

## Rapportering voor het jaar 2011

### Nationaal Referentiecentrum Mycosis UZ Leuven - CHU Luik

#### Coördinator referentiecentrum Mycosis (focus op invasieve mycosen)

<b>Prof. Katrien Lagrou</b>	UZ Leuven Laboratoriumgeneeskunde	Herestraat 49	3000 Leuven
tel. secr. 016/347948 tel direct 016/347098	fax 016/347931	<a href="mailto:katrien.lagrou@uzleuven.be">katrien.lagrou@uzleuven.be</a>	

#### Coördinator referentiecentrum Mycosis (focus op cutane mycosen)

<b>Prof. Marie-Pierre Hayette</b>	CHU Liège - Service de Microbiologie médicale	Tour de pathologie, B35	4000 Liège
tel. secr. 04/3662439 tel. direct 04/3662454	fax 04/3662440	<a href="mailto:mphayette@chu.ulg.ac.be">mphayette@chu.ulg.ac.be</a>	

## 1. Korte samenvatting van de voornaamste bevindingen 2011

### Invasieve mycosen

Er werd een nationale *Aspergillus* surveillance opgestart met als voornaamste doelstellingen om de speciesdistributie en het percentage resistentie tegen de eerstelijns therapie (voriconazole) te bepalen.

Er werden 131 isolaten afkomstig van 117 patiënten uit 18 verschillende centra onderzocht. Al deze isolaten werden als klinisch significant beoordeeld. Het voornaamste species was *Aspergillus fumigatus* (108/131) gevolgd door *Aspergillus flavus* (10/131). 1.9% van de patiënten (2/103) waren geïnfecteerd met *A. fumigatus* resistent aan triazole antifungale geneesmiddelen. Dit resultaat is vergelijkbaar met het percentage azolenresistentie (1,2%) dat werd bepaald in een monocentrische studie (UZ Leuven) tijdens de periode 2006-2007<sup>1</sup>. Het percentage azolenresistentie bij *A. fumigatus* in België blijft dus laag en stabiel, dit in tegenstelling tot de rapporten uit Nederland<sup>2</sup> en het Verenigd Koninkrijk<sup>3</sup>.

### Referenties

<sup>1</sup>Lagrou K, De Vleeschouwer J, Meersseman W, Dupont L, Verleden G, Melchers WJG, Verweij PE, Maertens J. Triazole resistance among clinical *Aspergillus fumigatus* isolates. 3rd Advances Against Aspergillosis, Florida, 2008

<sup>2</sup>Snelders E, van der Lee HA, Kuijpers J, Rijs AJ, Varga J, Samson RA, Mellado E, Donders AR, Melchers WJ, Verweij PE. Emergence of azole resistance in *Aspergillus fumigatus* and spread of a single resistance mechanism. PLoS Med (2008); 5(11): e219: 1629-1637

<sup>3</sup>Howard SJ, Cerar D, Anderson MJ, Albarrag A, Fisher MC, Pasqualotto AC, Laverdiere M, Arendrup MC, Perlin DS, Denning DW. Frequency and evolution of Azole resistance in *Aspergillus fumigatus* associated with treatment failure. Emerg Infect Dis (2009); 15(7): 1068-107.

### Dermatofytosen

In totaal werden 395 fungale isolaten geïdentificeerd afkomstig uit huid (n=126), haar (n=14) en nagels (n=252). De isolaten werden geïdentificeerd aan de hand van microscopie en ITS sequencing voor confirmatie van specifieke en relevante species waar nodig.

*Microsporium audouinii* was de belangrijkste fungale pathogeen gekweekt uit haar en was aanwezig in 35% van alle stalen.

De isolaten gekweekt uit huidschilfers kunnen verdeeld worden in dermatofyten (64% van alle isolaten), gisten (8%, 10 *Candida albicans* en 2 non-albicans *Candida*) en andere non-dermatofyten (28%). Onder de dermatofyten waren *Trichophyton mentagrophytes* complex en *Trichophyton rubrum* de belangrijkste species met 37 (45%) en 39 (48%) van de isolaten respectievelijk.

*T. rubrum* (73/252) was de belangrijkste verwekker van onychomycosis.

## 2. Overzicht van de activiteiten

### Speciesidentificatie aan de hand van Maldi-TOF massaspectrometrie

#### Identificatie van gisten

Een kritische evaluatie van de identificatie van gisten aan de hand van matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight massaspectrometrie (MALDI-TOF MS) werd uitgevoerd (zie bijlage).

De identificatie van gisten via MALDI-TOF MS is voornamelijk afhankelijk van de gebruikte extractieprocedure en de aanwezigheid van voldoende referentiespectra in de databank. De invloed van andere factoren zoals voedingsbodem, incubatieduur en -temperatuur, matrix en apparatuur is zeer beperkt.

De klassieke extractie met ethanol en mierenzuur levert de beste resultaten, maar is arbeidsintensief en tijdrovend. Een verkorte procedure met directe applicatie van mierenzuur 70% levert eveneens goede resultaten. De cutoff voor identificatie met de Biotyper<sup>®</sup> software van Bruker (Bruker Daltonics, Germany) werd in verschillende studies verlaagd tot logscore  $\geq 1.7$ , met eveneens goede resultaten.

Persoonlijke ervaring leert dat de manuele „beschieting“ van het target en opname van massaspectra die niet aan de strikte criteria van de automatische meting beantwoorden, toch in veel gevallen leidt tot goede identificaties.

Een beperkte uitbreiding van de Biotyper databank met 26 goed getypeerde gisten verhoogde de acceptatiegraad van 72% tot 88%. Bij inclusie van dublobepalingen steeg de acceptatiegraad van 82% tot 92%. Opvallend is dat in 84% tot 90% van de identificaties, een zelf gegenereerd referentiespectrum als beste match werd gevonden.

De analyse van cryptokokken via MALDI-TOF MS wordt gehinderd door het beperkt aantal referentiespectra in de Biotyper databank. Door uitbreiding van deze databank met 20 extra MSP's (Main Spectra) kunnen de species *C. neoformans* en *C. gattii* betrouwbaar van elkaar te onderscheiden worden. Differentiatie tussen *C. neoformans* var. *grubii* en var. *neoformans* is in theorie mogelijk, maar dient nog verder te worden geëvalueerd met klinische stammen.

#### Identificatie van dermatofyten

De identificatie van dermatofyten wordt voor het ogenblik uitgevoerd aan de hand van macroscopisch en microscopisch onderzoek. De meeste stammen kunnen vlot geïdentificeerd worden door klinisch biologen en laboratoriumtechnologen met expertise binnen het domein van de mycologie. Toch vereist de identificatie van dermatofyten op species niveau soms andere technieken omwille van atypische morfologie van sommige klinische isolaten. Subcultuur op specifieke media en biochemische testen zijn tijdsrovend. Moleculaire biologische testen zijn accurater. Sequentie-analyse is voor het ogenblik de referentiemethode voor een correcte species identificatie. Deze techniek is echter beperkt tot gespecialiseerde laboratoria waardoor er een noodzaak is aan de ontwikkeling van eenvoudig uit te voeren methoden. Massaspectrometrie wordt actueel meer en meer gebruikt door klinische laboratoria voor de identificatie van bacteriën en gisten. Deze methode is eenvoudig uit te voeren direct op verse kolonies gegroeid op vaste media of in vloeibaar medium. De bedoeling van onze studie was om de performantie te evalueren van de Bruker Maldi-TOF MS voor de identificatie van filamenteuze fungi en vooral van dermatofyten op species niveau.

De studie werd uitgevoerd in drie stappen. In een eerste fase werd sequentie-analyse uitgevoerd op dermatofyten die goed gekarakteriseerd werden aan de hand van microscopie. In een tweede fase werd de Maldi Biotyper database aangevuld met referentiestammen en stammen waarop sequentie-analyse werd uitgevoerd. Tenslotte werden 70 fungale isolaten die gekweekt werden uit nagels, haar en huid geanalyseerd aan de hand van massaspectrometrie en werden de resultaten vergeleken met de identificatie bekomen aan de hand van sequentie-analyse.

De Maldi Biotyper database werd aangerijkt met spectra van dermatofyten zodat de meeste species die in de klinische praktijk worden waargenomen opgenomen zijn. De analyse met massaspectrometrie werd rechtstreeks uitgevoerd op fungale isolaten na 2 tot 3 dagen cultuur op Sabouraud agar of Malt agar media.

Op dit ogenblik is de concordantie tussen de conventionele identificatie en massaspectrometrie 71% op species niveau en 80% op genus niveau. De resultaten moeten nog aangevuld worden met de finale identificatie van de isolaten op basis van sequentie-analyse en ook door inclusie van andere isolaten. Deze voorlopige resultaten zijn dus beloftevol wat betreft het gebruik van massaspectrometrie als complementaire methode voor de conventionele identificatietechnieken voor filamenteuze fungi geïsoleerd uit haar, huid en nagels. De analyse van een groter aantal isolaten is noodzakelijk om de reële performantiekarakteristieken van deze techniek te evalueren.

#### Andere activiteiten

- Speciesidentificatie isolaten via microscopie, macroscopie, ITS-sequencing of beta-tubulin sequencing
- PCR (+ sequencing) voor detectie en identificatie van fungi in biopten
- Gevoeligheidsbepaling van filamenteuze fungi en gisten van invasieve mycosen
- *Aspergillus* surveillance
- Surveillance dermatofytosen
- Adviesfunctie naar behandeling/diagnose/doorverwijzing patiënten met invasieve mycose

### 3. Epidemiologische karakteristieken

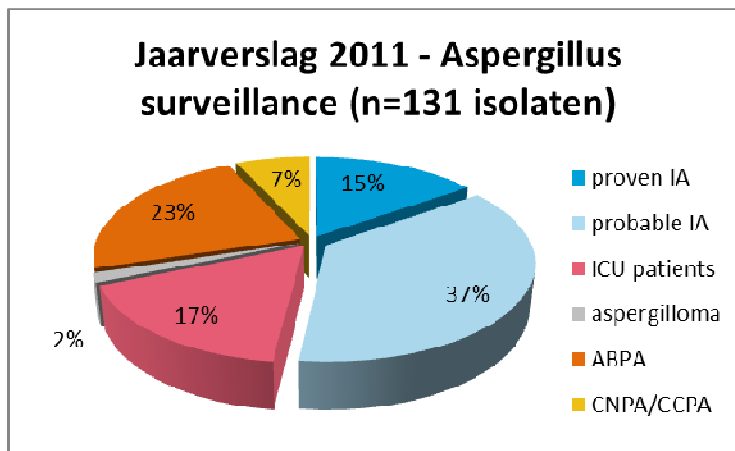
#### Aspergillus surveillance

De meeste opgestuurde *Aspergillus* stammen waren afkomstig van patiënten met een waarschijnlijke invasieve aspergillose (probable IA) volgens de EORTC criteria (figuur 1) <sup>4</sup>. Een belangrijke deel (17%) van de stammen was afkomstig van patiënten met klinische significante, acute invasieve aspergillose die niet strikt classificeerbaar zijn volgens de EORTC criteria. Dit zijn voornamelijk intensieve zorgen patiënten die geen gastheercriterium of klinische criterium (voornamelijk wanneer enkel RX thorax werd uitgevoerd en geen CT scanning) hebben volgens de EORTC definities. De man-vrouw verhouding van de patiënten waarbij de *Aspergillus* stammen werden gekweekt is weergegeven in figuur 2. *A. fumigatus* was de belangrijkste pathogeen (82%) (figuur 3).

De gevoeligheid van alle isolaten aan itraconazole, voriconazole en posaconazole werd getest volgens de CLSI methodologie. Drie van de 108 *A. fumigatus* isolaten (2,8%) waren resistent aan azolen waarbij 2 isolaten afkomstig waren van dezelfde patiënt

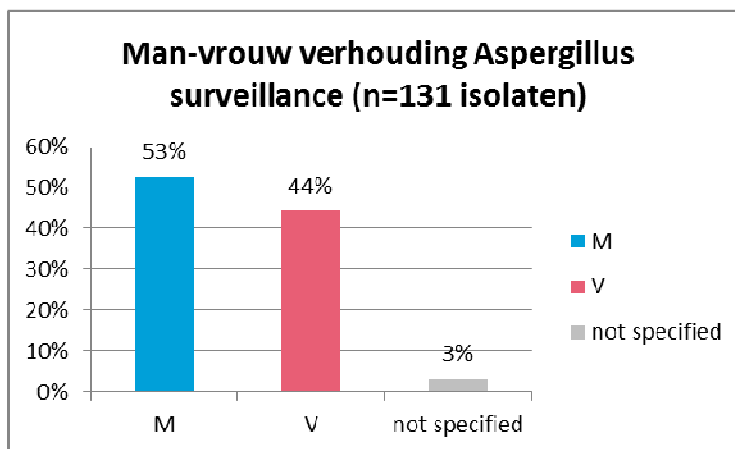
Een gedetailleerde analyse van de surveillance resultaten (inclusief bepaling van het resistentiemechanisme van de azole resistente stammen) zal nog worden uitgevoerd.

**Figuur 1** : Klinische significantie van opgestuurde *Aspergillus* stammen.

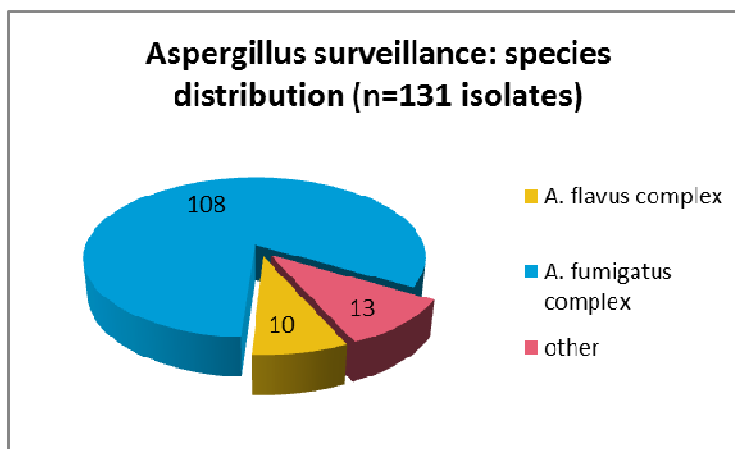


IA:invasieve aspergillose, ICU = invasieve aspergillose bij intensieve zorgen patiënt, APBA: allergische bronchopulmonale aspergillosis, CNPA/CCPA: chronische necrotiserende of chronische cavitaire pulmonaire aspergillosis

**Figuur 2** : Man-vrouw verhouding van patiënten waarbij *Aspergillus* stam werden gekweekt



Figuur 3 : Species distributie van de opgestuurde Aspergillus stammen



### Referentie

<sup>4</sup>De Pauw B et al. Revised definitions of invasive fungal disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group. Clin Infect Dis (2008);46(12):1813-21.

## Dermatofytosen

### 1. Haar

In totaal waren 64% van de stalen positief voor dermatofyten. *M. audouinii* was de belangrijkste fungale pathogeen en was aanwezig in 35% van alle stalen. De vier andere dermatofyten die werden gedetecteerd zijn *Microsporum canis* (n=2), *Trichophyton violaceum* (n=1) en *T. mentagrophytes complex* (n=1). De mediane leeftijd van de patiënten was 6 jaar. De andere species die werden gekweekt waren non-dermatofyt filamenteuze fungi aanwezig in de stalen als contaminanten. Onze resultaten benadrukken het belang van *M. audouinii* als verwekker van tinea capitis bij schoolgaande kinderen.

### 2. Huid

In totaal werden 126 isolaten gekweekt uit huidschilfers geïdentificeerd. De isolaten kunnen verdeeld worden in dermatofyten (64% van alle isolaten), gisten (8%, 10 *Candida albicans* en 2 non-albicans *Candida*) en andere non-dermatofyten (28%).

Onder de dermatofyten waren *T. mentagrophytes complex* en *T. rubrum* de belangrijkste species met 37 (45%) en 39 (48%) van de isolaten respectievelijk. De andere dermatofyten waren als volgt: 1 *Microsporum canis*, 1 *Microsporum persicolor*, 1 *Trichophyton schoenleinii*, 1 *Trichophyton soudanense* en 1 *Trichophyton tonsurans*.

De non-dermatofyten groep omvatte verschillende genera zoals *Acremonium*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Scopulariopsis* en steriel mycelium fungi die niet verder werden onderzocht omwille van het gebrek aan klinische relevantie. De aanwezigheid van omgevingscontaminanten op het ogenblik van staalname leidt tot de kweek van niet relevante fungi welke de groei van echte pathogenen kan verhinderen. Het is belangrijk te benadrukken dat afname van huidschilfers moet voorafgegaan worden door de desinfectie van de huid met 70% alcohol om het risico op contaminatie te reduceren. Bovendien willen we het belang van het resultaat van het rechtstreeks onderzoek benadrukken bij de interpretatie van cultuurresultaten.

### 3. Nagels

De meeste positieve culturen waren afkomstig van nagels. Dit leidde tot de identificatie van 122 dermatofyten (48%), 12 (5%) *Scopulariopsis brevicaulis*, 1 *Neoscytalidium dimitiadum*, 15 (6%) gisten (verdeeld in 12 *Candida spp* en 3 *Trichosporum spp*) en 108 non-dermatofyt fungi, meestal beschouwd als contaminaten. De dermatofyten omvatten 73 *T. rubrum*, 44 *T. mentagrophytes complex* (59% en 35% respectievelijk). Drie andere dermatofyten species waren 2 *T. soudanense*, 1 *T. violaceum*, 1 *T. erincae*. De groep van de contaminanten omvatte 23 *Aspergillus spp*, 1 *Beauveria sp*, 2 *Chrysosporium spp*, 9 *Cladosporium spp*, 1 *Curvularia sp*, 4 *Fusarium spp*, 5 *Paecilomyces spp*, 11 *Penicillium spp* en andere niet relevante fungi. Deze groep van non-dermatofyten was goed vertegenwoordigd en is waarschijnlijk gerelateerd aan het gebrek aan vertrouwen van laboratoria met het identificeren met meer zeldzame species. Het is belangrijk te benadrukken dat de aanwezigheid van non-dermatofyt fungi die potentieel pathogeen zijn, zoals *Fusarium spp* of *Scopulariopsis spp* moeten bevestigd worden aan de hand van een tweede staal vooraleer verantwoordelijk te achten voor de symptomatologie zeker omdat door de groei van deze fungi de gelijktijdige aanwezigheid van een dermatofyt kan gemist worden. *T. rubrum* is dus de belangrijkste verwekker van onychomycosis. Verdere moleculaire studies zullen aantonen of al deze stammen identiek zijn of als er bepaalde genotypische verschillen zijn.