 stammen betreft. Eén labo vermeldt dat het de 1^e 6 stammen/semester betreft en één dat het de 1^e 6 stammen betreft. Eén laboratorium vermeldt dat het ≥ 10 stammen betreft. Eén laboratorium vermeldt dat dit in het kader van de NSIH gebeurt (NSIH = national surveillance of healthcare associated infections and antimicrobial resistance in Belgian hospitals).

Opmerking: gebruikte technieken voor bepaling van toxine

146 laboratoria gebruikten 1 methode, 15 gebruikten 2 methoden en 1 gebruikte 3 methoden: er werden met andere woorden 179 technieken vermeld. Eén laboratorium dat twee technieken gebruikt vermeldt dat de 2^e techniek gebruikt wordt in geval er een discordantie is tussen GDH- en toxine-bepaling (in dat geval wordt ook een cultuur uitgevoerd); een tweede vermeldt dat één test gebruikt wordt voor de rechtstreekse bepaling op het staal en de andere voor bepaling op de cultuur.

Een aantal laboratoria vermeldden dat ze zowel op het staal als op de cultuur de toxines bepaald hebben; op één labo na (dat voor staal M/11066 een negatief resultaat voor de rechtstreekse bepaling en een positief voor de cultuur bekam), waren deze 2 resultaten steeds met elkaar in overeenstemming

5 laboratoria vermeldden het gebruik van een in house techniek: 4 laboratoria onderzochten het cytotoxisch effect op celculturen en 1 laboratorium vermeldde het gebruik van een multiplex PCR gekoppeld aan een fragment-analyse.

In onderstaande tabel wordt een overzicht gegeven van de 174 gebruikte commerciële methoden.

Fabrikant	Kit	N gebruikers
bioMérieux	VIDAS C. difficile toxine A II (CDAB)	33
Cepheid	Xpert C. difficile	2
Fast Track Diagnostics	C. difficile	1
Meridian	ImmunoCard Toxins A & B	21
	Premier C. difficile Toxin A&B	3
	Illumigene Clostridium difficile	3
	ImmunoCard STAT! Toxin A	2
Oxoid	Xpect Clostridium difficile Toxin A/B	12
Techlab (distributeur Alere Health)	C. Diff Quik Chek Complete	80
	Tox A/B Quik chek	13
	C. difficile Tox A/B II	3
	C. difficile Toxin/Antitoxin Kit	1
Totaal		174

3.5. Cultuur M/11297 *Shigella sonnei* (stoelgang)

Het staal was voorzien van volgende klinische inlichtingen: “Een 25-jarige vrouw wordt in het ziekenhuis opgenomen met koorts en slijmerige diarree. Identificatie tot op het speciesniveau is voldoende.”

<i>Shigella sonnei</i>	156	94.6%
<i>Shigella species</i>	8	4.8%
Staal wordt in routine doorgestuurd	1	

Overzicht van de antwoorden op de vraag of dit staal in routine doorgestuurd zou worden:

Antwoord	N labo's
Epidemiologische redenen	98
Confirmatie van identificatie en/of antibiogram ¹	9
Epidemiologische redenen + confirmatie van identificatie en/of antibiogram ²	40
Het laboratorium dat deze stalen in routine doorstuurt	1
Wordt niet doorgestuurd	15
Geen antwoord op de vraag	2
Totaal	165

¹ Eén laboratorium geeft aan dat het enkel de confirmatie van de identificatie betreft.

² Drie laboratoria geven aan dat het enkel de confirmatie van de identificatie betreft.

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.

Aantal deelnemers = 164 (het labo dat fecesstalen in routine verstuurt, heeft uiteraard geen antibiogram bepaald).

4.1. M/11297 *Shigella sonnei*

Niet alle deelnemers bepaalden de gevoeligheid voor alle antibiotica. Sommige deelnemers bepaalden de gevoeligheid voor meer dan één fluorochinolone. Sommige deelnemers bepaalden de gevoeligheid met meer dan 1 methode; meestal kwamen deze resultaten overeen; waar dit niet het geval was, werd er geopteerd om in onderstaande tabel het meest resistente resultaat weer te geven.

Twee laboratoria vermeldden de aanwezigheid van een verworven penicillinase; één labo gaf aan dat ESBL negatief was.

Vier laboratoria vermeldden dat ceftriaxone in routine niet getest wordt voor fecesstalen en één labo dat cefalosporines van de 3^e generatie niet getest worden voor deze stalen. Één laboratorium gaf aan dat ceftriaxone voor *Shigella* sp. enkel getest wordt voor invasieve isolaten.

Tabel 4.1.1. Resultaten der laboratoria voor de antibiogrammen voor staal M/11297 (*Shigella sonnei*).

<i>Antibioticum</i>	<i>Verwachte resultaat</i>	<i>Totaal</i>	<i>S</i>	<i>I</i>	<i>R</i>
Ampicilline	S	159	135	1	23
Amoxicilline ¹	S	4	3	1	-
Co-trimoxazole	R	159	2	-	157
Ceftriaxone	S	92	89	-	3
Cefotaxime ²	S	30	30	-	-
Ceftazidime ³	S	8	8	-	-
Chinolones					
Nalidixinezuur	R	6	-	-	6
Ciprofloxacin	R	129	-	3	126
Levofloxacin	R	22	-	3	19
Norfloxacin	R	13	-	-	13
Ofloxacin	R	4	1	-	3
Chinolone ⁴	R	6	-	-	6

¹ Een aantal laboratoria hebben de gevoeligheid voor amoxicilline in plaats van voor ampicilline getest.

² Een aantal laboratoria hebben de gevoeligheid voor cefotaxime in plaats van voor ceftriaxone getest.

³ Een aantal laboratoria hebben de gevoeligheid voor ceftazidime in plaats van voor ceftriaxone getest.

⁴ Een aantal laboratoria vermelden de naam van het gebruikte chinolone niet.

Wij willen er op aandringen dat u de naam van het gebruikte chinolone zou vermelden: dit komt de verwerking van de resultaten ten goede.

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.

De resultaten van de laboratoria die de Osiris gebruikt hebben om de diameters van de papieren schijfjes af te lezen vindt u in tabel 4.1.8.

Tabel 4.1.2. Bekomen diameters met de papieren schijfjes voor staal M/11297 (*Shigella sonnei*).

<i>Antibioticum</i>	Aantal gebruikers met vermelding van lading (Totaal aantal gebruikers)	Lading ($\mu\text{g/schijfje}$)	Mediane diameter	Grenswaarden diameter	Resultaat (Totaal aantal gebruikers)		
					S	I	R
Ampicilline	24 (27)	10	21	17 – 25	26	-	1
Amoxicilline	1 (1)	25	20	20 – 20	-	1	-
Co-trimoxazole ¹	26 (29)	1.25 + 23.75	6	5 -11	-	-	29
Ceftriaxone	15 (19)	30	32	24 – 38	19	-	-
Cefotaxime	5 (5)	30	33	30 – 38	5	-	-
Chinolones							
Nalidixinezuur	1 (1)	30	6	6 – 6	-	-	1
Ciprofloxacin	17 (19)	5	14	8 – 16	-	-	19
Levofloxacin	3 (3)	5	14	14 – 16	-	1	2
Norfloxacin	1 (1)	10	12	12 – 12	-	-	1
Ofloxacin	2 (2)	5	10.5	10 – 11	-	-	2
Chinolone	1 (1)	5	14	14 – 14	-	-	1

¹ Eén laboratorium vermeldde een diameter van "0"; dit resultaat werd evenmin in de verwerking van de diameters opgenomen.

Zoals in voorgaande rapporten vermeldden wij voor de Neosensitabs schijfjes de schijfjes met klassieke Neosensitabs ladingen ("old") en met de nieuwe ladingen ladingen ("new")

afzonderlijk. U vindt de resultaten in tabellen 4.1.3. a en b. De resultaten van de laboratoria die de Sirscan gebruikt hebben om de diameters van deze schijfjes af te lezen vindt u in tabellen 4.1.9 a en b.

Tabel 4.1.3.a. Bekomen diameters met de Neosensitabs schijfjes (klassieke Neosensitabs ladingen) voor staal M/11297 (*Shigella sonnei*)

Antibioticum	Aantal gebruikers met vermelding van lading (Totaal aantal gebruikers)	Lading ($\mu\text{g/schijfje}$)	Mediane diameter	Grenswaarden diameter	Resultaat (Totaal aantal gebruikers)			
					S	I	R	*
Ampicilline	18 (23)	33	26	23 – 29	23	-	-	-
Amoxicilline	2 (2)	30	24.5	24 – 25	2	-	-	-
Co-trimoxazole	23 (26)	5.2 + 240	9	9 – 10	-	-	26	-
Ceftriaxone	20 (24)	30	34	27 – 40	22	-	2	-
Chinolones								
Ciprofloxacin	15 (16)	10	16	13 – 17	-	4	11	1 ¹
Levofloxacin	2 (5)	5	14	13 – 15	-	2	3	-
Norfloxacin	3 (3)	10	10	10 – 10	-	-	3	-
Ofloxacin	1 (1)	10	14	14 – 14	-	-	1	-
Chinolone	1 (1)	10	9	9 – 9	-	-	1	-

¹ Eén laboratorium verwees naar het resultaat van de MIC-bepaling ("R").

Tabel 4.1.3.b. Bekomen diameters met de Neosensitabs schijfjes (nieuwe ladingen) voor staal M/11297 (*Shigella sonnei*).

Antibioticum	Aantal gebruikers met vermelding van lading (Totaal aantal gebruikers)	Lading ($\mu\text{g/schijfje}$)	Mediane diameter	Grenswaarden diameter	Resultaat (Totaal aantal gebruikers)		
					S	I	R
Ampicilline	5 (8)	10	21	20 – 25	8	-	-
Co-trimoxazole ¹	5 (10)	1.25 + 23.75	9	9 – 10	1	-	9
Ceftriaxone	3 (4)	30	33	31 – 40	4	-	-
Chinolones							
Ciprofloxacin	4 (5)	5	13	12 – 15	-	-	5
Norfloxacin	- (1)	-	-	-	-	-	1
Ofloxacin	1 (1)	5	38	38 – 38	1	-	-
Chinolone	1 (1)	5	12	12 – 12	-	-	1

¹ Tevens antwoordde één laboratorium een diameter <10 mm. en een ander laboratorium een diameter van 34 mm. (dit is het labo dat het resultaat "S" verstrekte).

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/11297 (*Shigella sonnei*).

<i>Antibioticum</i>	<i>Aantal laboratoria</i>	<i>Resultaat</i>	<i>MIC-waarde (mg/L)</i>
Ampicilline	3	2 x S 1 x R	1.5 mg/L; 4 mg/L 8 mg/L
Co-trimoxazole	1	1 x R	>32 mg/L
Ceftriaxone	4	4 x S	<0.016 mg/L; 0.023 mg/L; 0.032 mg/L; 0.04 mg/L
Chinolones			
Ciprofloxacin	2	2 x R	2 x 4 mg/L
Levofloxacin	2	2 x R	4 mg/L; 6 mg/L

Één laboratorium gebruikte de MIC test Strip voor de bepaling van de MIC-waarde van ampicilline: 3 mg/L (“S”).

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

Tabel 4.1.5. Resultaten bekomen met de Vitek voor staal M/11297 (*Shigella sonnei*).

<i>Antibioticum</i>	<i>Vitek 2</i>					<i>Vitek 2 compact</i>				
	<i>Finaal resultaat</i>			<i>Meest vermelde MIC waarde (mg/L)</i>	<i>Aantal labo's dat deze MIC waarde vermeldde (Totaal aantal gebruikers)</i>	<i>Finaal resultaat</i>			<i>Meest vermelde MIC waarde (mg/L)</i>	<i>Aantal labo's dat deze MIC waarde vermeldde (Totaal aantal gebruikers)</i>
	<i>S</i>	<i>I</i>	<i>R</i>			<i>S</i>	<i>I</i>	<i>R</i>		
Ampicilline	44	-	9	8	37 (53)	17	1	13	8	20 (31)
Co-trimoxazole	1	-	46	160	27 (47)	-	-	26	160	18 (26)
Ceftriaxone	15	-	1	≤1	13 (16)	7	-	-	≤1	7 (7)
Cefotaxime	14	-	-	≤1	14 (14)	7	-	-	≤1	7 (7)
Ceftazidime	3	-	-	≤1	3 (3)	4	-	-	≤1	4 (4)
Chinolones										
Nalidixinezuur	-	-	2	≥32	2 (2)	-	-	1	-	- (1)
Ciprofloxacin	-	-	45	≥4	44 (45)	-	-	25	≥4	23 (25)
Levofloxacin	-	-	5	≥8	5 (5)	-	-	7	≥8	5 (7)
Norfloxacin	-	-	6	≥16	4 (6)	-	-	1	≥16	1 (1)
Chinolone	-	-	2	≥4	2 (2)	-	-	1	≥16	1 (1)

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 ampicilline met Vitek 2 vonden 2 laboratoria een MIC van 2 mg/L, 10 laboratoria een MIC van 4 mg/L, 1 laboratorium een MIC van 16 mg/L en 1 laboratorium een MIC van 4→8 mg/L; met Vitek 2 compact vonden 6 laboratoria een MIC van 4 mg/L, 2 laboratoria een MIC van 16 mg/L en 1 laboratorium een MIC ≥32 mg/L
- voor co-trimoxazole met Vitek 2 vond 1 laboratorium een MIC van 64 mg/L, 4 laboratoria een MIC van 80 mg/L, 11 laboratoria een MIC ≥320 mg/L, één labo een

MIC ≥ 32 mg/L en 1 labo een MIC ≤ 20 mg/L (interpretatie "S"); met Vitek 2 compact vond 1 labo een MIC van 80 mg/L en 5 labo's een MIC ≥ 320 mg/L

- voor ceftriaxone vond 1 laboratorium een MIC van 2 mg/L met Vitek 2
- voor levofloxacin vond 1 laboratorium een MIC ≥ 4 mg/L met Vitek 2 compact
- voor norfloxacin vond 1 laboratorium een MIC van 8 mg/L met Vitek 2

Gezien het relatief hoge aantal resistente resultaten voor ampicilline, dat met de Vitek bekomen werd, hebben wij het staal aan de firma bioMérieux bezorgd voor verder onderzoek. Hieronder vindt u het besluit van hun onderzoek:

"We duplicated the customer issue.

We reproduced the customer's variability of results with MIC variability probably due to the growth (weak) of the strain in the PC well. So we observed some false resistances for Ampicillin.

Indeed, we can see a very weak growth on strain in the PC well. This observation explains the variability of MIC results (>,<) which leads to some false resistances for Ampicillin.

These data and organism have been forwarded to R&D. This complaint is now closed at the global level."

De resultaten bekomen met de ATB methode worden weergegeven in tabel 4.1.6.

Tabel 4.1.6. Resultaten bekomen met de ATB methode voor staal M/11297 (*Shigella sonnei*).

<i>Antibioticum</i>	<i>Resultaat</i>		
	<i>S</i>	<i>I</i>	<i>R</i>
Ampicilline	3	-	-
Amoxicilline	1	-	-
Co-trimoxazole	-	-	4
Ceftriaxone	3	-	-
Ceftazidime	1	-	-
Chinolones			
Ciprofloxacin	-	-	4
Levofloxacin	-	-	1
Norfloxacin	-	-	1

De resultaten bekomen met Phoenix worden weergegeven in tabel 4.1.7.

Tabel 4.1.7. Resultaten bekomen met de Phoenix voor M/11297 (*Shigella sonnei*).

<i>Antibioticum</i>	<i>Resultaat</i>			<i>Meest vermelde MIC waarde (mg/l)</i>	<i>Aantal labo's dat deze MIC waarde vermeldde (Totaal aantal gebruikers)</i>
	<i>S</i>	<i>I</i>	<i>R</i>		
Ampicilline	12	-	-	≤ 2	11 (12)
Co-trimoxazole	-	-	12	$\geq 4/76$	12 (12)
Ceftriaxone	12	-	-	≤ 1	12 (12)
Chinolones					
Ciprofloxacin	-	-	12	≥ 1	12 (12)

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. Voor ampicilline vond 1 laboratorium echter een MIC <1 mg/L.

De resultaten bekomen met de toestellen Osiris en Sirscan worden weergegeven in tabellen 4.1.8. en 4.1.9 a en b. De berekeningen van mediaan, minimum en maximum zijn echter niet uitgevoerd omwille van het beperkte aantal deelnemers voor deze kiem.

Tabel 4.1.8. bekomen met de Osiris voor staal M/11297 (*Shigella sonnei*).

<i>Antibioticum</i>	<i>N gebruikers</i>	<i>Resultaat</i>		
		<i>S</i>	<i>I</i>	<i>R</i>
Ampicilline	5	5	-	-
Co-trimoxazole	5	-	-	5
Ceftriaxone	2	2	-	-
Cefotaxime	2	2	-	-
Chinolones				
Ciprofloxacin	4	-	-	4
Levofloxacin	1	-	-	1

Tabel 4.1.9.a. Resultaten bekomen met de Sirscan met de Neosensitabs schijfjes (klassieke Neosensitabs ladingen) voor staal M/11297 (*Shigella sonnei*).

<i>Antibioticum</i>	<i>N gebruikers</i>	<i>Resultaat</i>		
		<i>S</i>	<i>I</i>	<i>R</i>
Ampicilline	5	5	-	-
Co-trimoxazole	5	-	-	5
Ceftriaxone	3	3	-	-
Cefotaxime	2	2	-	-
Chinolones				
Nalidixinezuur	1	-	-	1
Ciprofloxacin	2	-	-	2
Levofloxacin	2	-	1	1
Norfloxacin	1	-	-	1

Tabel 4.1.9.b. Resultaten bekomen met de Sirscan met de Neosensitabs schijfjes (nieuwe ladingen) voor staal M/11297 (*Shigella sonnei*).

<i>Antibioticum</i>	<i>N gebruikers</i>	<i>Resultaat</i>		
		<i>S</i>	<i>I</i>	<i>R</i>
Ampicilline	5	5	-	-
Co-trimoxazole	5	-	-	5
Ceftriaxone	3	3	-	-
Cefotaxime	2	2	-	-
Chinolones				
Ciprofloxacin	4	-	-	4
Levofloxacin	1	-	1	-

We moeten verder nog vermelden dat:

- twee laboratoria de diameter van de papieren schijfjes afgelezen hebben met de Sirscan : het ene voor voor ampicilline (“S”), co-trimoxazole, nalidixinezuur en ciprofloxacin (alle drie “R”); het tweede voor ampicilline (“S”) en voor co-trimoxazole en ciprofloxacin (beide “R”)
- één laboratorium de Microscan gebruikt heeft voor het testen van de gevoeligheid voor ampicilline, co-trimoxazole, nalidixinezuur en levofloxacin (met de verwachte resultaten voor al deze antibiotica)
- twee laboratoria vermeldden de gevoeligheid voor ceftriaxon (“S”) afgeleid te hebben van de gevoeligheid voor cefotaxime

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:

- ampicilline:
 - o S→R
 - E-test: 1 labo (mede gebaseerd op het resultaat van andere technieken)
 - Vitek 2: 8 labo’s (waarvan 1 mede gebaseerd op het resultaat van andere technieken)
 - o I→R
 - Vitek 2: 1 labo
- ceftriaxon:
 - o S→R
 - Vitek 2: 1 labo
- levofloxacin
 - o I→R
 - Osiris: 1 labo (mede gebaseerd op het resultaat van andere technieken)
 - E-test: 1 labo (afhankelijk van gebruikte richtlijn: ruwe resultaat van 4 mg/L is “I” volgens CLSI en “R” volgens EUCAST)

V. Parasitologie

5.1. De monsters

Ter gelegenheid van deze enquête werden 2 geformaliseerde fecesstalen verzonden
160 laboratoria hebben aan deze enquête deelgenomen.

Het aantal toolkit gebruikers bedroeg 52.5%. 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 stalen waren vergezeld van volgende klinische informatie:

P/10977

Stoelgangsstaal van een 3-jarig adoptiekindje uit Ethiopië met een goede gezondheid, dus zonder klachten.

P/11307

Een 41-jarige expatriate die al 20 jaar in Sri Lanka werkt, komt voor een check-up en heeft geen klachten.

Staal P/10977 bevatte eieren van *Ancylostomatoidea*, cysten van *Giardia lamblia* en cysten van *Endolimax nana*.

Staal P/11307 bevatte cysten van *Blastocystis hominis*

Wij willen herhalen dat u, ingeval van twijfel of beschadiging van een staal, in de loop van een enquête steeds een 2^e staal mag vragen.

5.2 Resultaten voor staal P/10977

De 160 laboratoria leverden 416 antwoorden in. Drie laboratoria antwoordden “Afwezigheid van parasieten”, 10 laboratoria antwoordden één parasiet, 49 laboratoria antwoordden 2 parasieten, 87 laboratoria antwoordden 3 parasieten en 11 laboratoria 4 parasieten.

De resultaten worden in onderstaande tabel weergegeven:

Tabel 5.2.1. Resultaten voor staal P/10977

Resultaat	Aantal
Ancylostomatoidea	87
<i>Ancylostoma duodenale</i>	34
<i>Necator americanus</i>	17
<i>Giardia lamblia</i>	145
<i>Endolimax nana</i>	83
<i>Blastocystis hominis</i>	7
<i>Entamoeba hartmanni</i>	19
<i>Entamoeba histolytica</i>	2
<i>Entamoeba histolytica/dispar</i>	1
<i>Entamoeba coli</i>	1
<i>Entamoeba</i> species (niet histolytica)	1
<i>Chilomastix mesnili</i>	1
<i>Cryptosporidium parvum</i>	3
<i>Cyclospora caytanensis</i>	7
<i>Enterobius vermicularis</i>	1
<i>Enteromonas hominis</i>	1
<i>Hymenolepis nana</i>	1
<i>Isospora hominis</i>	1
<i>Trichostrongylus</i> species	1
Afwezigheid van parasieten	3
Totaal	416

Meerdere laboratoria vermeldden dat het microscopisch onmogelijk is *A. duodenale* van *N. americanus* te onderscheiden en antwoordden derhalve Ancylostomatoidea.

Enkele laboratoria hebben mogelijk de stalen verwisseld: één laboratorium dat enkel *B. hominis* antwoordde voor P/10977, antwoordde onder andere *A. duodenale* voor P/11307 (na ontvangst van het voorlopige rapport bevestigde dit laboratorium ons vermoeden); twee laboratoria die “Afwezigheid” antwoordden voor P/11307, antwoordden voor P/11307 onder andere respectievelijk Ancylostomatoidea en *A. duodenale*. Ook één laboratorium dat enkel *C. caytanensis* antwoordde voor p/10977, antwoordde onder andere *A. duodenale* voor P/11307; en één laboratorium dat *G. lamblia* antwoordde voor P/10977, antwoordde *N. americanus* voor P/11307.

Alle laboratoria zouden op zijn minst de beide pathogenen (Ancylostomatoidea en *Giardia lamblia*) moeten teruggevonden hebben; antwoorden die deze beide kiemen niet vermelden, dienen als incorrect beschouwd te worden.

De combinaties van 2 parasieten welke door de laboratoria geantwoord werden, worden in onderstaande tabel weergegeven.

Tabel 5.2.2. Combinatie van 2 parasieten geantwoord voor staal P/10977

Combinatie van parasieten	Aantal
Ancylostomatoidea + <i>Giardia lamblia</i>	21
Ancylostomatoidea + <i>Endolimax nana</i>	1
Ancylostomatoidea + <i>Entamoeba hartmanni</i>	1
<i>Ancylostoma duodenale</i> + <i>Giardia lamblia</i>	7
<i>Ancylostoma duodenale</i> + <i>Endolimax nana</i>	1
<i>Ancylostoma duodenale</i> + <i>Cyclospora caytanensis</i>	1
<i>Necator americanus</i> + <i>Giardia lamblia</i>	6
<i>Giardia lamblia</i> + <i>Endolimax nana</i>	3
<i>Giardia lamblia</i> + <i>Entamoeba hartmanni</i>	3
<i>Giardia lamblia</i> + <i>Entamoeba</i> species (niet histolytica)	1
<i>Giardia lamblia</i> + <i>Cyclospora caytanensis</i>	3
<i>Entamoeba hartmanni</i> + <i>Cryptosporidium parvum</i>	1
Totaal	49

De combinaties van 3 parasieten welke door de laboratoria geantwoord werden, worden in onderstaande tabel weergegeven.

Tabel 5.2.3. Combinatie van 3 parasieten geantwoord voor staal P/10977

Combinatie van parasieten	Aantal
Ancylostomatoidea + <i>Giardia lamblia</i> + <i>Endolimax nana</i>	50
Ancylostomatoidea + <i>Giardia lamblia</i> + <i>Entamoeba hartmanni</i>	2
Ancylostomatoidea + <i>Giardia lamblia</i> + <i>Entamoeba histolytica</i>	1
Ancylostomatoidea + <i>Giardia lamblia</i> + <i>Enteromonas hominis</i>	1
Ancylostomatoidea + <i>Giardia lamblia</i> + <i>Hymenolepis nana</i>	1
<i>Ancylostoma duodenale</i> + <i>Giardia lamblia</i> + <i>Endolimax nana</i>	13
<i>Ancylostoma duodenale</i> + <i>Giardia lamblia</i> + <i>Blastocystis hominis</i>	1
<i>Ancylostoma duodenale</i> + <i>Giardia lamblia</i> + <i>Entamoeba hartmanni</i>	4
<i>Ancylostoma duodenale</i> + <i>Giardia lamblia</i> + <i>Cyclospora caytanensis</i>	1
<i>Ancylostoma duodenale</i> + <i>Giardia lamblia</i> + <i>Chilomastix mesnili</i>	1
<i>Ancylostoma duodenale</i> + <i>Giardia lamblia</i> + <i>Isospora hominis</i>	1
<i>Necator americanus</i> + <i>Giardia lamblia</i> + <i>Endolimax nana</i>	4
<i>Necator americanus</i> + <i>Giardia lamblia</i> + <i>Entamoeba hartmanni</i>	3
<i>Necator americanus</i> + <i>Giardia lamblia</i> + <i>Entamoeba histolytica</i>	1
<i>Necator americanus</i> + <i>Giardia lamblia</i> + <i>Cyclospora caytanensis</i>	1
<i>Necator americanus</i> + <i>Giardia lamblia</i> + <i>Cryptosporidium parvum</i>	1
<i>Giardia lamblia</i> + <i>Endolimax nana</i> + <i>Trichostrongylus</i> species	1
Totaal	87

De combinaties van 4 parasieten welke door de laboratoria geantwoord werden, worden in onderstaande tabel weergegeven.

Tabel 5.2.4. Combinatie van 4 parasieten geantwoord voor staal

Combinaisons de parasites	Aantal
Ancylostomatoidea + <i>Giardia lamblia</i> + <i>Endolimax nana</i> + <i>Blastocystis hominis</i>	3
Ancylostomatoidea + <i>Giardia lamblia</i> + <i>Endolimax nana</i> + <i>Entamoeba hartmanni</i>	3
<i>Ancylostoma duodenale</i> + <i>Giardia lamblia</i> + <i>Endolimax nana</i> + <i>Blastocystis hominis</i>	1
<i>Ancylostoma duodenale</i> + <i>Giardia lamblia</i> + <i>Endolimax nana</i> + <i>Entamoeba hartmanni</i>	2
<i>Ancylostoma duodenale</i> + <i>Giardia lamblia</i> + <i>Endolimax nana</i> + <i>Entamoeba histolytica</i>	1
<i>Necator americanus</i> + <i>Giardia lamblia</i> + <i>Endolimax nana</i> + <i>Cryptosporidium parvum</i>	1
Totaal	11

Voor Ancylostomidae antwoordden alle 87 laboratoria het evolutiestadium "ei".

De door de laboratoria geantwoorde evolutiestadia voor *Ancylostoma duodenale* worden in tabel 5.2.5. weergegeven.

Tabel 5.2.5. Evolutiestadia voor *Ancylostoma duodenale* voor staal P/10977

Evolutiestadium	Aantal laboratoria
Ei	30
Bevrucht ei	3
Onbevrucht ei	1
Totaal	34

De door de laboratoria geantwoorde evolutiestadia voor *Necator americanus* worden in tabel 5.2.6. weergegeven.

Tabel 5.2.6. Evolutiestadia voor *Necator americanus* voor staal P/10977

Evolutiestadium	Aantal laboratoria
Ei	16
Cyste	1
Totaal	17

De door de laboratoria geantwoorde evolutiestadia voor *Giardia lamblia* worden in tabel 5.2.7. weergegeven.

Tabel 5.2.7. Evolutiestadia voor *Giardia lamblia* voor staal P/10977

Evolutiestadium	Aantal laboratoria
Cyste	140
Ei	2
Oöcyste	1
Trofozoïet	1
Vegetatieve vorm	1
Totaal	145

De door de laboratoria geantwoorde evolutiestadia voor *Endolimax nana* worden in tabel 5.2.8. weergegeven

Tabel 5.2.8 Evolutiestadia voor *Endolimax nana* voor staal P/10977

<i>Evolutiestadium</i>	<i>Aantal laboratoria</i>
Cyste	80
Ei	2
Oöcyste	1
Totaal	83

Een aantal van de afwijkende evolutiestadia voor de verschillende parasieten zijn wellicht te wijten aan het gebruik van oudere codes of aan het aanklikken van het verkeerde stadium op de aflopende lijsten in de toolkit.

Dertig laboratoria zouden het staal in routine doorsturen naar een referentiecentrum; dit betreft 20 laboratoria die onder andere “*Ancylostomatoidea*” antwoorden, 5 die onder andere “*Ancylostoma duodenale*” antwoorden, 4 laboratoria die onder andere “*Necator americanus*” antwoorden en één laboratorium dat “*Giardia lamblia* + *Entamoeba hartmanni*” antwoordde.

Commentaar over *Ancylostomatoidea*

De aanwezigheid van mijnwormen werd correct geantwoord door 138 van de 160 laboratoria (86%).

Mijnwormen behoren tot de superfamilie van de Ancylostomatoidea, de familie van de Ancylostomatidae en de klasse van de nematoden. Nematoden, of rondwormen zijn langgerekte cilindrische wormen die voornamelijk als volwassen wormen in het darmkanaal leven. Mijnwormen danken hun naam aan het feit dat men ze in Midden- en West-Europa voornamelijk in mijnen aantrof waar de temperatuur en luchtvochtigheid hoog genoeg waren.

De twee belangrijkste mijnwormen bij de mens zijn *Necator americanus* en *Ancylostoma duodenale*.

Mijnwormen zijn sterk verspreid in de tropen en subtropen maar ook terug te vinden in vochtige, gematigde klimaten. De mens, die optreedt als eindgastheer, besmet zich bij contact met grond waarin zich infectieuze larven bevinden die doorheen de intacte huid binnendringen wat een kortstondige jeukende dermatitis kan veroorzaken. De larven migreren via de bloedcirculatie naar de longen, worden opgehoest en ingeslikt en bereiken zo de darm waar het ongeveer zes weken duurt tot ze uitgegroeid zijn tot volwassen wormen. Larven van *A. duodenale* kunnen ook via orale transmissie infecties veroorzaken, de migratie via de longen is dus niet vereist zoals bij *N. americanus*.

Volwassen mijnwormen hebben een mondbeker waarmee ze zich vasthechten aan de wand van de dunne darm. Mannelijke wormen hebben achteraan een uitwendig geslachtsorgaan. Bij vrouwelijke wormen is die structuur niet aanwezig, zij hebben rechte, puntige staarten. Volwassen wormen van *N. americanus* zijn 7 tot 11 mm lang en 0,3 mm breed. Volwassenen wormen van *A. duodenale* zijn 8 tot 13 mm lang en 0.4 mm breed. De levensduur van de wormen is meestal 1-2 jaar maar kan meer dan 10 jaar zijn.

De eiproductie per dag varieert van 3.000 tot 6.000 bij *N. americanus* en 5.000 tot 22.000 bij *A. duodenale*. De eieren worden in het darmlumen afgezet en verlaten het lichaam met de ontlasting. Wanneer de eieren uitgescheiden worden, bevatten ze een eicel die zich typisch in het 4- tot 8-cellig stadium van de deling bevindt. Zoals terecht door meerdere deelnemers opgemerkt is het microscopisch onmogelijk de eieren van *A. duodenale* en *N. americanus* van elkaar te onderscheiden en antwoordt men correcter met eieren van Ancylostomatoidea of Ancylostomatidae. Het differentiëren tussen beide soorten heeft weinig klinisch belang.

De eieren zijn 60 tot 80 µm lang en 35 tot 40 µm breed. Wanneer ze in de bodem terecht komen, embryoneren ze. In optimale omstandigheden van temperatuur en luchtvochtigheid komen ze binnen 1 tot 2 dagen uit als rhabditoïde (L1) larven die 250 tot 350 µm lang zijn en 17 µm breed. Deze larven voeden zich met bacteriën in de grond en evolueren in de bodem in ongeveer 1 week tot infectieuze filariforme (L3) larven. Het zijn deze larven die door rechtstreekse penetratie van de huid een humane infectie kunnen veroorzaken.

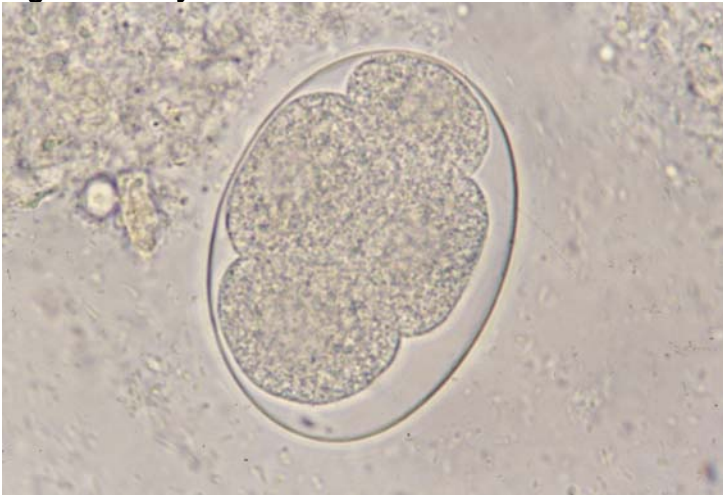
De pathogenese houdt rechtstreeks verband met de hoeveelheid wormen in het lichaam van de patiënt (worm load). Lichte infecties worden goed verdragen en veroorzaken slechts weinig of geen symptomen. Zware infecties veroorzaken algemene klachten zoals vermoeidheid en kunnen gepaard gaan met buikpijn en diarree met bloedverlies. Het bloedverlies is ernstiger bij infecties door *A. duodenale*. Een chronische mijnworminfectie resulteert in hypochrome, ijzerdeficiëntie-anemie en kan oorzaak zijn van een vertraging in de ontwikkeling van jonge kinderen.

De diagnose van de infectie wordt gesteld door het opsporen in verse stoelgang van de ovale, transparante eieren met een zeer dunne schaal. Bij onderzoek van verse feces bevatten de eieren van *A. duodenale* meestal vier blastomeren en die van *N. americanus* meestal acht. De blastomeren zijn bruingrijs van kleur. Bij diarree worden de eieren sneller uitgescheiden en kunnen minder blastomeren aanwezig zijn. In de ontlasting gaat de deling van de blastomeren verder en als het monster pas na een dag onderzocht wordt, is het mogelijk larven terug te vinden in plaats van eieren die men dan moet onderscheiden van die van *Strongyloides*. Concentratiemethoden zoals die van Ridley zijn geschikt voor aanrijking van de eieren.

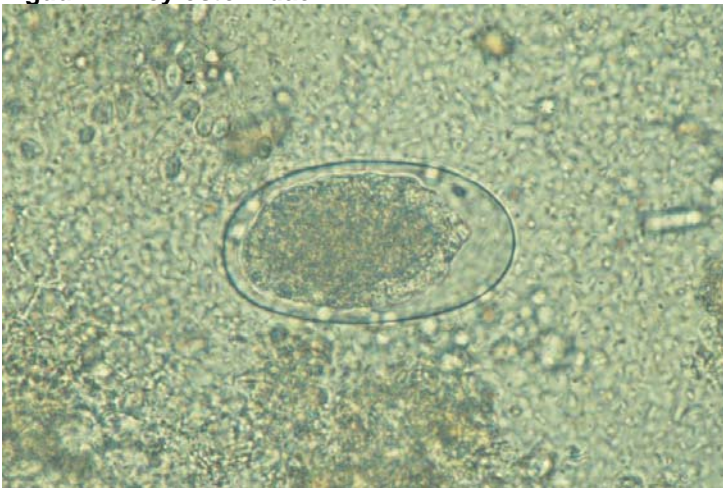
Hoewel eieren van Ankylostomatidae gemakkelijk te herkennen zijn, is verwarring mogelijk met die van *Oesophagostomum*, *Trichostrongylus* en mijten. Eieren van *Trichostrongylus* zijn doorgaans iets groter, aan één kant iets spits en bevatten meestal zestien of meer blastomeren. Daar *Oesophagostomum* een beperkt geografisch voorkomen heeft en op dezelfde manier behandeld wordt als mijnworminfecties, heeft de verwarring weinig klinische gevolgen. Af en toe kan een ei van een nematode die niet pathogeen is voor de mens, als passant worden teruggevonden in de feces.

M. Van Esbroeck, ITG, Antwerpen

Figuur 1 Ancylostomidae



Figuur 2 Ancylostomidae



Figuur 3 Ancylostomidae



5.3 Resultaten voor staal P/11307

De 160 laboratoria leverden 172 antwoorden in. 26 laboratoria antwoordden "Afwezigheid van parasieten", 123 laboratoria antwoordden één parasiet, 10 laboratoria antwoordden 2 parasieten en één laboratorium antwoordde 3 parasieten.

De resultaten worden in onderstaande tabel weergegeven:

Tabel 5.3.1. Resultaten voor staal P/11307

Resultaat	Aantal
<i>Blastocystis hominis</i>	122
<i>Entamoeba histolytica/dispar</i>	4
<i>Entamoeba dispar</i>	3
<i>Entamoeba species</i>	2
<i>Endolimax nana</i>	2
<i>Giardia lamblia</i>	3
<i>Cyclospora cayetanensis</i>	1
<i>Isospora belli</i>	1
<i>Sarcocystis hominis</i>	1
Ancylostomatoidea	2
<i>Ancylostoma duodenale</i>	3
<i>Necator americanus</i>	1
<i>Strongyloides stercoralis</i>	1
Afwezigheid van parasieten	26
Totaal	172

Voor de beide laboratoria die Ancylostomatoidea antwoordden, het laboratorium dat *N. americanus* antwoordde en 2 van de 3 laboratoria die *A. duodenale* antwoordden, bestaat het vermoeden dat er een staalverwisseling plaatsgegrepen heeft. (cfr. hoofdstuk 5.2). Eén laboratorium antwoordde echter *A. duodenale* voor beide stalen.

Eén laboratorium vermeldde dat het antwoord *B. hominis* steeds vergezeld wordt van het volgende commentaar: "Protozoön die in principe niet pathogeen is. Te toetsen aan de klinische gegevens": in sommige gevallen kan een behandeling nuttig zijn, vooral in geval van een hoge parasitaire lading met duidelijke klinische symptomen en de afwezigheid van een mogelijk ander etiologisch agens.

De combinaties van 2 parasieten welke door de laboratoria geantwoord werden, worden in onderstaande tabel weergegeven.

Tabel 5.3.2. Combinatie van 2 parasieten geantwoord voor staal P/11307

Combinatie van parasieten	Aantal
<i>Blastocystis hominis</i> + <i>Entamoeba histolytica/dispar</i>	4
<i>Blastocystis hominis</i> + <i>Entamoeba dispar</i>	2
<i>Blastocystis hominis</i> + <i>Entamoeba species</i>	1
<i>Blastocystis hominis</i> + <i>Strongyloides stercoralis</i>	1
Ancylostomatoidea + <i>Giardia lamblia</i>	1
<i>Ancylostoma duodenale</i> + <i>Giardia lamblia</i>	1
Totaal	10

Het laboratorium dat 3 parasieten antwoordde, vermeldde *Ancylostoma duodenale* + *Giardia lamblia* + *Endolimax nana*.

De door de laboratoria geantwoorde evolutiestadia voor *Blastocystis hominis* worden in tabel 5.3.3. weergegeven. Eén laboratorium vermeldde 2 evolutiestadia.

Tabel 5.3.3. Evolutiestadia voor *Blastocystis hominis* voor staal P/11307

<i>Evolutiestadium</i>	<i>Aantal laboratoria</i>
Cyste	104
Niet gepreciseerd	6
Oöcyste	3
Trofozoïet	3
Vegetatieve vorm	3
Granulaire vorm	1
Vacuolaire vorm	1
Hematofaag vegetatieve vorm	1
Sporocyste	1
Totaal	123

Zestien laboratoria zouden dit staal in routine doorsturen naar een referentiecentrum: 2 laboratoria die onder andere “Ancylostomatoidea” antwoordden, het laboratorium dat “*N. americanus*” antwoordde, vijf laboratoria die “*B. hominis* + “een” amoëbe” antwoordden, zes laboratoria die enkel “*B. hominis*” antwoordden; het laboratorium dat “*Strongyloides stercoralis*” antwoordde (om te controleren of het effectief een *Strongyloides* betrof dan wel een artefact) en één laboratorium dat “Afwezigheid” antwoordde (gezien de klinische context).

Commentaar over *Blastocystis hominis*

Staal P 11307 bevatte een *Blastocystis*

75 % (122/160) van de deelnemers hebben deze correct geïdentificeerd.

De kennis van *Blastocystis* is nog beperkt en dit commentaar is een weergave van de huidige onzekerheden.

Inleiding:

Dit kleine protozoön, dat gedurende lange tijd als een niet-pathogene gist beschouwd werd, werd als dusdanig beschreven in de jaren 1970. De huidige nomenclatuur spreekt eerder over *Blastocystis* spp. dan over *B. hominis*; hij is anaëroob en leeft in het onderste deel van de gastro-intestinale tractus (colon en caecum) van de mens en van vele zoogdieren en vogels. Hij komt wereldwijd voor en er bestaat nog steeds controverse over zijn pathogene rol. Hij is de parasiet die het meest teruggevonden wordt in de stoelgang, zowel bij kinderen als bij volwassenen.

De wijze van overdracht is niet helemaal opgehelderd. Waar de interhumane feco-orale transmissie eerst aangetoond werd, bestaat er ook een transmissie tussen dier en mens evenals door inname van besmet water of via andere wegen die nog onbekend zijn. De prevalentie is hoger in de ontwikkelingslanden (30 à 50 %) dan in de geïndustrialiseerde landen (5 à 10 %). Hij wordt vaak aangetroffen in de stoelgang van reizigers die terugkomen van ontwikkelingslanden.

Er zijn momenteel negen verschillende subtypes beschreven bij de mens; deze genetische diversiteit is mogelijk de verklaring voor de verschillende morfologische vormen die vastgesteld worden en voor de controverse over zijn pathogeniciteit.

Subtype 3 wordt in epidemiologische studies het frequentst teruggevonden bij de mens. Sommige andere species hebben een specifieke geografische verspreiding.

Microbiologie:

Blastocystis spp. meet 5 op 40 µm. Er bestaat een belangrijke morfologische variabiliteit. Er zijn vacuolaire, cyst-achtige, amoeboïde en granulaire vormen beschreven. De eerste twee vormen worden het meest aangetroffen. Het is niet geweten of dit verschillende ontwikkelingsstadia betreft en of één van deze vormen eerder de transmissiefase betreft.

Op de uitstekende website van het CDC kan men foto's raadplegen:

http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/html/PDF_Files/Blasto_benchaid.pdf

Routinediagnose gebeurt door het microscopisch aantonen van de cyst-achtige vormen ("cyst-like stage») in verse stoelgang of door onderzoek van gekleurde uitstrijkjes (bv. trichroomkleuring).

Er worden meestal geen leukocyten aangetroffen in de stoelgang. *Blastocystis* spp. komt meestal samen met andere (al dan niet pathogene) parasieten voor.

Zowel kweek als moleculair-biologische methoden bestaan, maar deze worden geen van beide in routine gebruikt; serologie (ELISA) draagt niet bij tot de klinische diagnose.

Pathogeniciteit:

Verschillende studies bij mens en dier, met inbegrip van kweek van de parasiet, evenals zowel prospectieve als retrospectieve epidemiologische vaststellingen wijzen de ene keer meer op een pathogene rol en de andere keer meer op commensale aanwezigheid. Na instellen van een behandeling, besluiten sommigen dat er een relatie bestaat tussen deze behandeling en het verdwijnen van de symptomen en/of het micro-organisme en anderen dat deze correlatie niet bestaat.

De huidige vaststellingen lijken aan te tonen dat subtype 1 en mogelijk 3 frequenter geassocieerd zouden zijn aan klinische symptomen.

Het grote aantal asymptomatische personen met een stoelgang die positief is op *Blastocystis* spp. zou kunnen wijzen op het bestaan van dragerschap.

Klinische symptomen:

De symptomen die vermeld worden zijn een meestal waterige diarree die acuut of chronisch kan zijn, maar ook nausea, abdominale krampen, een opgeblazen gevoel, flatulentie, urticaria en vermoeidheid. De patiënten vertonen meestal geen koorts.

Er bestaat geen relatie tussen de symptomen en de hoeveelheid parasieten in de stoelgang.

Behandeling:

Asymptomatische patiënten vereisen nooit behandeling. Voor symptomatische patiënten, is het onontbeerlijk om na te kijken of er een andere pathogeen aanwezig is en om een niet-infectieuze oorzaak uit te sluiten. Indien een behandeling ingesteld wordt, wordt meestal metronidazole (750 mg/ 3 maal gedurende 5 tot 10 dagen) gebruikt. Andere medicatie zoals tinidazole, iodoquinol (niet beschikbaar in België) en cotrimoxazole wordt eveneens gebruikt. Ook sommige andere middelen hebben een *in vitro* activiteit aangetoond.

Men moet er wel rekening mee houden dat een (eventueel) antwoord op de behandeling te wijten kan zijn aan eradicatie van de *Blastocystis*, of aan de eradicatie van een andere (niet-aangetoonde) parasiet, of aan het spontaan verdwijnen van de symptomen, wat vaak vastgesteld wordt bij de minder ernstige gevallen.

Het betreft hier dus in elk geval een parasiet die opgevolgd moet worden en waarvoor nauwkeuriger gegevens noodzakelijk zijn.

Dr. Anne Dediste, Laboratoire de la Porte de Hal

Referenties

1. Garcia L. Diagnostics in Medical Parasitology 5th Ed. ASM press, 2007.
2. <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/html/Blastocystis.htm>
3. Tan KS. New insights on classification, identification, and clinical relevance of Blastocystis spp. Clin Microbiol Rev. 2008; 21(4):639.
4. Wong KH et al. Predominance of subtype 3 among Blastocystis isolates from a major hospital in Singapore. Parasitol Res. 2008;102(4):663.

VI. Sérologie

6.1. Brucella

6.1.1 Informatie betreffende de verstuurde stalen

Er was 1 gelyofiliseerd plasmamonster, IS/7727 waarop antistoffen tegen Brucella bepaald dienden te worden.

Het staal was vergezeld van volgende klinische inlichtingen:

“Koorts van onbekende oorsprong bij een landbouwer met uitgebreide veestapel.”

Het staal bevatte geen Brucella-antistoffen

De verwachte interpretatie was: “Afwezigheid van antistoffen.” (code 002)

6.1.2. De deelnemers

In het totaal stuurden 72 laboratoria hun enquêteformulier terug. Ze voerden 90 testen uit op staal IS/7727.

55 laboratoria voerden 1 test uit, 16 laboratoria voerden 2 testen uit en 1 laboratorium 3 testen.

51 testen bepaalden de totale antistoffen:

- 35 testen bepaalden de AS gericht tegen *B. abortus*
- 13 testen bepaalden de AS gericht tegen *B. melitensis*
- 3 testen bepaalden de AS gericht tegen beide

35 testen bepaalden de IgG

4 tests testen bepaalden de IgM;

Tabel 6.1.1. geeft een overzicht van de combinaties van de uitgevoerde testen.

Tabel 6.1.1. Overzicht van de combinaties van testen gebruikt voor de bepaling van anti-Brucella antistoffen.

Aantal testen	Type test	N labo's
1 test uitgevoerd	Totale antistoffen: <i>B. abortus</i>	21
	Totale antistoffen: beide	1
	IgG	31
	IgM	2
2 testen uitgevoerd	Totale antistoffen: <i>B. abortus</i> + <i>B. melitensis</i>	12
	IgG + Totale antistoffen: beide	2
	IgG + IgM	2
3 testen uitgevoerd	Totale antistoffen: 2 * <i>B. abortus</i> + 1 * <i>B. melitensis</i>	1
Totaal		72

6.1.3. Gebruikte reagentia

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

Tabel 6.1.2. Reagentia gebruikt voor de bepaling van totale anti-Brucella antistoffen

<i>Fabrikant</i>	<i>Kit</i>	<i>IS/7727</i>
Becton Dickinson	BBL Brucella abortus antigen*	2
BioSystems (verdeler Medigal)	Febrile serodiagnostic agglutination test*	7
	Rose Bengal*	4
Diamondial (verdeler Biotrading)	Stained Febrile Antigens Brucella abortus*	15
	Stained Febrile Ag Brucella melitensis†	7
Omega Diagnostics (verdeler International Medical)	Micropath Antigens abortus*	1
Plasmatec (verdeler Forlab)	Stained febrile antigens B. abortus*	2
	Stained febrile antigens B. melitensis†	2
Remel (verdeler Oxoid)	Stained Suspension Brucella abortus*	4
	Stained Suspension Brucella melitensis†	4
Serion (verdeler Labconsult)	Brucella CFT reagens‡	3
Totaal		51

* Kits die AS tegen *B. abortus* bepalen

† Kits die AS tegen *B. melitensis* bepalen

‡ Kits die AS tegen *B. abortus* en *B. melitensis* bepalen

6.1.3. Reagentia gebruikt voor de bepaling van IgG anti-Brucella antistoffen

<i>Fabrikant</i>	<i>Kit</i>	<i>IS/7727</i>
Biorad	Brucella Rose Bengal	34
Vircell (verdeler Medigal)	Brucella IgG Elisa	1
Totaal		35

Tabel 6.1.4. Reagentia gebruikt voor de bepaling van IgM anti-Brucella antistoffen

<i>Fabrikant</i>	<i>Kit</i>	<i>IS/7727</i>
Biorad	Brucella Wright	3
Vircell (verdeler Medigal)	Brucella IgM Elisa	1
Totaal		4

6.1.4. Resultaten

6.1.4.1. Technische resultaten

De resultaten voor de totale antistoffen worden in volgende tabel weergegeven.

Tabel 6.1.5. Resultaten van de testen voor de totale AS van staal IS/7727

Resultaat	N labo's
Negatief ¹	33
Borderline ²	1
Positief	1
Geen antwoord ³	1
Totaal	36

¹ Alle laboratoria die meerdere kits (*B. abortus* en *B. melitensis*) voor totale AS gebruikten, bekwamen met alle kits een negatief resultaat.

² Dit laboratorium gaf hierbij de opmerking: "Zeer kleine aggregaten die enkel onder de microscoop zichtbaar zijn"

³ Dit laboratorium gaf wel het kwantitatieve resultaat (titer 1/4 bekomen met het Brucella CFT reagens van Serion) maar niet de kwalitatieve interpretatie hiervan.

Voor de IgG bekwamen 33 laboratoria een negatief resultaat en 2 een positief.

Voor de IgM bekwamen 3 laboratoria een negatief resultaat en 1 een positief.

Opvallend is dat één laboratorium afwijkende resultaten bekwam met de 2 testen die het gebruikte: een positief resultaat voor de IgG en een borderline voor de IgM.

De overige laboratoria die een afwijkend resultaat bekwamen, gebruikten slechts 1 test.

6.1.4.2. Overzicht van de interpretaties

Alle laboratoria gaven een interpretatie. Een overzicht van deze interpretaties wordt in volgende tabel weergegeven:

Tabel 6.1.6. Interpretaties voor staal IS/7727

Interpretatie	N labo's
Afwezigheid van antistoffen (code 2)	66
Aanwezigheid van antistoffen, suggestief voor een infectie (code 1)	4
Afwezigheid van IgM antistoffen.	1
Twijfelachtig resultaat te controleren op een 2 ^e afname	1
Totaal	72

De interpretatie "Aanwezigheid van antistoffen, suggestief voor een infectie" werd gegeven door:

- het laboratorium dat een positief resultaat bekwam voor de IgG-bepaling
- het laboratorium dat een positief resultaat bekwam voor de bepaling van de totale AS tegen *B. abortus*
- het laboratorium dat een positief resultaat bekwam voor de IgG-bepaling en een borderline voor de IgM-bepaling
- het laboratorium dat de kwalitatieve beoordeling van zijn resultaat openliet

De interpretatie “Twijfelachtig resultaat te controleren op een 2^e afname” werd gegeven door het laboratorium dat een borderline resultaat bekam voor de bepaling van de totale AS tegen *B. abortus* (maar met de vermelding dat dit enkel microscopisch waargenomen werd).

De interpretatie “Afwezigheid van IgM antistoffen” werd uiteraard gegeven door een laboratorium dat enkel de IgM bepaalde. We moeten wel opmerken dat het andere laboratorium dat enkel IgM bepaalde, de interpretatie “Afwezigheid van antistoffen” antwoordde.

59 laboratoria gaven een opmerking bij het antwoord “Afwezigheid van antistoffen”. Een overzicht hiervan wordt gegeven in tabel 6.1.7.

Tabel 6.1.7. Opmerkingen gegeven bij “Afwezigheid van antistoffen” voor staal IS/7727

<i>Opmerking</i>	<i>N labo's</i>
Een bevestiging is niet nodig	32
Een bevestiging is gewenst door een nieuwe afname	13
Een bevestiging is gewenst door complementaire testen	4
Te controleren binnen 2 tot 3 weken indien de symptomen blijven voortduren	1
In functie van de context: te controleren indien de symptomen blijven voortduren	1
Bevestiging binnen 15 dagen indien acuut	1
Controle op een laattijdig staal is gewenst indien er vermoeden is van een recente infectie	1
Controlestaal na 14 dagen	1
Indien anamnese en kliniek suggestief zijn, graag 2e staal en hemoculturen	1
a) Hemoculturen b) een nieuw staal na 3 weken	1
Hemoculturen afnemen in overleg met klinisch bioloog	1
Noodzaak om te bevestigen kan niet gemaakt worden zonder kennis van het tijdsinterval tussen begin van de symptomen en afname van het staal.	1
Een negatieve titer op één enkele afname is onvoldoende. Een controle na 2 weken is noodzakelijk. Enkel de bacteriologische diagnose via kweek (op hemoculturen of afname ter hoogte van de infectieuze haard – met mogelijk genetische amplificatie) en isolatie van de <i>Brucella</i> -stam geeft zekerheid	1
Totaal	59

Een overzicht van de voorgestelde complementaire testen wordt gegeven in tabel 6.1.8.

Tabel 6.1.8. Complementaire testen voorgesteld bij “Afwezigheid van antistoffen” voor staal IS/7727

<i>Voorgestelde test</i>	<i>N labo's</i>
Hemocultuur	1
Specifieke IgM	1
ELISA IgG en IgM. Multipole hemoculturen tijdens de koortsopstoten	1
Doorstuur naar referentielaboratorium (CODA)	1
Totaal	4

Op één laboratorium na, zouden alle laboratoria alle testen die ze voor de EKE uitgevoerd hebben, ook in routine uitvoeren.

6.1.5. Commentaar op de resultaten van het onderzoek

Er werden een groot aantal methoden gebruikt in deze enquête. De aanbevolen methoden zijn agglutinaties, Rose-Bengal en ELISA. Deze methoden laten toe om de diagnose van infecties door *Brucella* sp. te stellen. Men kan met de serologische methoden geen onderscheid maken tussen *B. melitensis*, *B. abortus* en *B.suis*. De serologische methoden zijn niet geschikt voor infecties door *B. canis*.

Welke serologische test men ook gebruikt, serologische diagnose van *Brucella* is moeilijk want er bestaan kruisreacties tussen de antistoffen gericht tegen het lipopolysacharide van *Brucella* en van andere bacteriën (*Yersinia enterocolitica* O9 en *Francisella tularensis*). In regio's waar de ziekte niet meer endemisch is, zoals België, is het belangrijk om te weten of de patiënt blootgesteld werd aan risicofactoren.

In geval van twijfelachtige serologie, kan men na 2 weken een tweede staal afnemen om de diagnose te bevestigen. Een andere mogelijkheid is om het serum naar het referentiecentrum te sturen. Hier kunnen verschillende serologische testen in parallel uitgevoerd worden om de diagnose te verfijnen.

D. Fretin, CODA, Ukkel

6.2. C. pneumoniae

6.2.1. Informatie betreffende het verstuurde staal

Er werd 1 staal rondgestuurd voor het uitvoeren van de *C. pneumoniae*-serologie.

Het staal was vergezeld van volgende klinische inlichtingen:

IS/8687: Een 45-jarige man zonder onderliggende pathologie met aanhoudende hoest, algemene malaise, heesheid en koorts gedurende laatste 10 dagen.

De verwachte resultaten waren:

IS/8687: IgG: negatief
 IgM: negatief
 IgA: negatief

6.2.2. De deelnemers

93 klinische laboratoria stuurden hun enquêteformulier terug. Ze voerden 186 testen uit op staal IS/8687.

Daarnaast voerden ook twee firmalaboratoria de *Chlamydomphila pneumoniae*-serologie uit. Ze gebruikten volgende kits:

- Chlamydia pneumoniae IgG Elisa, Chlamydia pneumoniae IgM Elisa, Chlamydia pneumoniae IgA IFA, anti-Chlamydia MIF IgG, anti-Chlamydia MIF IgM en anti-Chlamydia MIF IgA (Euroimmun (verdeler Biognost)) (alle resultaten negatief)
- recomLine Chlamydia IgG, recomLine Chlamydia IgM en recomLine Chlamydia IgA (Mikrogen (verdeler Euribel)) (IgG positief, IgM en IgA negatief)

De firma Euribel heeft het staal onderzocht om de reden van de vals positiviteit te achterhalen. Hun onderzoek leverde volgende resultaten op:

Ter gelegenheid van de 1^e test, waren de IgG zwak positief, IgM en IgA waren negatief.

1. R11301/ first sample/ 13.10.2011:

- Momp (*C. pneumoniae*): 1,1 (**weak positive**) (> 1.0)

Ter gelegenheid van de 2^e test, waren de IgG negatief, juist onder de cut-off.

2. R11359/ second samples/ 16.11.2011:

- Momp (*C. pneumoniae*): 0.9 (**negative**) (> 1.0)

Gezien het resultaat van de test zich rond de cut-off van de methode bevindt, verklaart dit wellicht waarom de 1^e test een (zwak) positief resultaat opleverde.

De testen uitgevoerd op staal IS/8687 waren als volgt verdeeld: 3 bepalingen van de totale antistoffen, 95 IgG, 18 IgM en 70 IgA. Een overzicht van het aantal en type bepalingen per laboratorium wordt in tabel 6.2.1 weergegeven.

Tabel 6.2.1. Aantal deelnemers verdeeld per uitgevoerde parameters voor *C. pneumoniae* (EKE 2011/3)

<i>Aantal de tests</i>	<i>Type test</i>	<i>IS/8687</i>
1 test	totale AS	2
	IgG	13
	IgM	1
	IgA	4
2 testen	IgG + IgM	6
	IgG + IgA	50
3 testen	totale AS + IgG + IgM	1
	IgG + IgM + IgA	7
	2* IgG + IgA	7
4 testen	2* IgG + IgA + IgM	1
5 testen	2* IgG + IgA + 2* IgM	1
Totaal		93

* Testen 2 maal uitgevoerd met verschillende kits

6.2.3. Gebruikte reagentia

6.2.3.1. Voor de bepaling van de totale antistoffen

De 3 laboratoria gebruikten allen de Chlamydia complement fixation test (Serion (verdelers Labconsult)).

6.2.3.2. Voor de bepaling van de IgG

Tabel 6.2.2.: Reagentia gebruikt voor de bepaling van anti-*C. pneumoniae* IgG

<i>Fabrikant</i>	<i>Kit</i>	<i>IS/8687</i>
Anilab (verdelers BMD)	Chlamydia pneumoniae IgG EIA	1
Diasorin	Chlamydia pneumoniae IgG	5
Euroimmun (verdelers Biognost)	Chlamydia pneumoniae IgG Elisa	12
	anti-Chlamydia MIF IgG	2
Focus Diagnostics (verdelers Forlab)	Chlamydia MIF IgG	13
	Chlamydia Group Antibody Screen IFA	8
	Chlamydia pneumoniae Antibodies (IgG, IgA, IgM)	2
Medac	Chlamydia pneumoniae IgG ELISA plus	15
	Chlamydia IgG r-ELISA	9
	Chlamydia pneumoniae IgG s-ELISA	6
Novatec	Novalisa C. pneumoniae IgG	1
Savyon (verdelers Diasorin)	SeroCP IgG	6
	Seroelisa Chlamydia IgG	1
Servibio (verdelers Biognost)	Chlamydia ServiMIF IgG/ IgA	8
	Lames C. pneumoniae	1
Siemens	Novagnost Chlamydia pneumoniae IgG	4
Vircell (verdelers Labconsult)	Chlamydia pneumoniae IFA IgG	1
Totaal		95

NB De SeroCP kit kan geautomatiseerd worden op het toestel Etimax

6.2.3.3. Voor de bepaling van de IgM

Tabel 6.2.3.: Reagentia gebruikt voor de bepaling van anti-*C. pneumoniae* IgM.

<i>Fabrikant</i>	<i>Kit</i>	<i>IS/8687</i>
Anilab (verdeler BMD)	Chlamydia pneumoniae IgM EIA	1
Euroimmun (verdeler Biognost)	Chlamydia pneumoniae IgM Elisa	3
	Chlamydia pneumoniae IgM IFA	1
Focus Diagnostics (verdeler Forlab)	Chlamydia MIF IgM	4
	Chlamydia Group Antibody Screen IFA	2
	Chlamydia pneumoniae Antibodies (IgG, IgA, IgM)	1
Medac	Chlamydia IgM r-ELISA	2
Siemens	Novagnost Chlamydia pneumoniae IgM	2
Vircell (verdeler Labconsult)	Chlamydia pneumoniae IFA IgM	1
Viro-Immun (verdeler Alphadia)	Vir-ELISA anti- <i>C. trachomatis</i> IgM	1
Totaal		18

6.2.3.4. Voor de bepaling van de IgA

Tabel 6.2.4.: Reagentia gebruikt voor de bepaling van anti-*C. pneumoniae* IgA.

<i>Fabrikant</i>	<i>Kit</i>	<i>IS/8687</i>
Diasorin	Chlamydia pneumoniae IgA	4
Euroimmun (verdeler Biognost)	Chlamydia pneumoniae IgA Elisa	7
	anti-Chlamydia MIF IgA	2
Focus Diagnostics (verdeler Forlab)	Chlamydia MIF IgA	6
	Chlamydia Group Antibody Screen IFA	4
	Chlamydia pneumoniae Antibodies (IgG, IgA, IgM)	2
Medac	Chlamydia IgA r-ELISA	19
	Chlamydia pneumoniae IgA ELISA plus	2
	Chlamydia pneumoniae IgA s-ELISA	2
Novatec	Novalisa <i>C. pneumoniae</i> IgA	1
Savyon (verdeler Diasorin)	Seroelisa Chlamydia IgA	6
	SeroCP IgA	5
Servibio (verdeler Biognost)	Chlamydia ServiMIF IgG/ IgA	6
Siemens	Novagnost Chlamydia pneumoniae IgA	4
Totaal		70

NB De SeroCP kit kan geautomatiseerd worden op het toestel Etimax

6.2.4. Resultaten

Totale antistoffen

Alle resultaten waren negatief.

IgG

85 laboratoria bekwamen een negatief resultaat (alle laboratoria die 2 kits gebruikten, bekwamen een negatief resultaat met beide kits). Eén laboratorium bekwam een borderline resultaat.

IgM

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

IgA

Alle laboratoria bekwamen een negatief resultaat.

Interpretaties

Een overzicht van de interpretaties wordt weergegeven in tabel 6.2.5.

Tabel 6.2.5. Interpretaties voor staal IS/8687.

Interpretatie	Aantal laboratoria
Serologisch profiel niet suggestief voor recente/aanwezige infectie met <i>Chlamydomphila pneumoniae</i> (code 002)	76
Serologisch profiel niet suggestief voor recente/aanwezige infectie met <i>Chlamydomphila pneumoniae</i> (code 002) + De serologie zou meer geschikt zijn voor de diagnose van een acute/recente primo-infectie bij kinderen (aanmaak van IgM). De infecties bij volwassenen zouden meestal re-infecties of chronische infecties zijn waarvoor de serologie van geringer belang is (sterke prevalentie van IgG – afwezigheid van IgM)	1
Serologisch profiel niet suggestief voor recente/aanwezige <i>C. pneumoniae</i> . Aanvullend PCR te overwegen.	1
Serologie is niet geschikt voor de diagnostiek van recente/aanwezige infectie met <i>Chlamydomphila pneumoniae</i> (code 003)	11
Graag opvolgstaal aub	1
Een tweede afname is noodzakelijk in de reconvalescentiefase, minstens 3 weken na de eerste afname.	1
Een controlestaal is gewenst 2-3 weken na de 1 ^e afname	1
Geen antwoord ¹	1
Totaal	93

¹ Eén labo dat de IgG en de IgA bepaalde, liet de interpretatie open.

Opmerkingen bij codes 002 en 003

Een overzicht van de opmerkingen gegeven door 63 van de labo's die code 002 antwoordden, wordt weergegeven in tabel 6.2.6.

Tabel 6.2.6. Opmerkingen bij 002 voor staal IS/8687.

Opmerking	Aantal laboratoria
Een bevestiging is niet noodzakelijk (code 001)	37
Een bevestiging is noodzakelijk door een nieuwe afname (code 003)	20
Eventueel te controleren na 3 weken indien de symptomen persisteren	1
Controle op een nieuwe afname na 15 dagen	1
Als een ernstige klinisch vermoeden bestaat of als de serologie vroegtijdig afgenomen werd, is een controle binnen 10-14 dagen aangewezen	1
Indien geen andere oorzaak voor symptomen kan gevonden worden, kan een hertesting voor <i>C. pneumoniae</i> na 2 weken worden aangeraden.	1
Na overleg met de clinicus eventueel andere onderzoeken: RX, Mycoplasma, Q-fever, BK, Bordetella pertussis,...	1
In de gebruikte kit worden geen IgM opgespoord die een vroegere reactie kunnen vertonen dan de IgG/IgA. Dus in geval van een verdachte kliniek, is een serologische controle na 15 dagen onontbeerlijk. In serologie definieert een stijging van 4x van de IgG waarde op 2 sera een acute infectie. De serologische diagnose kan in geen enkel geval de detectie van het antigeen vervangen en is slechts een indirecte aanwijzing die vooral in het begin van de infectie kan falen.	1
Totaal	63

Een overzicht van de opmerkingen gegeven door 10 van de labo's die code 003 antwoordden, wordt weergegeven in tabel 6.2.7.

Tabel 6.2.7. Opmerkingen bij code 003 voor staal IS/8687.

Opmerking	Aantal laboratoria
Een bevestiging is niet noodzakelijk (code 001)	3
Een bevestiging is noodzakelijk door een nieuwe afname (code 003)	3
Een bevestiging is noodzakelijk via bijkomende testen (code 002) ¹	2
Bevestiging door PCR op respiratoir staal + nieuwe afname serologie binnen 2-4 weken	1
Labodiagnose <i>C. pneumoniae</i> is problematisch/klinische behandeling is symptomatisch	1
Totaal	10

¹ Slechts één van beide labo's vermeldde welke bijkomende testen, met name PCR

Diagnose van *C. pneumoniae*

10 laboratoria die de code 003 antwoordden, vermeldden welke techniek ze dan wel gebruiken om de diagnose van *C. pneumoniae* te stellen:

- PCR op keelwisser
- PCR op respiratoire stalen
- Moleculaire detectie *C. pneumoniae* in respiratoir staal
- Real time PCR op een nasopharyngeale wisser, sputum of bronchiale aspiratie
- PCR (serologie IgM te weinig gevoelig in acute fase: ofwel IgG na 3 weken ofwel PCR op respiratoir staal)
- Moleculaire technieken
- Momenteel geen, planning voor PCR
- Doorstuur voor Elisa IgA en IgG
- Bepaling van IgG LPS toevoegen aan IgA (als IgA deficiënt)
- Serologische controle na 3 à 4 weken

Relatie uitgevoerde testen – interpretatie

Tabel 6.2.8. Relatie uitgevoerde testen - interpretatie voor staal IS/8687

<i>Uitgevoerde testen</i>	<i>Interpretatie</i>	<i>N labo's</i>
Totale AS	Code 003	2
IgG	Code 002 Code 003 Opvolgstaal	9 3 1
IgM	Code 002	1
IgA	Code 002	4
IgG + IgM	Code 002 Code 003	4 2
IgG + IgA	Code 002 Code 003 2 ^e afname na 3 weken Serologisch profiel niet suggestief – aanvullend PCR Geen antwoord	45 2 1 1 1
Totale AS + IgG + IgM	Code 002 + serologie meer geschikt bij kinderen	1
IgG + IgM + IgA	Code 002 Controle na 2-3 weken	6 1
2 IgG + IgA	Code 002 Code 003	5 2
2 IgG + IgM + IgA	Code 002	1
2 IgG + 2 IgM + IgA	Code 002	1
Totaal		93

Vijf laboratoria vermeldden dat ze één van de door hen voor de EKE uitgevoerde testen niet zouden uitvoeren in routine:

- IgG Elisa (overige testen: IgG Elisa + IgA Elisa)
- IgG fluorescentie (overige testen: IgG Elisa + IgA Elisa)
- IgG fluorescentie (overige test: IgA fluorescentie)
- IgM fluorescentie (overige testen: IgG Elisa + IgA Elisa)
- IgM Elisa (overige testen: 2 x IgG Elisa + IgA Elisa)

6.2.5. Diagnose van *C. trachomatis*

Onderstaande tabel geeft weer welke technieken de laboratoria gebruiken voor de diagnose van *C. trachomatis*. 96 laboratoria hebben deze vraag beantwoord.

Tabel 6.2.9. Diagnose van *C. trachomatis*.

<i>N technieken</i>	<i>Welke technieken</i>	<i>N labo's</i>
1 techniek	Serologie	21
	Ag-detectie	4
	Moleculaire technieken	11
2 technieken	Serologie + Ag-detectie	18
	Serologie + moleculaire technieken	37
	Moleculaire technieken + kweek	1
3 technieken	Serologie + Ag-detectie + moleculaire technieken	3
	Serologie + moleculaire technieken + kweek	1
Totaal		96

Ag-detectie wordt uitgevoerd op volgend staalmateriaal:

- niet vermeld: 2 labo's
- enkel urine: 1 labo
- enkel wisser: 9 labo's
- urine + wisser: 13 labo's

Moleculaire technieken worden gebruikt voor volgend staalmateriaal:

- enkel urine: 3 labo's
- enkel wisser: 1 labo
- urine + wisser: 48 labo's
- urine + wisser + vloeibare cellen (anatomopathologische afname): 1 labo

Vijf laboratoria vermeldden dat stalen voor de moleculaire technieken doorgestuurd worden, één dat de stalen voor Ag-detectie doorgestuurd worden en één dat de stalen voor serologie doorgestuurd worden.

Twee laboratoria vermeldden dat de serologie enkel in het kader van infertiliteit uitgevoerd wordt.

Vier laboratoria vermeldden dat de Ag-detectie op urine uitgevoerd wordt bij mannen en op wissers bij vrouwen.

6.2.6. Commentaar op de enquête

C. pneumoniae: Commentaar op de enquête

Er werd 1 staal rondgestuurd met de volgende klinische informatie: «een 45-jarige man zonder onderliggende pathologie met aanhoudende hoest, algemene malaise, heesheid en koorts gedurende laatste 10 dagen».

De analytische bepalingen stelden geen noemenswaardige problemen voor dit staal dat negatief testte zowel voor IgM/IgA/IgG als totale antistoffen. De overgrote meerderheid van de deelnemers, 82% (76 van 93), hebben als interpretatie “serologisch profiel niet suggestief voor recente/aanwezige infectie met *Chlamydomphila pneumoniae*” (code 002) gekozen. Opmerkelijk is dat 59% (37 van 63) van de laboratoria die een opmerking gaven, verkiezen geen verdere bevestiging te vragen (code 001). Nochtans zou de meest sluitende evidentie van acute infectie de aanwezigheid van IgM en seroconversie van IgG zijn wat een controlestaal vereist. Voor primo-infecties met *C. pneumoniae* is het geweten dat IgM-antilichamen pas 2-3 weken en IgG-antilichamen vanaf 6-8 weken na het begin van de symptomen verschijnen; bij reïnfecties (wat in deze casus eerder waarschijnlijk is gezien de leeftijd van de patiënt), kan een IgM antwoord volledig ontbreken en kunnen IgG antistoffen verschijnen binnen 1-2 weken na het begin van de klachten. Gezien de serologische respons lang op zich laat wachten dient het gebruik daarvan voor het bepalen van het beleid van een individuele patiënt in vraag gesteld te worden wat de interpretatie “serologie is niet geschikt voor de diagnostiek van recente/aanwezige infectie met *Chlamydomphila pneumoniae*” (code 003) gekozen door 12% (11 van 93) van de deelnemers verantwoordt. Tien laboratoria die deze code 003 hebben gegeven, hebben aangegeven welke andere diagnostische benaderingen ze voorstellen: hierbij werd voornamelijk voor de moleculaire detectie van *C. pneumoniae* in respiratoire stalen gekozen. Door het gebruik van moleculaire technieken is aangetoond dat *C. pneumoniae* voor een veel kleiner percentage van acute luchtweginfecties verantwoordelijk is dan algemeen werd aangenomen op basis van serologische studies. Recente wetenschappelijke gegevens gebaseerd op gebruik van PCR tonen aan dat *C. pneumoniae* zowel bij ambulante als gehospitaliseerde patiënten en in verschillende leeftijdscategorieën bij < 1% van respiratoire infecties werd gedetecteerd. Deze gegevens staan in schril contrast met studies gebaseerd op serologische diagnostiek waarbij, afhankelijk van de gebruikte serologische methode, geografische regio en studiepopulatie, *C. pneumoniae* met 17% tot 44% van respiratoire infecties werd geassocieerd. Ter gelegenheid van deze enquête stellen we de data voor betreffende resultaten bekomen door middel van gebruik in routine van verschillende PCRs voor de detectie van *C. pneumoniae* in 4 grote Belgische ziekenhuizen over de periode van 2 jaar (2009-2010):

		AZ Sint-Jan	CHU St.Pierre	OLV Aalst	UZ Leuven	Totaal voor 4 centra
2009	<i>totaal</i>	118	620	60	1008	1806
	<i>positief</i>	0	1	1	2	4
2010	<i>totaal</i>	137	582	49	985	1753
	<i>positief</i>	0	0	0	3	3

Samengevat kon *C. pneumoniae* door middel van PCR gedetecteerd worden in 0.2% (7/3559) van alle onderzochte respiratoire stalen.

C. trachomatis: Commentaar op de enquête

Er werd een rondvraag gestuurd betreffende diagnostische technieken in gebruik voor de diagnose van infecties met *C. trachomatis*. Opvallend is dat 83% (80 van 96) van de deelnemers serologie gebruiken, al of niet in combinatie met andere technieken. Hierbij is het belangrijk om te benadrukken dat serologie geen plaats heeft in de diagnostiek van acute genitale infecties of in de screening van asymptomatische patiënten. Betreffende de diagnostiek bij de individuele patiënt, wordt de serologie voornamelijk toegepast in de diagnostiek van lymphogranuloma venereum (LGV) en bij de evaluatie van tubaire infertiliteit. Ook het nut van serologie in deze 2 toepassingen blijft controversieel. De IgG en IgA *C. trachomatis* specifieke serologische testen kunnen een vermoeden van LGV versterken maar de diagnose zelf niet bevestigen. Gezien het lage risico voor de ontwikkeling van de tubaire infertiliteit na infectie met *C. trachomatis* en de gekende beperkingen van de serologie zoals onder andere kruisreactiviteit met *Chlamydothylas* en de gebrekkige standaardisatie van assays wordt het nut van de serologie voor Chlamydia ook voor deze toepassing in vraag gesteld.

Een opvallende bevinding is dat antigendetectie wordt toegepast door 26% (25 van 96) van de deelnemers, ook hier al of niet in combinatie met andere technieken en voornamelijk samen met serologie: dit is verrassend gezien de duidelijke aanbeveling voor het gebruik van moleculaire testen op genitale, en recent ook extragenitale, stalen zowel bij man als vrouw.

Elizaveta Padalko, UZ Gent

Referenties

1. Blasi F, Tarsia P, Aliberti S. *Chlamydia pneumoniae*. Clin Microbiol Infect. 2009 Jan;15(1):29-35.
2. Brittain-Long R, Andersson LM, Olofsson S et al. Seasonal variations of 15 respiratory agents illustrated by the application of a multiplex polymerase chain reaction assay. Scand J Infect Dis. 2012; 44:9-17.
3. Kumar S and Hammerschlag MR. Acute respiratory infection due to *Chlamydia pneumoniae*: current status of diagnostic methods. Clin Infect Dis. 2007 Feb;44:568-76.
4. Land J. *Chlamydia* antibodies as markers of late complications in cost-effectiveness models at 'European Conference of National Strategies for *Chlamydia Trachomatis* and Human Papillomavirus; Jurmala, Latvia, May 25-27, 2011' ; http://www.cthpv.org/Jolande_Land.pdf
5. Geisler WM. Diagnosis and management of uncomplicated *Chlamydia trachomatis* infections in adolescents and adults: summary of evidence reviewed for the 2010 Centers for Disease Control and Prevention Sexually Transmitted Diseases Treatment Guidelines. Clin Infect Dis. 2011 Dec;53 Suppl 3:S92-8.

6.3. HIV

6.3.1. Informatie betreffende de verstuurde stalen

Er werden 2 “klaar-voor-gebruik” stalen (S/9591 en IS/10519) verstuurd voor de bepaling van HIV-antistoffen.

De verwachte resultaten waren:

Staal S/9591 was positief op HIV-antistoffen.

Staal IS/10519 was negatief op HIV-antistoffen.

6.3.2. De deelnemers

In het totaal stuurden 167 laboratoria hun antwoordformulier terug: 165 Belgische en Luxemburgse en 2 firmalaboratoria (kits: Liaison XL Murex HIV Ab/Ag (Diasorin) en recomline HIV 1 & HIV 2 IgG (Mikrogen)). Deze laatsten werden niet in de verdere verwerking opgenomen.

Onderstaande tabel geeft het aantal uitgevoerde screeningstesten per staal weer. Verschillende laboratoria gebruikten 2 verschillende screeningstesten per staal.

Vijf laboratoria gebruikten 2 maal dezelfde screeningstest voor beide stalen met eenzelfde kwalitatief resultaat: deze werden telkens als 1 bepaling beschouwd.

Een zesde laboratorium gebruikte voor staal IS/10519 2 verschillende kits; één van beide kits werd tweemaal gebruikt en gaf verschillende kwalitatieve resultaten (cfr. infra).

Tabel 6.3.1. Screeningstesten uitgevoerd voor de bepaling van HIV

<i>Staal</i>	<i>1 test</i>	<i>2 testen</i>	<i>Totaal</i>
S/9591 (N labo's)	141	24	165
IS/10519 (N labo's)	152	13	165

Er werden dus 189 screeningstesten uitgevoerd op staal S/9591 en 178 op staal IS/10519.

Daarnaast vermelden voor staal S/9591, 6 deelnemers het resultaat van de Ag p24 test die zij bekwamen met de VIDAS HIV DUO ULTRA kit (bioMérieux). Voor staal IS/10519 vermelden 5 deelnemers het resultaat van de Ag p24 test bekomen met de VIDAS HIV DUO ULTRA kit.

Op staal S/9591 bepaalden 3 laboratoria het p24 Ag met de VIDAS HIV p24 II kit (bioMérieux) en één met de Innotest HIV Antigen mAb (Innogenetics); vijf laboratoria voerden een confirmatietest uit: drie met de Inno-LIA HIV I/II score (Innogenetics) en twee met de HIV-Blot 2.2 (MP Diagnostics).

Op staal IS/10519 hebben twee laboratoria het p24 Ag bepaald met de VIDAS HIV p24 II kit (bioMérieux)

6.3.3. Gebruikte reagentia

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

Tabel 6.3.2. Reagentia gebruikt voor de screeningstesten voor de bepaling van HIV.

<i>Fabrikant</i>	<i>Reagens</i>	<i>S/9591</i>	<i>IS/10519</i>
Abbott	Architect HIV Ag/Ab Combo	46	46
	AxSYM HIV Ag/Ab Combo	20	19
	PRISM HIV 0 Plus	1	2
Alere Health bioMérieux	Determine HIV-1/2	1	-
	VIDAS HIV DUO ULTRA	20	14
	VIDAS HIV DUO QUICK	13	10
	Vironostika HIV Ab/Ag	2	2
BioRad	VIDIA HIV DUO	1	1
	Access HIV Combo op Unicel Dxl 800 ¹	9	8
	Access HIV 1/2 New op Unicel Dxl 800 ¹	4	4
	Access HIV 1/2 New op Access ¹	1	1
DiaSorin	Murex HIV Ag/Ab	1	1
Ortho Diagnostics	VITROS Immunodiagnostic Products anti HIV 1+2	12	12
Roche	Cobas HIV Combi 2 nd Generation	16	16
	HIV Combi PT	14	14
	Modular HIV Combi	8	8
	Cobas HIV Combi	1	1
Siemens	ADVIA Centaur EHIV	12	12
	ADVIA Centaur HIV Combo	4	4
	Enzygnost HIV Integral II	2	2
	Enzygnost anti-HIV 1/2 PLUS	1	1
Totaal		189	178

¹ De Access HIV 1/2 New en Access HIV Combo kits worden geproduceerd door de firma BioRad; de bepalingen met deze kits gebeuren op toestellen verdeeld door de firma Analis.

6.3.4. Resultaten

6.3.4.1. Staal S/9591

163 laboratoria bekwamen een reactief resultaat met de screeningstesten (laboratoria die 2 technieken gebruikten bekwamen een reactief resultaat met beide technieken). Eén laboratorium antwoordde “negatief” maar heeft vermoedelijk de stalen verwisseld want dit labo gaf het antwoord “positief” voor staal IS/10519. Eén laboratorium gaf geen antwoord wegens het optreden van een technisch probleem met hun kit-toestel combinatie (Access HIV Combo op Unicel Dxl 800).

Voor de kits met een voldoende aantal gebruikers hebben wij mediaan, minimum en maximum berekend, voor zover de laboratoria een kwantitatief resultaat geantwoord hebben en in dezelfde eenheden gerapporteerd hebben. Deze resultaten worden weergegeven in tabel 6.3.3. Voor ADVIA Centaur EHIV antwoordden 11 labo's de index >50.

Tabel 6.3.3. Mediaan, minimum en maximum bekomen voor anti-HIV antistoffen op staal S/9591 voor de meest gebruikte kits.

<i>Kit</i>	<i>Aantal laboratoria</i>	<i>Mediaan</i>	<i>Minimum</i>	<i>Maximum</i>	<i>Cut-off voor positiviteit</i>
Architect HIV Ag/Ab Combo (index S/CO)	44	917.04	694.70	1724.00	≥ 1.0
AxSYM HIV Ag/Ab Combo (index S/CO) ¹	15	52.40	41.49	59.96	≥ 1.0
VIDAS HIV DUO QUICK (index)	12	24.10	21.98	28.05	≥ 0.25
VIDAS HIV DUO ULTRA (index)	19	22.96	15.64	38.00	≥ 0.25
Access HIV Combo op Unicel Dxl 800 (index S/CO)	8	492.65	453.00	522.56	≥ 1.0
VITROS ECi anti HIV 1+2 (index)	12	94.35	86.80	106.00	≥ 1.0
Cobas Combi 2 nd generation (index) ²	15	237.00	175.00	314.90	≥ 1.0
Modular HIV Combi	7	241.60	196.80	380.00	≥ 1.0
HIV Combi PT	14	334.00	281.50	420.00	≥ 1.0

¹ Tevens antwoordden 5 laboratoria volgende waarden: 785 911.1 1026 1151.1 1312.

² Tevens antwoordde 1 laboratorium een index van 0.19.

Vijf laboratoria die het resultaat van de Ag p24 test voor de VIDAS HIV DUO ULTRA kit antwoordden, gaven het antwoord “ND” “Not Determined” weer; twee laboratoria antwoordden “negatief”. We herhalen hier dat de term “ND” niet betekent dat het Ag p24 negatief is maar dat deze kit het antigeen niet kan bepalen en dat een andere kit gebruikt moet worden voor deze bepaling.

De 3 resultaten van de VIDAS HIV p24 II waren allen negatief; 2 laboratoria vermeldden de waarde < 3 pg/mL en één laboratorium de waarde <10.9 pg/mL. Het resultaat van de Innotest HIV Antigen mAb was eveneens negatief.

De resultaten van de Inno-LIA HIV I/II score en de HIV-Blot 2.2 waren allen positief.

158 laboratoria zouden het staal in routine doorsturen naar een referentielaboratorium. Zeven zouden dit niet doen; hierbij uiteraard het laboratorium dat een “negatief” resultaat bekwam. Van de andere 6 laboratoria, zijn er vier die zelf een confirmatietest uitvoeren.

We stelden ter gelegenheid van deze enquête voor de eerste maal de vraag of de laboratoria de voor de EKE uitgevoerde testen ook in routine uitvoeren. Het vermoeden bestaat dat een aantal laboratoria meerdere testen uitvoeren op negatieve stalen om op deze wijze een negatieve externe controle te kunnen uitvoeren (wat uiteraard als logisch beschouwd kan worden en geen enkel probleem vormt; het is echter wel interessant om de handelwijzen van de labo's in routine te kennen).

Voor staal S/9591 antwoordden 2 laboratoria dat één van de beide door hen uitgevoerde screeningstesten niet in routine uitgevoerd wordt. Eén laboratorium antwoordde zowel voor de screeningstest als voor de confirmatiestest dat deze niet in routine uitgevoerd zou worden.

6.3.4.2. Staal IS/10519

Een overzicht van de resultaten wordt weergegeven in tabel 6.3.4.

Tabel 6.3.4. Resultaten bekomen voor anti-HIV antistoffen op staal IS/10591.

Resultaat	N labo's
Negatief	158
Reaktief f ¹	4
Borderline	1
Negatief / reaktief ²	1
Negatief / reaktief -borderline ²	1
Totaal	165

¹ Hierbij bevindt zich het laboratorium dat de stalen verwisselde.

² Eén laboratorium bekwam een negatief en reaktief resultaat met de twee gebruikte kits. Een tweede laboratorium bekwam een negatief resultaat voor de 1^e kit en gebruikte de 2^e kit 2 maal uit met een reaktief en een borderline resultaat tot gevolg. De overige 11 labo's die 2 kits gebruikten bekwamen met beide een negatief resultaat.

De vals positieve en borderline resultaten werden met verschillende kits bekomen.

Een kwantitatieve beoordeling van deze resultaten werd niet uitgevoerd, gezien het beperkte belang hiervan bij een negatief staal.

Alle resultaten van de Ag p24 testen waren negatief.

Zes laboratoria zouden het staal in routine doorsturen: de vijf laboratoria die een reaktief of borderline resultaat bekwamen (met de enige kit die ze gebruikten) en één laboratorium dat een negatief resultaat bekwam; dit laatste is één van de labo's die het positieve staal S/9591 niet zou doorsturen zodat het mogelijk een omwisseling bij het aankruisen van deze test betreft. 159 zouden dit staal niet doorsturen; hierbij de beide labo's die verschillende resultaten bekwamen met de verschillende uitgevoerde testen.

Elf laboratoria zouden één of meer testen niet in routine uitvoeren:

- 6 labo's: één van beide uitgevoerde screeningstesten (hierbij het labo dat voor de niet in routine uitgevoerde test een reaktief en borderline resultaat bekwam)
- 1 laboratorium: de Ag-test
- 4 laboratoria: géén enkele van de door hun uitgevoerde testen (mogelijk hebben deze labo's de vraag verkeerd geïnterpreteerd)

6.3.5. Commentaar

Algemeen, blijkt de praktijk voor de hiv opsporingstesten correct in ons land. We merken weliswaar enkele discordanties: één staalverwisseling en enkele limietwaarden en positieve resultaten op het negatieve staal. Deze resultaten werden met verschillende kits bekomen, wat duidt op een laboratoriumvergissing eerder dan op een fout die men aan de kit zou kunnen toeschrijven. Dit toont eens te meer dat elk reactief of twijfelachtig resultaat moet bevestigd worden. In ons land is de positief voorspellende waarde van een hiv opsporingstest slechts ongeveer 50%. Dit is te wijten aan een eerder lage pretest probabiliteit van de gescreende patiënten voor hiv positiviteit. Men zal eerst het oorspronkelijke staal naar een aids referentielaboratorium opsturen ter bevestiging, en indien positief, een tweede onafhankelijke staal van dezelfde patiënt sturen.

(<https://www.wiv-isp.be/epidemiologie/EPIEN/AIDSEN/ARLEN/nSERO.html>)

Merk op dat de hiv DUO Ultra test van bioMerieux geen eigenlijke antigeendetectietest is. Wanneer het resultaat positief is voor antistoffen wordt voor de antigeencomponente ND (not detected) geantwoord, wat niet “negatief” betekent. Wanneer antistoffen aanwezig zijn wordt inderdaad geen antigeen gedetecteerd door deze test.