

Innovaties verruimen diagnostische mogelijkheden binnen de **microbiologie**



dr. Karel Maelegheer (arts-assistent in opleiding),
dr. Eric Nulens, dr. Marijke Reynders & dr. Ignace
Surmont

dienst Laboratoriumgeneeskunde
campus Sint-Jan

Dankzij de introductie van nieuwe moleculaire amplificatietechnieken en de MALDI-TOF massaspectrometer heeft de medische microbiologie de laatste jaren een enorme vooruitgang geboekt op het vlak van de automatisatie van onderzoeken, opsporing, identificatie en gevoeligheidsbepalingen van micro-organismen. Daarnaast is actief overleg tussen de microbiologen, infectiologen en de andere artsen van het ziekenhuis een essentieel onderdeel van de diagnose en behandeling van patiënten. Dit laat zich het best illustreren aan de hand van een aantal voorbeelden.

Bacteriologie

Snellere gevoeligheidsbepaling bij positieve hemoculturen

Bacteriële sepsis en septische shock zijn ernstige complicaties, waarbij een vroegtijdige antibioticabehandeling een belangrijke rol speelt in de therapie. Het laboratorium microbiologie van campus Sint-Jan probeert om zo snel mogelijk accurate informatie aan de behandelende arts te bezorgen met betrekking tot de verwekker. Dit verloopt meestal in drie fases: gramkleuring, identificatie en gevoeligheidsbepaling. Momenteel loopt een experiment om zowel voor gramnegatieve als grampositieve bacteriën tot een sneller resultaat te proberen komen. Het uiteindelijke doel is binnen de 24 uur na ontvangst van de bloedkweek een gevoeligheidsbepaling te kunnen rapporteren. De resultaten zijn tot nu toe veelbelovend, maar er is nog een lange weg te gaan vooraleer deze methode bruikbaar is in een routinelaboratorium.

Toepassing van bèta-lactam-antibioticamonitoring

De laatste jaren verscheen er veel literatuur rond de "patient-based therapeutic drug monitoring" van bèta-lactam en andere antibiotica. Het laboratorium toxicologie van campus Sint-Jan heeft – dankzij de inspanningen van dr. apr. Daniëlle Borrey – ook een methode ter beschikking om de concentraties te bepalen van meropenem, ceftazidim, ceftriaxone, piperacilline en flucloxacilline. De bedoeling is om tot een optimale antibiotische behandeling te komen die is afgestemd op de individuele patiënt en rekening houdt met de patiëntgebonden parameters en de farmacokinetische en farmacodynamische eigenschappen van het antibioticum. Nationale en internationale richtlijnen blijven voorlopig echter uit, waardoor de bepaling nu vaak niet zinvol is. Voor de meeste producten zijn er ook nog geen referentiewaarden beschikbaar. De stabiliteit van deze antibiotica is zeer beperkt in serum, en een correcte afname op ijs en snelle verwerking van het staal zijn essentieel voor een correct resultaat. Daarom is de

aanvraag van deze testen enkel mogelijk in overleg met de infectiologen en/of de microbiologen.

Moleculaire microbiologie

Update van respiratoire multiplex- en SOA-PCR-test

In de eerstelijnsdiagnostiek is er een gebruikstoename van de multiplex-PCR-test (Polymerase Chain Reaction) voor screening op respiratoire infecties en SOA. Een update van deze test zorgt voor enkele wijzigingen in de panels:

Respiratoir panel

De volgende versie van de microarray-kaart zal, naast de acht atypische bacteriën, twee fungi en negentien virussen, in het respiratoir panel ook *Streptococcus pneumoniae* en *Haemophilus influenzae* opnemen als eerste typische bacteriële oorzaken van respiratoire infecties. Zo kan zelfs na de opstart van antibiotica nog steeds het causale agens aangetoond worden in geval van pneumonie ten gevolge van een pneumokok of een *H. influenzae*. In functie van de epidemiologie is de toevoeging van extra pathogenen in de toekomst mogelijk.

SOA-panel

In het SOA-panel worden sinds enige tijd specifieke mutaties opgespoord die gelinkt zijn aan de *in vivo* macrolideresistentie bij een *Mycoplasma genitalium* infectie. Binnenkort komen er een aantal parameters bij die uitermate belangrijk zijn bij de objectieve evaluatie van bacteriële vaginose (o.a. de DNA-detectie van *Gardnerella vaginalis* en *Atopobium vaginae*).

Carbapenemase-Producterende Enterobacteriën

Carbapenemase-Producterende Enterobacteriën (CPE) zoals *E. coli*, *Klebsiella* of *Enterobacter* zijn resistent tegen de carbapenem bèta-lactam-antibiotica, waaronder meropenem. Infecties door deze multiresistente bacteriën kunnen een ernstig verloop hebben omdat deze enkel nog met een combinatie van verschillende antibiotica behandeld kunnen worden. Deze bacteriën hebben zich momenteel al



Meer info beschikbaar in de azlink-app



wereldwijd verspreid. Tot op heden is de verspreiding in het AZ Sint-Jan Brugge-Oostende AV beperkt gebleven, dankzij snelle interventies van het team Ziekenhuisinfectiebeheersing, maar ook door de bevestiging van de resistentie bij de bacterie d.m.v. een moleculaire test. Vanuit het streven om de verspreiding in het ziekenhuis tegen te gaan, heeft het laboratorium moleculaire microbiologie van campus Sint-Jan een PCR-test ter beschikking die de genen kan opsporen die coderen voor de verschillende types van CPE: OXA-48, NDM, VIM, IMP en KPC.

Mycologie

MALDI-TOF massaspectrometer voor identificatie van filamenteuze fungi (in samenwerking met het WIV)

Microscopie vormt de hoeksteen voor de identificatie van schimmels. Zowel commercieel als vanuit het Wetenschappelijk Instituut voor Volksgezondheid (WIV) zijn er initiatieven om deze identificatie ook met de MALDI-TOF massaspectrometer te kunnen uitvoeren. Deze geautomatiseerde massaspectrometer laat een snelle microbiële identificatie toe. Het staal wordt op een draagglasje in een hoogvacuümomgeving gebracht en geïoniseerd met een precieze laserstoot. Een elektrische lading versnelt vervolgens de proteïnewolk die vrijkomt en de vliegsnelheid wordt geregistreerd: lichtere proteïnes vliegen sneller, zwaardere trager. Een sensor detecteert de proteïnes aan het einde van de vlucht. Dit resulteert in een spectrum dat de proteïnesamenstelling van het staal weergeeft. Vergelijking met een database van spectra die de precieze kenmerken van bacteriën en schimmels identificeren, leidt vervolgens tot bepalingen van de soort, het geslacht en de familie.

Het laboratorium microbiologie werkt nauw samen met het WIV om een databank van spectra aan te leggen teneinde deze techniek betrouwbaar te kunnen gebruiken. Op campus Sint-Jan voert het labo, in het kader van een validatie, een extractieprocedure uit op de schimmelkweek om die daarna op de MALDI-TOF te analyseren. Het stuurt deze data vervolgens door naar het WIV. Dit kan de bekomen spectra dan



De FilmArray-techniek kan aan de hand van een beperkt volume (200 µL) lumbaal vocht binnen het uur de veertien meest voorkomende pathogenen bij meningitis en encefalitis opsporen.

toevoegen aan zijn databank. Na een succesvolle validatie zou deze methode zich lenen tot toepassing in de dagelijkse routine van het laboratorium microbiologie. Dit zou vooral een significante tijdwinst kunnen opleveren voor de identificatie van moeilijk groeiende en weinig sporulerende schimmels.

De (nabije) toekomst

Gastro-intestinale microarray-kaart op faeces

Na een lange periode van intensieve analytische validatie start weldra de klinische validatie van een nieuwe multiplexkaart, ontwikkeld door moleculair bioloog Patrick Descheemaeker en het team van moleculaire microbiologie. Daarmee kunnen zowel bacteriële, virale als parasitaire oorzakelijke kiemen van gastro-intestinale klachten opgespoord worden (zie tabel 1). Na een succesvolle technische en klinische validatie zal het mogelijk zijn om deze test ook routinematig aan te vragen, vermoedelijk tegen juli 2016.

BioFire FilmArray® Meningitis/Encephalitis Panel

Enkele maanden geleden werd een BioFire analyzer in gebruik genomen, die op basis van een FilmArray-techniek zeer snel en eenvoudig moleculaire testen kan uitvoeren. Deze techniek kan aan de hand van een beperkt volume (200 µL) lumbaal vocht binnen het uur de veertien meest voorkomende pathogenen

bij meningitis en encefalitis opsporen (zie tabel 2). Snelheid, sensitiviteit en specificiteit met een beperkte arbeidsintensiteit zijn de grote voordelen van deze test. Een ander sterk pluspunt is het vermogen om bacteriële causale agentia te objectiveren ondanks het feit dat een antimicrobiële therapie in urgentiesetting reeds opgestart is. Nu worden de meeste pathogenen afzonderlijk getest waardoor er veel tijd verloren gaat en er vaak onvoldoende staalvolume is. De kostprijs van deze test bedraagt ca. 150 €, grotendeels terugbetaald door de mutualiteit. Deze test aanvragen is dus enkel mogelijk bij correcte klinische indicaties en zou vierentwintig uur per dag beschikbaar zijn.

Besluit

In een ziekenhuis geven snelle, accurate specificaties op microbiologisch niveau niet zelden de doorslag in de bepaling van een correcte behandeling en ze maken meer dan eens het verschil uit tussen leven en dood. Technologische innovaties en aangepaste protocollen verruimen de mogelijkheden zienderogen, maar net zo belangrijk is dat de behandelende artsen van deze mogelijkheden op de hoogte zijn. Bijgevolg gaat bijzondere aandacht uit naar de proactieve en constructieve samenwerking tussen de behandelende specialisten en de stafleden van de dienst Laboratoriumgeneeskunde.



Viraal	Bacterieel	Parasitair
Noro	<i>Clostridium difficile</i> +toxines	<i>Giardia lamblia</i>
Adeno	<i>Campylobacter jejuni</i>	<i>Cryptosporidium</i> spp.
Astro	<i>Campylobacter coli</i>	<i>Entamoeba histolytica</i> & <i>dispar</i>
Sapo	<i>Yersinia enterocolitica</i>	<i>Strongyloides stercoralis</i>
Rota	<i>Salmonella</i> spp.	<i>Dientamoeba fragilis</i>
HEV	<i>Shigella</i> spp.	<i>Blastocystis</i> spp.
Entero	Pathogene <i>E. coli</i> (ETEC, EPEC, STEC, EIEC, EAEC)	<i>Schistosoma mansoni/mekongi</i>

Tabel 1: Pathogenen in het gastro-intestinaal panel

Bacterieel	Viraal	Parasitair
<i>Escherichia coli</i> K1	Enterovirus	<i>Cryptococcus neoformans/gattii</i>
<i>Haemophilus influenzae</i>	Human parechovirus	
<i>Listeria monocytogenes</i>	Herpes simplex virus 1 (HSV-1)	
<i>Neisseria meningitidis</i>	Herpes simplex virus 2 (HSV-2)	
<i>Streptococcus agalactiae</i>	Varicella zoster virus (VZV)	
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Cytomegalovirus (CMV)	
	Human herpesvirus 6 (HHV-6)	

Tabel 2: Pathogenen in het meningitis/encefalitis panel

Bijkomende klinische en analytische informatie, o.a. de medische indicaties van alle laboratoriumtesten, is terug te vinden op www.azsintjan.be/labo/labogids