



MALDI-TOF identificatie van viridans streptokokken

Author: Leonie Smets

Supervisors: Melissa Depypere, Stefanie Desmet

Date: 8-5-2018

CLINICAL BOTTOM LINE

De viridans streptokokken worden momenteel ingedeeld in 5 grote groepen: de *Streptococcus anginosus* groep, de *Streptococcus bovis* groep, de *Streptococcus salivarius* groep, de *Streptococcus mutans* groep en de *Streptococcus mitis* groep, die tevens *S. pneumoniae* en de voormalige *S. sanguinis* groep bevat.

Vanuit klinisch standpunt is het perfect mogelijk om de viridans streptokokken op groep niveau te antwoorden. Zo zijn alle species van de *S. anginosus* groep geassocieerd met pyogene infecties en alle species van de *S. bovis* groep geassocieerd met infectieuze endocarditis en gastro-intestinale maligniteiten. Voor de *S. mitis* groep is enkel het onderscheid met *S. pneumoniae* van klinisch belang.

MALDI-TOF MS is een snelle en goedkope methode voor de routine identificatie van micro-organismen. Met behulp van de MALDI Biotyper van Bruker kunnen 72,7% van de viridans streptokokken correct tot op species niveau geïdentificeerd worden. Correcte identificatie tot op groep niveau wordt bereikt in 98,8%. Met de meest recente databanken (BDAL-6903 en recenter) is de MALDI Biotyper in staat om alle viridans streptokokken correct tot op groep niveau te identificeren. Om het foutief rapporteren van *S. mitis* isolaten als *S. pneumoniae* door de MALDI Biotyper te detecteren, blijft het voorlopig nog noodzakelijk om een bijkomende optochine gevoeligheidsbepaling uit te voeren. Op basis van een recente studie van Marin M et al. lijkt het differentiëren van *S. pneumoniae* en *S. mitis/oralis* isolaten veelbelovend naar de toekomst toe.

CLINICAL/DIAGNOSTIC SCENARIO

De taxonomische indeling van de viridans streptokokken is zeer complex en werd de laatste jaren regelmatig gewijzigd, enerzijds door het toepassen van nieuwere identificatiemethoden gebaseerd op onderlinge genetische verwantschap en anderzijds door het feit dat er regelmatig nog nieuwe species worden beschreven. Er bestaat momenteel ook geen gouden standaard voor de identificatie van viridans streptokokken, wat een correcte identificatie tot op species niveau in de praktijk sterk bemoeilijkt. [3,4,10]

De viridans streptokokken werden lange tijd beschouwd als onschuldige kiemen behorend tot de normale commensale flora, waardoor identificatie tot op species niveau niet nodig leek.

De laatste jaren is er echter een toenemende evidentie dat deze kiemen niet zo onschuldig zijn als eerst werd aangenomen. Zo zijn er duidelijke associaties beschreven tussen sommige species en het voorkomen van gastro-intestinale maligniteiten. [2,5,16-20] Bovendien zorgt de steeds groter wordende groep van immuun gecompromitteerde patiënten tot een toename van klinisch relevante invasieve infecties met deze kiemen. [21,28] Een correcte en betrouwbare identificatie van de viridans streptokokken wordt dus steeds belangrijker.

De huidige identificatie van viridans streptokokken in UZ Leuven is dringend aan verbetering toe. Momenteel worden slechts een beperkt aantal van de viridans streptokokken geïdentificeerd via MALDI-TOF MS, automatisch gekoppeld en doorgestuurd naar het laboratorium-informatiesysteem. Verder is er geen uniforme manier van rapporteren. Zo worden de 3 species van de *Streptococcus anginosus* groep allen geantwoord als *Streptococcus anginosus*, terwijl de species van de andere viridans groepen wel individueel worden gerapporteerd (zie tabel 1).

Tabel 1: Huidige MALDI-TOF – LIS koppeling in UZ Leuven (maart 2018)

MALDI-TOF MS identificatie	Codering LIS
<i>Streptococcus anginosus</i>	<i>Streptococcus anginosus</i>
<i>Streptococcus constellatus</i>	<i>Streptococcus anginosus</i>
<i>Streptococcus intermedius</i>	<i>Streptococcus anginosus</i>
<i>Streptococcus bovis</i>	<i>Streptococcus bovis</i>
<i>Streptococcus alactolyticus</i>	<i>Streptococcus alactolyticus</i>
<i>Streptococcus equinus</i>	<i>Streptococcus equinus</i>
<i>Streptococcus gallolyticus</i>	<i>Streptococcus gallolyticus</i>
<i>Streptococcus gordonii</i>	<i>Streptococcus gordonii</i>
<i>Streptococcus massiliensis</i>	<i>Streptococcus massiliensis</i>
<i>Streptococcus mitis</i>	<i>Streptococcus mitis</i>

<i>Streptococcus mutans</i>	<i>Streptococcus mutans</i>
<i>Streptococcus oralis</i>	<i>Streptococcus oralis</i>
<i>Streptococcus salivarius</i>	<i>Streptococcus salivarius</i>
<i>Streptococcus sanguinis</i>	<i>Streptococcus sanguinis</i>
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>

Er is dus nood aan een uniforme en eenduidige manier van rapporteren van de viridans streptokokken naar de kliniek toe. Deze CAT is gericht op het optimaliseren van de workflow van de identificatie van viridans streptokokken in het bacteriologisch laboratorium van UZ Leuven.

In het eerste deel van deze CAT wordt op basis van de huidige taxonomische indeling van de viridans streptokokken de klinische relevantie van de verschillende species nagegaan om een antwoord te formuleren op de eerste vraag (cfr. infra). In het tweede deel gaan we dieper in op het gebruik van de MALDI-TOF MS voor de identificatie van viridans streptokokken.

QUESTION(S)

1. Is het klinisch relevant om viridans streptokokken tot op species/subspecies niveau te identificeren of volstaat identificatie tot op groepsniveau?
2. Hoe betrouwbaar is MALDI-TOF MS voor de identificatie viridans streptokokken?
 - a. Hoe interpreteren we de identificatie van viridans streptokokken en rapporteren we dit naar de kliniek toe?
 - b. Wat is het risico op missen/foutief rapporteren van *Streptococcus pneumoniae* met MALDI-TOF?
 - c. Bestaan er betrouwbare en goedkopere alternatieven?

SEARCH TERMS

- 1) MeSH Database (PubMed): MeSH term: ““Streptococci” and “taxonomy”, “viridans Streptococci” and “MALDI-TOF”, “*Streptococcus anginosus*” and “Cystic fibrosis”, “*Streptococcus anginosus* group”, “*Streptococcus bovis* group”, “*Streptococcus milleri* group”, “*Streptococcus salivarius* group”, “*Streptococcus mutans* group”, “*Streptococcus mitis* group”, “*streptococcus pneumoniae*”, “viridans streptococci” and “endocarditis”, “viridans streptococci” and “infection”, “*streptococcus mitis*” and “infective endocarditis”
- 2) Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)

RELEVANT EVIDENCE/REFERENCES

- a) Guidelines and Recommendations
 - 1) CLSI. Methods for the Identification of Cultured Microorganisms Using Matrix-Assisted Laser Desorption/ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry. 1st ed. CLSI guideline M58. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute: 2017.
- b) Systematic Reviews and Meta-analyses
 - 2) Boleij A, van Gelder MMHJ, Swinkels DW and Tjalsma H. Clinical importance of *Streptococcus gallolyticus* infection among colorectal cancer patients: systematic review and meta-analysis. Clin Infect Dis. 2011;53(9):870-878.
- c) Reviews
 - 3) Facklam, R. 2002. What happened to the streptococci: overview of taxonomic and nomenclature changes. Clin Microbiol Rev. 2002;15(4):613-630.
 - 4) Doem CD and Burham CA. It's not easy being green: the viridans group streptococci, with a focus on pediatric clinical manifestations. J Clin Microbiol. 2010; 48:3829-3835.
 - 5) Dekker JP and Lau AF. An update on the *Streptococcus bovis* group: classification, identification, and disease associations. J Clin Microbiol. 2016;54(7):1694-1699.
 - 6) Drijkoningen JJC and Rohde GGU. Pneumococcal infection in adults: Burden of disease. Clin Microbiol Infect. 2014;20(5):45-51.

- 7) Janda JM, Abbott SL. Minireview: 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. *J Clin Microbiol.* 2007;45(9):2761-2764.
- 8) Croxatto A, Prod'hom G, Greub G. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. *FEMS Microbiol Rev.* 2012;36:380-407.
- 9) Fan WT, Qin TT, Bi RR, Kang HQ, Ma P, Gu B. Performance of the matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry system for rapid identification of streptococci: a review. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2017;36:1005-1012.

d) *Original Articles*

- 10) Köhler W. The present state of the species within the genera *Streptococcus* and *Enterococcus*. *Int J Med Microbiol.* 2007;297:133-150.
- 11) Jensen A, Hoshino T and Kilian M. Taxonomy of the anginosus group of the genus *Streptococcus* and description of *Streptococcus anginosus* subsp. *whileyi* subsp. nov. and *Streptococcus constellatus* subsp. *viborgensis* subsp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2013;63:2506-2519.
- 12) Claridge JE, Attorri S, Musher DM, Hebert J and Dunbar S. *Streptococcus intermedius*, *Streptococcus constellatus* and *Streptococcus anginosus* ("Streptococcus milleri group") are of different clinical importance and are not equally associated with abscess. *Clin Infect Dis.* 2001;32:1511-1515.
- 13) Asam D and Spellerberg B. Molecular pathogenicity of *Streptococcus anginosus*. *Mol Oral Microbiol.* 2014;29:145-155.
- 14) Siegmann-Igra Y, Azmon Y and Schwartz D. Milleri group streptococcus – a stepchild in the viridans family. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2012;31:2453-2459.
- 15) Hill EM. The emergence of *Streptococcus anginosus* group as a cystic fibrosis pathogen. *Clin Microbiol Newsl.* 2017;39(18):143-147.
- 16) Olmos C, Vilacosta I, Sarria C et al. *Streptococcus bovis* endocarditis: update from a multicenter registry. *Am Heart J.* 2016;171:7-13.
- 17) Almeida P, Railsback J et Gleason JB. A rare case of *Streptococcus lactolyticus* infective endocarditis complicated by septic emboli and mycotic left middle cerebral artery aneurysm. *Case Rep Infect Dis.* 2016 July. <http://dx.doi.org/10.1155/2016/9081352>.
- 18) Corredoira J, Alonso MP, Garcia-Garrote F et al. *Streptococcus bovis* group and biliary tract infections: an analysis of 51 cases. *Clin Microbiol Infect.* 2014;20(5):405-409.
- 19) Beneteau A, Levy C, Foucaud P et al. Childhood meningitis causes by *Streptococcus bovis* group: clinical and biologic data during a 12-year period in France. *Pediatr Infect Dis J.* 2015;34(2):136-139.
- 20) Ben-Chetrit E, Wiener-Well Y, Kashat L, Yinnon AM and Assous MV. *Streptococcus bovis* new taxonomy: does subspecies distinction matter? *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2017;36:387-393.
- 21) Corredoira JC, Alonso MP, Garcia JF et al. Clinical characteristics and significance of *Streptococcus salivarius* bacteremia and *Streptococcus bovis* bacteremia: a prospective 16-year study. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2005;24:250-255.
- 22) Wilson M, Marin R, Walk ST et al. Clinical and laboratory features of *Streptococcus salivarius* meningitis: a case report and literature review. *Clin Med Res.* 2012;10(1):15-25.
- 23) Kumar VN, van der Linden M, Menon T, Nitsche-Schmitz PD. Viridans and bovis group streptococci that cause infective endocarditis in two regions with contrasting epidemiology. *Int J Med Microbiol.* 2014;304:262-268.
- 24) Kitten T, Munro CL, Zollar NQ, Lee SP and Patel RD. Oral Streptococcal bacteremia in hospitalized patients: taxonomic identification and clinical characterization. *J Clin Microbiol.* 2012;50(3):1039-1042.
- 25) Jensen A, Scholz CFP and Kilian M. Re-evaluation of the mitis group of the genus *Streptococcus* based on whole genome phylogenetic analyses, and proposed reclassification of *Streptococcus dentisani* as *Streptococcus oralis* subsp. *dentisani* comb. nov., *Streptococcus tigurinus* as

Streptococcus oralis subsp. *tigurinus* comb. nov., and *Streptococcus oligofermentans* as a later synonym of *Streptococcus cristatus*. Int J Syst Evol Microbiol. 2016;66:4803-4820.

- 26) Tena D, Fernández C, López-Garrido B, Pérez-Balsalobre M, Losa C, Medina-Pascual MJ. Lactational mastitis caused by *Streptococcus lactarius*. Diagn Microbiol Infect Dis. 2016;85(4):490-492. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2016.04.021. Epub.
- 27) Byrd VS and Nemeth AS. A case of infective endocarditis and spinal epidural abscess caused by *Streptococcus mitis* bacteremia. Case Rep Infect Dis. 2017 Sep. <http://dx.doi.org/10.1155/2017/7289032>. Epub.
- 28) Shelburne SA, Sahasrabhojane P, Saldana M et al. *Streptococcus mitis* strains causing severe clinical disease in cancer patients. Emerg Infect Dis. 2014;20(5):762-771.
- 29) Matthys C, Claeys G, Verschraegen G et al. *Streptococcus cristatus* isolated from a resected heart valve and blood cultures: case reports and application of phenotypic and genotypic techniques for identification. Acta Clin Belg 2006;61(4):196-200.
- 30) Matta M, Gousseff M, Monsel F et al. First case of *Streptococcus oligofermentans* endocarditis determined based on *sodA* gene sequences after amplification directly from valvular samples. J Clin Microbiol. 2009;47(3):855-856.
- 31) Zbinden A et al. *Streptococcus tigurinus*, a novel member of the *Streptococcus mitis* group, causes invasive infections. J Clin Microbiol. 2012;50(9):2969-2973.
- 32) Dadon Z et al. Spondylodiskitis and endocarditis due to *Streptococcus gordonii*. Ann Clin Microbiol Antimicrob. 2017;16(68):1-4.
- 33) Nijjer S and Dubrey SW. *Streptococcus sanguis* endocarditis associated with colonic carcinoma. BMJ Case Rep 2010 Feb. <http://dx.doi.org/10.1136/bcr.09.2009.2311>. Epub.
- 34) Fu-Lun C, Shio-Shin J, Tsong-Yih O, Ciueng-Chueng W, Fang-Lan Y and Wen-Sen L. *Streptococcus sanguis* bacteremia complicating endocarditis associated with colonic adenocarcinoma. J Microbiol Immunol Infect. 2017;50(3):399-400.
- 35) Janda WM and Stroger JH. The genus *Streptococcus* part II: New species and pathogens in the "miscellaneous" streptococci and "viridans" streptococci groups. Clin Microbiol Newsl. 2014;36(21):167-175.
- 36) Zhou M, Yang Q, Kudinha T, Zhang L, Xiao M, Kong F et al. Using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight (MALDI-TOF) complemented with selected 16S rRNA and *gyrB* genes sequencing to practically identify clinical important viridans group streptococci (VGS). Front Microbiol. 2016;7:1328. Doi: 10.3389/fmicb.2016.01328.
- 37) Galloway-Peña J, Sahasrabhojane P, Tarrand J, Han XY, Shelburne SA. *GyrB* polymorphisms accurately assign invasive viridans group streptococcal species. J Clin Microbiol. 2014;52(8):2905-2912.
- 38) Teles C, Smith A, Ramage G, Lang S. Identification of clinically relevant viridans group streptococci by phenotypic and genotypic analysis. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2011;30:243-250.
- 39) Isaksson J, Rasmussen M, Nilson B, Svensson Stadler L, Kurland S, Olaison L et al. Comparison of species identification of endocarditis associated viridans streptococci using *rnpB* genotyping and 2 MALDI-TOF systems. Diagn Microbiol Infect Dis. 2015;81:240-245.
- 40) Haanperä M, Jalava J, Huovinen P, Meurman O, Rantakokko-Jalava K. Identification of alpha-hemolytic streptococci by pyrosequencing the 16S rRNA gene and by use of Vitek 2. J Clin Microbiol. 2007;45(3):762-770.
- 41) Ikryannikova LN, Filimonova AV, Malakhova MV, Savinova T, Filimonova O, Ilina EN et al. Discrimination between *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus mitis* based on sorting of their MALDI mass spectra. Clin Microbiol Infect. 2013;19:1066-10171.
- 42) Harju I, Lange C, Kostrzewa M, Maier T, Rantakokko-Jalava K, Haanperä M. Improved differentiation of *Streptococcus pneumoniae* and other *S. mitis* group Streptococci by MALDI Biotyper using an improved MALDI Biotyper database content and a novel result interpretation algorithm. J Clin Microbiol. 2017;55(3):914-922.

- 43) Marín M, Cercenado E, Sánchez-Carillo C, Ruiz A, Gómez González A, Rodríguez-Sánchez B et al. Accurate differentiation of *Streptococcus pneumoniae* from other species within the *Streptococcus mitis* group by peak analysis using MALDI-TOF MS. *Front Microbiol* 2017;8:698. doi: 10.3389/fmicb.2017.00698. Epub.
- 44) Angletti S, Dicuonzo G, Avola A, Crea F, Dedej E, Vailati F et al. Viridans group streptococci clinical isolates: MALDI-TOF mass spectrometry versus gene sequence-based information. *PLoS ONE*. 2015. Doi:10.1371/journal.pone.0120502. Epub.
- 45) López Roa P, Sánchez-Carillo C, Marin M, Romero F, Cercenado E, Bouza E. Value of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight for routine identification of viridans group streptococci causing bloodstream infections. *Clin Microbiol Infect*. 2013;19:438-444.
- 46) Davies AP, Reid M, Hadfield SJ, Johnston S, Mikhail J, Harris LG et al. Identification of clinical isolates of alpha-hemolytic streptococci by 16S rRNA gene sequencing, matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry using MALDI Biotyper, and conventional phenotypic methods: a comparison. *J Clin Microbiol*. 2012;50(12):4087-4090.
- 47) Kärpänoja P, Harju I, Rantakokko-Jalava K, Haanperä M, Sarkkinen H. Evaluation of two matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry systems for identification of viridans group streptococci. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2014;33:779-788.

e) Databases, "grey literature"

- 48) Databank BDAL-7311 species list. Bruker.
- 49) Matching Hints for BDAL-7311 species list. Bruker. 11-2017.

APPRAISAL (MAX 3000 WOORDEN!!)

- 1) Is het klinisch relevant om viridans streptokokken tot op species niveau te identificeren of volstaat identificatie tot op groepsniveau?

Deel I: taxonomische indeling en klinische relevantie van de viridans streptokokken

I.1 Inleiding viridans streptokokken

De naam viridans streptokokken is etymologisch afkomstig van het Latijnse 'viridis' wat groen betekent en verwijst naar het alfa-hemolysepatroon van een groot deel van de viridans streptokokken met vorming van vergroenende kolonies op bloedagar ten gevolge van de partiële lysis van erythrocyten.

De Streptokokken zijn de afgelopen eeuw verschillende malen beschreven en heringedeeld in subgroepen [3,4]:

- 1903 Shotmuller: gebruik van bloedagar voor onderscheid tussen bèta-hemolytische en niet bèta-hemolytische Streptokokken;
- 1906 Andrews en Horder: beschrijving viridans streptokokken met introductie *Streptococcus mitis* groep;
- 1933 Lancefield: indeling streptokokken op basis van koolhydraatantigenen;
- 1937 Sherman: indeling streptokokken in 4 grote groepen: pyogene streptokokken, viridans streptokokken, enterokokken (latere genus *Enterococcus*) en isolaten geïsoleerd uit zuivelproducten (latere genus *Lactococcus*).

Moderne technieken zoals de 16S rRNA sequentieanalyse en gen sequentieanalyses hebben in de jaren '90 aanleiding gegeven tot nieuwe classificaties op basis van genetisch verwantschap: [10]

- 1991 Bentley: 16S rRNA analyse van 24 streptococcus species met indeling in 5 grote clusters;
- 1995 Kawamura: 16S rRNA analyse van 34 Streptococcus species met onderverdeling in 6 grote fylogenetische groepen: pyogene groep, mitis groep, salivarius groep, bovis groep, anginosus groep en mutans groep;
- 1999 Kawamura: bijkomende sodA genanalyse: onderscheid tussen sterk genetisch verwante *S. oralis*, *S. mitis* en *S. pneumoniae*;
- 2002 Facklam: toevoeging van een extra fylogenetische groep: de *S. sanguinis* groep
- 2007 Köhler: verdeling van de pyogene groep en viridans streptokokken in 5 groepen (*S. sanguinis* groep als onderdeel van de *S. mitis* groep).

De viridans streptokokken worden momenteel dus ingedeeld in 5 grote fylogenetische groepen: [10]

1. de *Streptococcus anginosus* groep;
2. de *Streptococcus bovis* groep;
3. de *Streptococcus salivarius* groep;
4. de *Streptococcus mutans* groep;
5. de *Streptococcus mitis* groep (die ook de *S. sanguinis* groep en *S. pneumoniae/pseudopneumoniae* bevat).

Tabel 2: Fenotypische karakteristieken van de verschillende groepen viridans streptokokken [3,4,10,34]

groep	hemolysepatroon	Lancefieldgroep	Biochemische reacties				
			arginine	GE	VP	sorbitol	mannitol
Bovis	α, γ	D, -	-	+	+	-	V
Anginosus	α, β, γ	A, C, F, G, -	+	+*	+	-	V
Salivarius	α, β, γ	H, K, -	-	V	+	-	-
Mutans	α, (β), γ	-	-	+	+	+	+
Mitis	α, γ	A, B, C, F, G, H, K, O, W, -	V	V	-	-	-

Legende: GE gal esculine, VP Voges-Proskauer of acetoïne, - negatieve reactie, + positieve reactie, V variabel reactiepatroon; *met uitzondering van *S. infantarius* subsp. *infantarius*

I.2 De *Streptococcus anginosus* groep (SAG)

De *Streptococcus anginosus* groep, voordien gekend onder de naam *Streptococcus milleri* groep, bestaat uit 3 verschillende species: *Streptococcus anginosus*, *Streptococcus intermedius* en *Streptococcus constellatus*. *Streptococcus constellatus* wordt nog verder onderverdeeld in drie subspecies, namelijk *S. constellatus* subsp. *constellatus*, *S. constellatus* subsp. *pharyngis* en *S. constellatus* subsp. *viborgensis*. *Streptococcus anginosus* wordt verder ingedeeld in twee subspecies, namelijk *S. anginosus* subsp. *anginosus* en *S. anginosus* subsp. *whileyi*. [11] De species in deze groep zijn genetisch nauw verwant en hebben als gemeenschappelijk kenmerk dat ze allen arginine en acetoïne (Voges-Proskauer) positief zijn en sorbitol negatief. Fenotypisch zijn er grote verschillen qua Lancefieldgroep (-, A, C, G

en F) en hemolysepatroon (alfa, bèta en gamma). [3,10,11-13,35] De SAG behoort tot de commensale flora van de orofaryngeale, gastro-intestinale en urogenitale mucosae bij 15-40% van de gezonde populatie. [15]

De klinische relevantie van de SAG kan ingedeeld worden in:

- associatie met pyogene infecties en abscesvorming;
- associatie met overige infecties zoals bacteriëmie, cultuur negatieve pneumonie en urineweginfecties.

De SAG is geassocieerd met pyogene infecties en abscesvorming. *Streptococcus anginosus* is de meest frequent geïsoleerde kiem uit de SAG en heeft vaak een abdominale focus (appendicitis, peri-appendiculaire abscessen, perianale abscessen). *Streptococcus intermedius* wordt vooral geïsoleerd uit diepe abscessen zoals lever- en hersenabscessen en vertoont een hematogeen verspreidingspatroon (bacteriëmie). *Streptococcus constellatus* daarentegen wordt vaak uit respiratoire specimen geïsoleerd. [12-15]

De laatste jaren is er toenemende evidentie voor een pathogene rol van de SAG bij mucoviscidose. Zo bestaat er een kwantitatieve associatie tussen de aanwezigheid van SAG in de luchtwegen van mucoviscidosepatiënten en het optreden van klinische deterioratie. Bovendien bestaat er een sterk vermoeden dat de SAG de pathogeniciteit van klassieke mucoviscidose-kiemen zoals *Pseudomonas aeruginosa* kan versterken. [15]

Naast bovengenoemde pyogene infecties, kan de SAG ook aanleiding geven tot symptomatische urineweginfecties en een oorzaak zijn van bacteriëmie. [14] De gerapporteerde mortaliteit bij *Streptococcus intermedius* bacteriëmie varieert zelfs van 10 tot 26%. De SAG behoort ook tot de verwerkers van bacteriële pneumonie (tot 25% van de zogenaamde cultuur negatieve pneumonie). [15]

1.3 De *Streptococcus bovis* groep (SBG)

De *Streptococcus bovis* groep bestaat uit 4 verschillende species, namelijk *Streptococcus equinus*, *Streptococcus gallolyticus*, *Streptococcus infantarius* en *Streptococcus alactolyticus*. *Streptococcus infantarius* wordt nog ingedeeld in 2 subspecies: *S. infantarius* subsp. *coli* (door sommige auteurs *S. lutetiensis* genoemd) en *S. infantarius* subsp. *infantarius*. *Streptococcus gallolyticus* in 3 subspecies: *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*, *S. gallolyticus* subsp. *pasteurianus* en *S. gallolyticus* subsp. *macedonicus*. De SBG behoort voornamelijk tot de Lancefieldgroep D, is gal esculine positief (met uitzondering van *S. infantarius* subsp. *infantarius*), acetoïne positief en sorbitol negatief.

Zoals de naam doet vermoeden, worden de species van de SBG vooral geïsoleerd uit runder- en zuivelproducten. Ze maken een deel uit van de normale gastro-intestinale commensale flora in de mens. [3,5,10,18,20,35]

De klinische relevantie van de SBG is reeds sinds de jaren 50 van vorige eeuw gekend en kan ingedeeld worden in 4 grote categorieën:

1. als verwekker van infectieuze endocarditis;
2. als verwekker van hepatobiliaire infecties;
3. als verwekker van bacteriële meningitis.
4. associatie met gastro-intestinale neoplasie.

De SBG vormt een belangrijke oorzaak van infectieuze endocarditis, en dan voornamelijk *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*. Deze kiem kan bij oudere mannen zonder onderliggend hartlijden aanleiding geven tot endocarditis, waarbij er frequent meerdere native hartkleppen worden aangetast. [16] Ook *S. alactolyticus*, die frequent aanleiding geeft tot pathogene infecties bij dieren, en *S. gallolyticus* subsp. *macedonicus* kunnen infectieuze endocarditis veroorzaken. [5,17]

Hepatobiliaire infecties zijn op infectieuze endocarditis na de belangrijkste oorzaak van SBG bacteriëmie. Vooral *S. infantarius* en *S. gallolyticus* subsp. *pasteurianus* zijn geassocieerd met galweginflecties. Bovendien wordt *S. infantarius* gelinkt aan galwegen- en pancreasmaligniteiten. [18]

De SBG is tevens een zeldzame verwekker van bacteriële meningitis, zowel bij volwassenen als bij kinderen. Vooral *S. gallolyticus* subsp. *pasteurianus* wordt geassocieerd met bacteriële meningitis. [5,19] Epidemiologische gegevens uit Frankrijk schatten het aandeel van de SBG als verwekker van pediatrische bacteriële meningitis op 0.5%. Opvallend in deze studie is de associatie van SBG meningitis met prematuriteit en het optreden ervan in de vroege neonatale periode, wat een foetomaternal transmissie doet vermoeden. SBG meningitis heeft globaal een goede prognose met zeer lage morbiditeit en mortaliteit. [19]

S. gallolyticus subsp. *gallolyticus* is ongetwijfeld het meest berucht omwille van zijn associatie met colorectale neoplasieën. Zo wordt er bij 33-71% van de patiënten met een *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* bacteriëmie een colorectale tumor aangetroffen, wat beduidend hoger is dan bij de gezonde controlepopulatie (10-25%). [2] Het is dus van essentieel belang om bij elke patiënt met isolatie van *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* uit een normaal steriel lichaamscompartiment, bedacht te zijn op de aanwezigheid van infectieuze endocarditis en op de mogelijke aanwezigheid van een onderliggende colorectale maligniteit. [2,5,16-20] Naast bovenstaande kliniek, kan de SBG ook aanleiding geven tot urineweginfecties, osteo-artculaire infecties en peritonitis bij levercirrose. [18]

1.4 De Streptococcus salivarius groep (SSG)

De *Streptococcus salivarius* groep bestaat uit 3 species: *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus vestibularis* en *Streptococcus thermophilus*. *S. salivarius* en *S. vestibularis* behoren tot de commensale flora van de orale caviteit. *Streptococcus thermophilus* wordt enkel in zuivelproducten aangetroffen en heeft geen klinische significantie. De SSG lijkt fenotypisch sterk op de SBG: zo is ook acetoïne positief en sorbitol negatief. Bovendien vertonen sommige species reactiviteit met Lancefieldgroep D antiserum en is de gal esculine test variabel positief. De overgrote meerderheid van de SSG behoort echter tot de Lancefieldgroep K. [3,4,10,21,35]

De SSG wordt voornamelijk beschouwd als onschuldige contaminant. Toch mag de klinische relevantie van *S. salivarius* niet worden onderschat, zo behoren 5-15% van viridans streptokokken geïsoleerd bij bacteriëmie tot de *S. salivarius* groep. [21] Bij patiënten met ernstige comorbiditeiten is *S. salivarius* geassocieerd met tal van infecties zoals bacteriëmie en endocarditis. Vooral bij oncologische patiënten met uitgebreide mucositis en diepe neutropenie kan *S. salivarius* aanleiding geven tot zeer ernstige, levensbedreigende infecties. [21] Naast bovenstaande opportunistische infecties, kan *S. salivarius* ook aanleiding geven tot meningitis. Deze meningitis is bijna steeds van iatrogene aard, bijvoorbeeld volgend op epidurale anesthesie of neurochirurgie. [22]

1.5 De Streptococcus mutans groep (SMuG)

De *Streptococcus mutans* groep (SMuG) bestaat uit verschillende species, waarvan enkel *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus* en occasioneel *Streptococcus criceti*, *Streptococcus downei* en *Streptococcus rattii* bij de mens worden geïsoleerd. De andere isolaten van deze groep: *S. ferus*, *S. macaccae*, *S. hyovaginalis* en *S. devriesei* worden enkel aangetroffen bij dieren.

De species van de SMuG zijn fenotypisch zeer gelijkaardig: ze zijn allen acetoïne, mannitol en sorbitol positief en arginine negatief.

De SMuG is een zeldzame verwekker van bacteriëmie en infectieuze endocarditis. Zo is *S. mutans* verantwoordelijk voor ongeveer 5% van de infectieuze endocarditis veroorzaakt door viridans streptokokken. [23] *Streptococcus mutans* speelt een belangrijke rol in de pathogenese van cariës. [3,4,10]

1.6 De Streptococcus mitis groep (SMG)

De *Streptococcus mitis* groep (SMG) bevat tevens de voormalige *S. sanguinis* groep en *S. pneumoniae*. Gezien het klinisch belang van *S. pneumoniae* wordt deze kiem hieronder apart besproken. De SMG bestaat momenteel uit 18 humane species: *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus pseudopneumoniae*, *Streptococcus cristatus*, *Streptococcus infantis*, *Streptococcus peroris*, *Streptococcus rubneri*, *Streptococcus dentisani*, *Streptococcus australis*, *Streptococcus sinensis*, *Streptococcus oligofermentans*, *Streptococcus massiliensis*, *Streptococcus tigurinus*, *Streptococcus lactarius*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus parasanguinis* en *Streptococcus gordonii*. Deze laatste 3 species behoren tot de voormalige *Streptococcus sanguinis* groep, die op basis van genetische verwantschap nu ingedeeld wordt bij de SMG. *Streptococcus orisratti*, *Streptococcus oribeci* en *Streptococcus panodentis* worden niet teruggevonden bij de mens en worden hier niet verder besproken. Jensen A et al. stelt voor om *Streptococcus dentisani* en *Streptococcus tigurinus* te beschouwen als subspecies van *Streptococcus oralis* op basis van hun genetische verwantschap. [25] *Streptococcus oralis* wordt hier dus onderverdeeld in 3 subspecies, namelijk *Streptococcus oralis* subsp. *oralis*, *Streptococcus oralis* subsp. *dentisani* en *Streptococcus oralis* subsp. *tigurinus*. Een andere opmerkelijke suggestie is dat *Streptococcus cristatus* en *Streptococcus oligofermentans* gezien mogen worden als slechts één species. Voorlopig zijn deze wijzigingen nog niet doorgevoerd. De species van de SMG zijn hoofdzakelijk alfa hemolytisch, behoren tot diverse Lancefieldgroepen (A, B, C, F, G, H, K, O, W of geen) en zijn meestal negatief voor mannitol, sorbitol en acetoïne. [3,10,25,35] De species van de SMG worden geïsoleerd uit de orale caviteit bij mens of dier, met uitzondering van *Streptococcus lactarius*, dat in moedermelk wordt teruggevonden en aanleiding kan geven tot lactatie-mastitis. [26]

De *Streptococcus mitis* groep behoort tot de commensale flora van de orale caviteit en kan sporadisch aanleiding geven tot ernstige infecties bij immuun gecompromitteerde patiënten. Vooral neutropene patiënten hebben een verhoogd risico op invasieve SMG infecties, met een geassocieerde mortaliteit schommelend tussen de 6% en 30%. [27,28] *Streptococcus mitis* en *S. oralis* (en in mindere mate de andere SMG isolaten) zijn de belangrijkste verwekkers van infectieuze endocarditis en bacteriëmie bij de viridans streptokokken. Naast bacteriëmie en endocarditis wordt de SMG ook geassocieerd met cariës, ooginfecties, osteomyelitis, spondylodiscitis, meningitis en pneumonie. [27-31]

Streptococcus infantis, *Streptococcus australis*, *Streptococcus rubneri*, *Streptococcus dentisani*, *Streptococcus peroris*, *Streptococcus massiliensis*, *Streptococcus oligofermentans*, *Streptococcus cristatus*, *S. sinensis* kunnen allen sporadisch aanleiding geven tot bacteriëmie en infectieuze endocarditis. De literatuur omtrent deze kiemen is zeer beperkt waardoor hun klinische relevantie voorlopig een vraagteken blijft. [3,10,24,29,30,35] *Streptococcus tigurinus* is een

vrij recent beschreven species uit de SMG, waardoor dit micro-organisme momenteel nog niet is opgenomen in de MALDI-TOF databanken. *Streptococcus tigurinus* is geassocieerd met invasieve infecties. Zo kan *S. tigurinus* onder andere aanleiding geven tot spondylodiscitis, meningitis, gewrichtsprothese infecties, thoracaal empyeem en bacteriëmie, en dit zowel bij immuun competente als bij immuun gecompromitteerde patiënten. [31] *Streptococcus pseudopneumoniae* wordt frequent geïsoleerd uit de lage luchtwegen, wordt geassocieerd met bronchitis, pneumonie en pulmonale exacerbaties bij COPD en bij mucoviscidose en onderscheidt zich zo van de andere isolaten uit de SMG. [30]

Streptococcus gordonii, *Streptococcus sanguinis* en *Streptococcus parasanguinis* (de voormalige *S. sanguinis* groep) kunnen allen aanleiding geven tot bacteriëmie en infectieuze endocarditis. *S. gordonii* kan ook geïsoleerd worden bij septische artritis, spontane bacteriële peritonitis en spondylodiscitis. Bij *S. gordonii* spondylodiscitis is langdurige (2-3 maanden) IV AB-therapie aangewezen en dient een onderliggende infectieuze endocarditis steeds uitgesloten te worden. [32] *Streptococcus sanguinis* kan occasioneel aangetroffen worden in de gastro-intestinale tractus. Er wordt een link tussen *Streptococcus sanguinis* endocarditis/bacteriëmie en colorectale carcinomen gesuggereerd door verschillende auteurs. Het nut van screening op gastro-intestinale maligniteiten bij *S. sanguinis* endocarditis wordt momenteel echter nog in twijfel getrokken. [33,34]

1.7. *Streptococcus pneumoniae*

Streptococcus pneumoniae behoort tot de *Streptococcus mitis* groep (en dus de viridans streptokokken), maar wordt in de literatuur vaak als aparte entiteit besproken. *Streptococcus pneumoniae* wordt op basis van de samenstelling van zijn polysacharide kapsel ingedeeld in serotypes, de zogenaamde kapseltypering. *Streptococcus pneumoniae* is alfa-hemolytisch en wordt van de andere SMG species gedifferentieerd op basis van zijn optochine gevoeligheid en gal oplosbaarheid. *Streptococcus pseudopneumoniae* kan echter bij incubatie onder normale atmosfeer als optochine gevoelig worden gerapporteerd. Een correcte differentiatie tussen *S. pneumoniae* en *S. pseudopneumoniae* op basis van optochine gevoeligheid vereist dus incubatie in 5% CO₂. [35]

Streptococcus pneumoniae is de belangrijkste verwekker van community-acquired pneumonie in onze streken. Pneumokokkeninfecties worden in de literatuur vaak ingedeeld op basis van hun invasiviteit. Onder niet-invasieve pneumokokkeninfecties verstaan we dan sinusitis, acute otitis media en community-acquired pneumonie, onder invasieve pneumokokkeninfecties meningitis en sepsis. [6]

1.8 Besluit en antwoord op vraagstelling

De huidige taxonomische indeling van de viridans streptokokken met hun klinische relevantie op basis van bovenstaande literatuurstudie staat samengevat in onderstaande tabel.

Tabel 3: Taxonomische indeling van de viridans streptokokken met hun klinische relevantie

Fylogenetische groep	species	subspecies	kliniek
<i>Streptococcus anginosus</i> groep (SAG)	<i>S. anginosus</i>	<i>anginosus</i>	Pyogene infecties en abscesvorming met abdominale focus
		<i>whileyi</i>	
	<i>S. constellatus</i>	<i>constellatus</i>	Respiratoire focus: pneumonie, pulmonale exacerbaties bij mucoviscidose
		<i>viborgensis</i> <i>pharyngis</i>	Respiratoire focus, faryngitis
<i>S. intermedius</i>		Pyogene infecties, bacteriëmie, lever- en hersenabscessen	
<i>Streptococcus mitis</i> groep (SMG)	<i>S. mitis</i>		Bacteriëmie, endocarditis
	<i>S. oralis</i>		Bacteriëmie, endocarditis, meningitis
	<i>S. cristatus</i>		Bacteriëmie, endocarditis ^o
	<i>S. infantis</i>		Bacteriëmie ^o
	<i>S. peroris</i>		/
	<i>S. rubneri</i>		/
	<i>S. dentisani</i>		/
	<i>S. australis</i>		Bacteriëmie ^o
	<i>S. sinensis</i>		Endocarditis bij onderliggend reumatisch hartlijden
	<i>S. oligofermentans</i>		Infectieuze endocarditis ^o
	<i>S. massiliensis</i>		Bacteriëmie ^o
	<i>S. tigurinus</i>		Invasieve infecties: endocarditis, spondylodiscitis, meningitis
	<i>S. lactarius</i>		Mastitis ^o

	<i>S. pseudopneumoniae</i>		Respiratoire focus: bronchitis, pneumonie en pulmonale exacerbaties bij COPD en mucoviscidose; zeldzame verwekker van endoftalmitis
	<i>S. orisratti</i>		\
	<i>S. oribeci</i>		\
	<i>S. panodentis</i>		\
	<i>S. pneumoniae</i>		Niet-invasieve infecties: sinusitis, acute otitis media en community-acquired pneumonie (CAP) Invasieve infecties: meningitis, bacteriëmie en bacteriële pneumonie
	<i>S. sanguinis</i>		Bacteriëmie, infectieuze endocarditis; associatie met colorectale carcinoma?
	<i>S. parasanguinis</i>		Bacteriëmie, infectieuze endocarditis
	<i>S. gordonii</i>		Septische artritis, infectieuze endocarditis, spontane bacteriële peritonitis en spondylodiscitis
Streptococcus salivarius groep (SSG)	<i>S. salivarius</i>		Pneumonie, bacteriëmie, sepsis, endocarditis en katheterinfecties bij patiënten met uitgebreide comorbiditeiten; iatrogene meningitis
	<i>S. vestibularis</i>		
	<i>S. thermophilus</i>		
Streptococcus mutans groep (SMuG)	<i>S. mutans</i>		Pathogenese van cariës
	<i>S. sobrinus</i>		Bacteriëmie, infectieuze endocarditis
	<i>S. cricetus</i>		
	<i>S. downei</i>		
	<i>S. rattii</i>		
	<i>S. ferus</i>		\
	<i>S. macaccae</i>		\
	<i>S. hyovaginalis</i>		\
	<i>S. devriesei</i>		\
Streptococcus bovis groep (SBG)	<i>S. alactolyticus</i>		Infectieuze endocarditis ^o
	<i>S. equinus</i>		Bacteriëmie, infectieuze endocarditis
	<i>S. gallolyticus</i>	<i>gallolyticus</i>	Bacteriëmie, infectieuze endocarditis, coloncarcinoma
		<i>pasteurianus</i>	Meningitis, bacteriëmie, hepatobiliaire infecties
		<i>macedonicus</i>	Bacteriëmie, infectieuze endocarditis
	<i>S. infantarius</i>	<i>infantarius</i>	Bacteriëmie, hepatobiliaire infecties, galweg-en pancreasCa
		<i>coli</i> **	
	<i>S. lutetiensis</i> **		

Legende:

^o beperkte literatuur omtrent isolatie uit klinische stalen

/ klinisch niet relevant of klinische relevantie onduidelijk

\ enkel geïsoleerd uit niet-humane stalen

* onderdeel van de *S. mitis* groep

** *S. infantarius* subsp. *coli* wordt door sommige auteurs *S. lutetiensis* genoemd

In kader van onze vraagstelling heeft CLSI de volgende aanbevelingen geformuleerd:

- Identificatie tot op groep niveau is aanvaardbaar voor sommige zeer verwante species indien bijkomende identificatie geen verder klinisch belang heeft.
- Identificatie tot op species of subspecies niveau wordt steeds aangeraden bij:
 - o micro-organismen met belangrijke impact op de volksgezondheid;
 - o micro-organismen geassocieerd met ernstige comorbiditeiten;
 - o micro-organismen met prognostische implicaties;
 - o micro-organismen resistent tegen frequent gebruikte antibiotica. [1]

Op basis van deze criteria kunnen we voor de SSG en de SMuG stellen dat identificatie tot op groep niveau zeker aanvaardbaar is. Bovenstaande literatuurstudie toont immers duidelijk aan dat identificatie tot op species niveau niet klinisch relevant is.

De isolaten van de SAG zijn allen geassocieerd met pyogene infecties maar worden gelinkt aan verschillende infectiefoci. Het is belangrijk om bij deze groep bedacht te zijn op de aanwezigheid van abscessen en hiermee ook rekening te houden bij de keuze van antibacteriële therapie. Op basis van een grondige anamnese en uitgebreid klinisch onderzoek is men meestal in staat om de oorspronkelijke infectiehaard te detecteren. Ook voor de *Streptococcus anginosus* groep volstaat dus identificatie tot op groep niveau.

Identificatie tot op species en zelfs subspecies niveau lijkt aangeraden voor isolaten uit de SBG, gezien de historische associatie van *S. gallolyticus* ssp. *gallolyticus* met infectieuze endocarditis en colorectale maligniteiten. Om een adequaat antwoord te formuleren op de vraag of identificatie tot op species of subspecies echt noodzakelijk is bij de SBG verwijs ik naar de conclusies van Ben-Chetrit et al. [20] Deze studie heeft de klinische relevantie van identificatie tot op subspecies niveau in de SBG onderzocht door gegevens van 240 verschillende SBG isolaten te verzamelen en te verwerken. Deze studie toont aan dat alle species en subspecies in de *S. bovis* groep geassocieerd kunnen worden met infectieuze endocarditis en colonpathologie. Ook voor de *Streptococcus bovis* groep volstaat dus identificatie tot op groep niveau.

De isolaten uit de *Streptococcus mitis* groep zijn voornamelijk geassocieerd met infectieuze endocarditis en bacteriemie. Bovendien is de klinische relevantie van heel wat species in deze groep nog niet duidelijk. Vanuit klinisch standpunt is momenteel enkel het onderscheid tussen *S. pneumoniae* en de andere *S. mitis* species relevant. Ook hier kunnen we dus concluderen dat het voorlopig volstaat om te rapporteren op groep niveau (met uitzondering van *S. pneumoniae*). Aangezien door sommige auteurs een associatie wordt gesuggereerd tussen *S. sanguinis* en gastro-intestinale maligniteiten, kan het in de toekomst wel noodzakelijk worden om dit species te onderscheiden van de andere *S. mitis* isolaten.

- 2) Hoe betrouwbaar is MALDI-TOF MS voor de identificatie viridans streptokokken?
- Hoe interpreteren we de identificatie van viridans streptokokken en rapporteren we dit naar de kliniek toe?
 - Wat is het risico op missen/foutief rapporteren van *Streptococcus pneumoniae* met MALDI-TOF?
 - Bestaan er betrouwbare en goedkopere alternatieven?

Deel II: identificatie van viridans streptokokken via MALDI-TOF MS

2.1 Fenotypische identificatie

Historisch worden de viridans streptokokken fenotypisch beschreven als alfa-hemolytische, grampositieve kokken in ketenvorm gelegen en katalase negatief. [44,45] Voor de fenotypische eigenschappen van de verschillende groepen viridans streptokokken, zie tabel 2 (supra).

Zoals eerder reeds aangehaald, bestaat er geen gouden standaard methode voor de identificatie van viridans streptokokken. De meest gebruikte fenotypische methoden zoals API® 20 Strep en VITEK® 2 laten immers slechts in 30-80% van de gevallen een accurate identificatie tot op species niveau toe. [36-38]

Fenotypische variabiliteit, waardoor stammen van eenzelfde species verschillende fenotypische reactiepatronen kunnen vertonen, draagt voor een belangrijk deel bij tot deze slechte diagnostische performantie. Andere oorzaken zijn onder meer een slechte reproduceerbaarheid, subjectiviteit bij het interpreteren van de resultaten en het ontbreken van recente fenotypische informatie van nieuw geïdentificeerde of heringedeelde species. [37,39]

API® 20 Strep (BioMérieux) bevat een teststrip met daarop 20 verschillende microtubes waarin 20 verschillende biochemische reacties worden nagegaan. Na 4u incubatie kan reeds een eerste aflezing plaatsvinden, definitieve aflezing en uiteindelijke identificatie vindt pas na 24u plaats. VITEK® 2 GP (BioMérieux) identificatie gebeurt tevens fenotypisch op basis van 43 biochemische testen die 8u lang gemonitord worden. Beide methoden hebben een beperkte database waarin niet alle viridans streptokokken zijn opgenomen. Bovendien kunnen sommige fenotypisch sterk op elkaar gelijkende species niet worden gedifferentieerd via VITEK 2, waardoor deze als 'slashline species' worden gerapporteerd, bijvoorbeeld *Streptococcus mitis/oralis*. [40]

2.2 Moleculaire identificatie: gen sequentieanalyse

Bij gen sequentieanalyse wordt de volgorde van de basenparen in specifieke stukken (loci) DNA bepaald. De afgelezen sequentie wordt in een volgende stap vergeleken met deze uit een referentie databank.

Men maakt klassiek het onderscheid tussen single gene sequentieanalyse en multilocus sequentieanalyse (MLSA).

Bij single gene sequentieanalyse gaat men de basenpaarvolgorde van slechts 1 gen aflezen en vergelijken, bij multilocus sequentieanalyse worden er gelijktijdig verschillende DNA regio's afgelezen.

De meest onderzochte huishoudgenen voor moleculaire identificatie van viridans streptokokken zijn:

- 16S rRNA gen (RNA 30S subunit ribosoom);
- sodA gen (superoxide dismutase);
- groESL gen (hitteschokeiwitten);
- rpnB gen (RNA subunit van endonuclease P);
- rpoB gen (subunit B van RNA polymerase);
- gyrB gen (subunit B van DNA gyrase);
- ddl (D-alanyl-alanine synthetase A);
- tuf (elongatiefactor Tu);
- RecA (Recombinase A). [36,38,41-43]

Sequentieanalyse van het 16S rRNA gen wordt frequent gebruikt om de mate van fylogenetisch verwantschap tussen verschillende species aan te tonen en heeft een belangrijke rol gespeeld bij de recente taxonomische classificatie van de viridans Streptokokken. Het 16S rRNA gen behoort tot de zogenaamde huishoudgenen waardoor de functie en de samenstelling van het gen vrij constant zijn gebleven door de jaren heen. Veranderingen in basenpaarsamenstelling kunnen hierdoor gebruikt worden om evolutie aan te tonen. [7,37,44] Bij partiële gen sequentieanalyse van het 16S rRNA gaat men enkel de 5' regio van het gen aflezen, aangezien zich daar de belangrijkste mate van variabiliteit bevindt. Deze methode is sneller en goedkoper dan volledige gen sequentieanalyse doch echter minder betrouwbaar. [37,40] Sequentieanalyse van 16S rRNA alleen kan niet routinematig gebruikt worden voor identificatie van viridans groep streptokokken (VGS) omwille van zijn onvermogen om een onderscheid te maken tussen sommige zeer verwante *Streptococcus salivarius* groep isolaten en *Streptococcus mitis* groep isolaten. Zo kan de 16S rRNA sequentie van *Streptococcus mitis* tot 99,9% identiek zijn aan de sequentie van *Streptococcus oralis*. Bovendien bestaat er ook geen universele cutoff waarde voor de afbakening van species identificatie. [37]

Ook de sodA gensequente analyse bij de moleculaire diagnose van VGS is veelvuldig onderzocht geweest. Met behulp van sodA gen sequentieanalyse kunnen ongeveer 95% van de viridans streptokokken correct tot op species

niveau worden geïdentificeerd. Een belangrijke tekortkoming is hier ook het onvermogen om te differentiëren tussen sterk verwante *Streptococcus mitis* isolaten. Zo kan sodA gen sequentieanalyse geen eenduidig onderscheid maken tussen *S. oralis* en *S. mitis* enerzijds en *S. australis* en *S. infantis* anderzijds. [37,38]

De gyrB sequentieanalyse is wel in staat om de nauw verwante *S. mitis* en *S. oralis* species van elkaar te onderscheiden. Discriminatie tussen *S. mitis* enerzijds en *S. pneumoniae* of *S. pseudopneumoniae* anderzijds is via deze methode echter niet mogelijk. [36,37]

De VGS bestaan uit een zeer diverse populatie kiemen die onderling genetisch materiaal kunnen uitwisselen via onder andere homologe recombinatie en horizontale gentransfer met grote intra- en interspecies variabiliteit tot gevolg. Dit beperkt de diagnostische accuraatheid van enkelvoudige gen sequentieanalyses. Voor de moleculaire identificatie van VGS is men dus genoodzaakt om gebruik te maken van MLSA. Bij deze techniek worden gen sequenties van 7 verschillende fragmenten huishoudgenen samen afgelezen en vergeleken met een databank (Viridans.eMLSA.net), wat een correcte fylogenetische identificatie tot op species niveau mogelijk maakt. Gezien de hoge kostprijs en de arbeidsintensiviteit van deze methode wordt MLSA enkel in de onderzoek setting gebruik. [37-39,41]

2.3 MALDI-TOF

2.3.1 Inleiding MALDI-TOF

MALDI-TOF MS (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation Time-of-Flight Mass Spectrometry) wordt momenteel in de meeste laboratoria gebruikt als de standaardmethode voor routine identificatie van micro-organismen. Hierbij wordt het te identificeren micro-organisme aangebracht op een geleidend metalen plaatje en ingebed in een overmaat aan matrixverbinding (HCCA of α -cyano-4-hydroxycinnamic acid) waardoor de proteïnen van het aanwezige micro-organisme worden gekristalliseerd. In de massaspectrometer wordt dit monster beschoten met een laser, wat tot desorptie, fragmentatie en ionisatie van het te onderzoeken micro-organisme leidt. De geïoniseerde moleculen worden vervolgens versneld in een elektromagnetisch veld waarna ze terecht komen in de vluchttube. In deze vacuümbuis worden de moleculen gescheiden op basis van hun massa/lading verhouding, waarbij de kleine moleculen de detector sneller zullen bereiken dan grote. Het bekomen signaal voor elke massa/lading verhouding is proportioneel aan het aantal gedetecteerde ionen. Het resultaat is een massaspectrum van het te identificeren micro-organisme. Dit massaspectrum wordt voornamelijk gevormd door de aanwezige structurele eiwitten en het ribosomaal RNA van het micro-organisme. MALDI-TOF MS is dus een fenotypische identificatiemethode. Het bekomen massaspectrum wordt vervolgens vergeleken met alle referentiespectra aanwezig in de databank. Op basis van overeenkomst wordt dan met een zekere waarschijnlijkheid (scoresysteem) een identiteit toegewezen aan het micro-organismen. Hoe groter de overeenkomst tussen de massaspectra van het isolaat en deze van de referentiestammen, hoe hoger de score. [8] De introductie van MALDI-TOF MS in het bacteriologisch laboratorium heeft tot een ware revolutie geleid. Identificatie van bacteriën via conventionele fenotypische methodes is immers tijdrovend (TAT vaak 24u-72u) en kostelijk. [9] Momenteel zijn er twee commerciële MALDI-TOF MS systemen beschikbaar op de Belgische markt: de MALDI Biotyper (Bruker) en de VITEK MS (BioMérieux).

Het is belangrijk om bij deze literatuurstudie naar de diagnostische accuraatheid van MALDI-TOF MS voor VGS enkele algemene bemerkingen te maken:

- Het ontbreken van een gouden standaard methode voor de routine identificatie van VGS maakt het moeilijk om studies onderling te vergelijken. De diagnostische accuraatheid van de MALDI-TOF MS wordt immers uitgedrukt ten opzichte van verschillende referentiemethodes. De meest gekozen referentiemethode is bovendien de 16S rRNA gen sequentieanalyse (ondanks de hogerop beschreven tekortkomingen van deze techniek).
- De referentiedatabanken en de driversoftware van de toestellen worden regelmatig geüpdatet. Deze nieuwere versies bevatten steeds meer referentiespectra en zijn dus in staat om steeds meer isolaten correct te identificeren.
- De recente wijzigingen in de taxonomische indeling van de viridans streptokokken hebben ertoe geleid dat er ook verschillen bestaan op vlak van naamgeving en groepstoewijzing van isolaten in de onderzochte literatuur.
- Verschillen in testomgeving (bv. samenstelling van de gebruikte voedingsbodems, gebruikte matrixoplossing, leeftijd van de culturen, ervaring van de laboratoriumtechnoloog) dragen tevens onvermijdelijk bij tot variabiliteit.
- Een bijkomend probleem is het rapporteren van 'slashline species' waarbij de identificatie van een micro-organisme wordt uitgedrukt als behorende tot twee of meerdere species. Het meest voorkomende 'slashline species' bij de VGS is *S. mitis/oralis*. Dit wordt enkel bij het VITEK MS systeem op deze manier gerapporteerd.

- Gezien we in UZ Leuven werken met de MALDI Biotyper (Bruker) is deze literatuurstudie vooral gericht op dit MALDI-TOF MS systeem. De diagnostische accuraatheid van de VITEK MS wordt hieronder enkel besproken aan de hand van artikels die de twee systemen onderling vergeleken.

De Engelstalige literatuur omtrent de diagnostische accuraatheid van de MALDI-TOF MS identificatie van viridans streptokokken is eerder beperkt. Dit deel van de literatuurstudie is hoofdzakelijk gebaseerd op 7 studies waarvan de resultaten zijn samengevat in tabel 4-10. [20,36,39,40,44-47] De diagnostische accuraatheid van het MALDI-TOF MS systeem (MALDI Biotyper of VITEK MS) wordt hier steeds uitgedrukt onder de vorm van % overeenkomst ten opzichte van de beschreven referentiemethode, en dit zowel op species als op groep niveau. Zoals in het eerste deel van deze CAT worden de resultaten per groep besproken en geïnterpreteerd.

2.3.2 MALDI-TOF identificatie van *Streptococcus anginosus* groep

De resultaten met betrekking tot de diagnostische accuraatheid van de MALDI-TOF MS voor species van de *S. anginosus* groep staan samengevat in tabel 4a (MALDI Biotyper) en in tabel 4b (Vitek MS). Beide MALDI-TOF systemen zijn in staat om in 100% van de gevallen de species van de SAG correct te identificeren tot op groep niveau. De diagnostische accuraatheid van MALDI-TOF MS voor SAG isolaten op species niveau bedraagt respectievelijk 90.3% (MALDI-Biotyper) en 96.7% (VITEK MS).

Tabel 4a: Identificatie *S. anginosus* isolaten op species en groep niveau, MALDI Biotyper (Bruker)

Studie (jaar publicatie) [databank]	Referentiemethode (gen sequentieanalyse)	n (124)	species	% correcte identificatie	
				species	groep
López Roa, P (maart 2012) [<BDAL-5627*]	sodA gen	30	<i>S. anginosus</i> , <i>S. constellatus</i>	83,3	100
Davies, AP (september 2012) [<BDAL-5627*]	16S rRNA gen	2	<i>S. anginosus</i>	100	100
Kärpänoja, P (november 2013) [<BDAL-5627*]	16S rRNA	18	<i>S. anginosus</i> , <i>S. constellatus</i> , <i>S. intermedius</i>	77,8	100
Isaksson, J (december 2014) [BDAL-5627]	rpnB gen	7	<i>S. anginosus</i> , <i>S. constellatus</i> , <i>S. intermedius</i>	100	100
Angeletti, S (maart 2015) [BDAL-5627]	rpoB gen	15	<i>S. anginosus</i> , <i>S. constellatus</i> , <i>S. intermedius</i>	80	100
Zhou, M (augustus 2016) [BDAL-5989]	gyrB gen + 16S rRNA gen	52	<i>S. anginosus</i> , <i>S. constellatus</i> , <i>S. intermedius</i>	100	100
gemiddelde				90,3	100

* versie voor BDAL-5627, referentiedatabank niet beschreven

Tabel 4b: Identificatie *S. anginosus* isolaten op species en groep niveau, VITEK MS (BioMérieux)

Studie (jaar publicatie) [databank]	Referentiemethode (gen sequentieanalyse)	n (92)	species	% correcte identificatie	
				species	groep
Kärpänoja, P (november 2013) [VITEK MS Plus]	16S rRNA	18	<i>S. anginosus</i> , <i>S. constellatus</i> , <i>S. intermedius</i>	100	100
Isaksson, J (december 2014) [VITEK MS IVD V2]	rpnB gen	7	<i>S. anginosus</i> , <i>S. constellatus</i> , <i>S. intermedius</i>	100	100
Angeletti, S (maart 2015) [VITEK MS IVD V2]	rpoB gen	15	<i>S. anginosus</i> , <i>S. constellatus</i> , <i>S. intermedius</i>	80	100
Zhou, M (augustus 2016) [VITEK MS Plus]	gyrB gen + 16S rRNA gen	52	<i>S. anginosus</i> , <i>S. constellatus</i> , <i>S. intermedius</i>	100	100
gemiddelde				96,7	100

Zowel Kärpänoja et al. als Angeletti et al. rapporteren problemen bij de identificatie van *S. intermedius* op species niveau. Dit valt te verklaren doordat er in de toenmalige databanken van de MALDI Biotyper (Bruker databank BDAL-5627 of eerdere versies) en de VITEK MS (VITEK MS IVD V2) slechts een beperkt aantal referentiespectra van *S. intermedius* vervat zaten. Na een update van beide databanken (naar respectievelijk BDAL-5989 voor de Bruker Biotyper en naar VITEK MS Plus voor VITEK MS) werd correcte identificatie tot op species niveau wel mogelijk. [36]

2.3.3 MALDI-TOF identificatie van *Streptococcus salivarius* groep

De resultaten met betrekking tot de diagnostische accuraatheid van de MALDI-TOF MS voor species van de *S. salivarius* groep werden samengevat in tabel 5a (MALDI Biotyper) en in tabel 5b (Vitek MS).

Zowel MALDI Biotyper als Vitek MS zijn in staat om in 100% van de gevallen de species van de SSG correct te identificeren tot op groep niveau. De diagnostische accuraatheid van MALDI-TOF MS voor SSG isolaten op species niveau bedraagt respectievelijk 70.6% (MALDI-Biotyper) en 57.1% (VITEK MS). Deze percentages dienen met enige voorzichtigheid te worden geïnterpreteerd gezien slechts een zeer beperkt aantal isolaten van deze groep in de studies werden geïncludeerd. Voor de identificatie van *S. vestibularis* geldt dezelfde bemerking als voor *S. intermedius* hierboven (correcte species identificatie slechts mogelijk na uitbereiding van de referentiedatabank).

Tabel 5a: Identificatie *S. salivarius* isolaten op species en groep niveau, MALDI Biotyper (Bruker)

Studie (jaar publicatie) [databank]	Referentiemethode (gen sequentieanalyse)	n (17)	species	% correcte identificatie species	% correcte identificatie groep
López Roa, P (maart 2012) [<BDAL-5627*]	sodA gen	9	<i>S. salivarius</i> , <i>S. vestibularis</i>	77,8	77,8
Davies, AP (september 2012) [<BDAL-5627*]	16S rRNA gen	1	<i>S. salivarius</i>	100	100
Angeletti, S (maart 2015) [BDAL-5627]	rpoB gen	5	<i>S. salivarius</i> , <i>S. vestibularis</i> , <i>S. thermophilus</i>	40	100
Zhou, M (augustus 2016) [BDAL-5989]	gyrB gen + 16S rRNA gen	2	<i>S. salivarius</i>	100	100
gemiddelde				70,6	88,2

* versie voor BDAL-5627, referentiedatabank niet beschreven

Tabel 5b: Identificatie *S. salivarius* isolaten op species en groep niveau, VITEK MS (BioMérieux)

Studie (jaar publicatie) [databank]	Referentiemethode (gen sequentieanalyse)	n (7)	species	% correcte identificatie species	% correcte identificatie groep
Angeletti, S (maart 2015) [VITEK MS IVD V2]	rpoB gen	5	<i>S. salivarius</i> , <i>S. vestibularis</i> , <i>S. thermophilus</i>	40	100
Zhou, M (augustus 2016) [VITEK MS Plus]	gyrB gen + 16S rRNA gen	2	<i>S. salivarius</i>	100	100
gemiddelde				57,1	100

2.3.4 MALDI-TOF identificatie van *Streptococcus mutans* groep

De resultaten met betrekking tot de diagnostische accuraatheid van de MALDI-TOF MS voor species van de *S. mutans* groep zijn samengevat in tabel 6a (MALDI Biotyper) en in tabel 6b (Vitek MS).

Gegevens met betrekking tot MALDI-TOF MS identificatie van isolaten uit *S. mutans* groep zijn quasi onbestaande. Op basis van onderstaande zeer beperkte resultaten kunnen we veronderstellen dat *S. mutans* met beide systemen correct kan worden geïdentificeerd tot species niveau. De overige species van de *S. mutans* groep die sporadisch aanleiding kunnen geven tot humane infecties (*S. sobrinus*, *S. downei*, *S. criceti* en *S. rattii*) zijn allen opgenomen in onze Bruker databank (BDAL-7311) en zouden in theorie dus geïdentificeerd moeten kunnen worden. Bruker zelf meldt geen problemen voor de MALDI-TOF identificatie van deze *S. mutans* species. [48,49]

Tabel 6a: Identificatie *S. mutans* isolaten op species en groep niveau, MALDI Biotyper (Bruker)

Studie (jaar publicatie) [databank]	Referentiemethode (gen sequentieanalyse)	n (7)	species	% correcte identificatie species	% correcte identificatie groep
López Roa, P (maart 2012) [<BDAL-5627*]	sodA gen	1	<i>S. mutans</i>	100	100
Davies, AP (september 2012) [<BDAL-5627*]	16S rRNA gen	1	<i>S. mutans</i>	100	100
Isaksson, J (december 2014) [BDAL-5627]	rpnB gen	4	<i>S. mutans</i>	100	100
Angeletti, S (maart 2015) [BDAL-5627]	rpoB gen	1	<i>S. mutans</i>	100	100
gemiddelde				100,0	100,0

Tabel 6b: Identificatie *S. mutans* isolaten op species en groep niveau, VITEK MS (BioMérieux)

Studie (jaar publicatie) [databank]	Referentiemethode (gen sequentieanalyse)	n (5)	species	% correcte identificatie	
				species	groep
Isaksson, J (december 2014) [VITEK MS IVD V2]	rpnB gen	4	<i>S. mutans</i>	100	100
Angeletti, S (maart 2015) [VITEK MS IVD V2]	rpoB gen	1	<i>S. mutans</i>	100	100
gemiddelde				100,0	100

2.3.5 MALDI-TOF identificatie van *Streptococcus bovis* groep

De resultaten met betrekking tot de diagnostische accuraatheid van de MALDI-TOF MS voor species van de *S. bovis* groep zijn samengevat in tabel 7a (MALDI Biotyper) en in tabel 7b (Vitek MS). In tegenstelling tot de andere groepen viridans Streptokokken wordt hier tevens het % overeenkomst op subspecies niveau vermeld omwille van de historische associatie van *S. gallolyticus ssp. gallolyticus* met infectieuze endocarditis en colorectale maligniteiten. Beide MALDI-TOF systemen zijn in staat om in 100% van de gevallen de species van de SBG correct te identificeren tot op groep niveau. De diagnostische accuraatheid van MALDI-TOF MS voor SBG isolaten op species niveau bedraagt respectievelijk 86.0% (MALDI Biotyper) en 90.2% (VITEK MS).

Tabel 7a: Identificatie *S. bovis* isolaten op subspecies, species en groep niveau, MALDI Biotyper (Bruker)

Studie (jaar publicatie) [databank]	Referentiemethode (gen sequentieanalyse)	n (89)	species	% correcte identificatie		
				subspecies	species	groep
López Roa, P (maart 2012) [<BDAL-5627*]	sodA gen	27	<i>S. equinus</i> , <i>S. gallolyticus ssp. gallolyticus</i> , <i>S. gallolyticus ssp. pasteurianus</i> , <i>S. infantarius ssp. coli</i> , <i>S. infantarius ssp. infantarius</i>	66,7	66,7	100
Davies, AP (september 2012) [<BDAL-5627*]	16S rRNA gen	2	<i>S. infantarius ssp. coli</i>	100	100	100
Kärpänöja, P (november 2013) [<BDAL-5627*]	16S rRNA gen	3	<i>S. gallolyticus ssp. gallolyticus</i> , <i>S. gallolyticus ssp. pasteurianus</i>	100	100	100
Angeletti, S (maart 2015) [BDAL-5627]	rpoB gen	13	<i>S. gallolyticus ssp. gallolyticus</i> , <i>S. gallolyticus ssp. pasteurianus</i> , <i>S. infantarius ssp. coli</i>	61,5	100	100
Zhou, M (augustus 2016) [BDAL-5989]	gyrB gen + 16S rRNA gen	8	<i>S. gallolyticus</i> , <i>S. infantarius ssp. coli</i>	100	100	100
Ben-Chetrit, E (oktober 2016) [BDAL-5989]	16 S rRNA gen	36	<i>S. gallolyticus ssp. gallolyticus</i> , <i>S. gallolyticus ssp. pasteurianus</i> , <i>S. gallolyticus ssp. macedonicus</i> , <i>S. infantarius ssp. coli</i>	83.3	100	100
gemiddelde				77.5	86.0	100

* versie voor BDAL-5627, exacte versie niet expliciet vermeld

De slechte score op subspecies en species niveau van de MALDI Biotyper bij López Roa P et al. is het gevolg van het foutief rapporteren van 9 *S. equinus* species als *S. gallolyticus ssp. pasteurianus*. De slechte score op subspecies niveau bij Angeletti S et al. is te wijten aan het feit dat de MALDI Biotyper slechts 1 van de 6 *S. gallolyticus ssp. gallolyticus* isolaten correct heeft kunnen identificeren en is vermoedelijk te verklaren doordat de BDAL-5627 databank slechts één *S. gallolyticus ssp. gallolyticus* referentiespectrum bevat. Bij Ben-Chetrit E. et al is de slechte subspecies score te wijten aan het onvermogen van de MALDI-Biotyper om *S. gallolyticus ssp. macedonicus* correct te identificeren op subspecies niveau.

Bij de identificatie van *S. bovis* groep isolaten via MALDI Biotyper geeft Bruker de waarschuwing dat deze species moeilijk van elkaar te onderscheiden zijn omdat ze zeer gelijkaardige spectra hebben. [39,49] Dit probleem wordt inderdaad vermeld bij studies die gebruik maken van oudere versies van de referentiedatabank (voor BDAL-5627) zoals bij López Roa P et al. [45]

Tabel 7b: Identificatie *S. bovis* isolaten op subspecies, species en groep niveau, VITEK MS (BioMérieux)

Studie (jaar publicatie) [databank]	Referentiemethode (gen sequentieanalyse)	n (66)	species	% correcte identificatie		
				subspecies	species	groep
Kärpänoja, P (november 2013) [VITEK MS Plus]	16S rRNA gen	3	<i>S. gallolyticus</i> ssp. <i>gallolyticus</i> , <i>S. gallolyticus</i> ssp. <i>pasteurianus</i>	66.7	66.7	100
Isaksson, J (december 2014) [VITEK MS IVD V2]	rpnB gen	7	<i>S. gallolyticus</i> ssp. <i>gallolyticus</i> , <i>S. gallolyticus</i> ssp. <i>pasteurianus</i>	100	100	100
Angeletti, S (maart 2015) [VITEK MS IVD V2]	rpoB gen	13	<i>S. gallolyticus</i> ssp. <i>gallolyticus</i> , <i>S. gallolyticus</i> ssp. <i>pasteurianus</i> , <i>S. infantarius</i> ssp. <i>coli</i>	100	100	100
Zhou, M (augustus 2016) [VITEK MS Plus]	gyrB gen + 16S rRNA gen	8	<i>S. gallolyticus</i> , <i>S. infantarius</i> ssp. <i>coli</i>	87.5	87.5	100
Ben-Cherit, E (oktober 2016) [VITEK MS IVD*]	16 S rRNA gen	35	<i>S. gallolyticus</i> ssp. <i>gallolyticus</i> , <i>S. gallolyticus</i> ssp. <i>pasteurianus</i> , <i>S. infantarius</i> ssp. <i>coli</i>	86.8	100	100
gemiddelde				84.5	90.2	100

* versie databank niet expliciet vermeld

De slechte score op subspecies en species niveau bij Kärpänoja P. et al is het te wijten aan het onvermogen van de VITEK MS om één *S. gallolyticus* ssp. *pasteurianus* correct te identificeren. De matige score bij Zhou M et al. is het gevolg van het niet kunnen identificeren van 1 van de 6 *S. gallolyticus* isolaten met behulp van VITEK MS.

2.3.6 MALDI-TOF identificatie van *Streptococcus mitis* groep

Bij deze beoordeling van de diagnostische accuraatheid van MALDI-TOF MS met betrekking tot de *Streptococcus mitis* groep isolaten dienen volgende kanttekeningen te worden gemaakt:

- De resultaten van de MALDI-TOF identificatie van de voormalige *S. sanguinis* groep species staan hieronder tevens apart opgesomd gezien de meeste studies deze nog als aparte entiteit hebben beschreven.
- Op basis van de gekozen referentiemethode is er vaak geen eenduidig onderscheid mogelijk tussen de verschillende species van de SMG. Isolaten die via de referentiemethode niet tot op species niveau konden geïdentificeerd worden, zijn geëxcludeerd.
- Niet alle SMG isolaten zijn opgenomen in de oudere referentiedatabanken. Species die niet in de gebruikte bibliotheek aanwezig zijn, kunnen per definitie niet correct geïdentificeerd worden, en zijn tevens geëxcludeerd.
- Bij onderzoek naar de diagnostische accuraatheid van VITEK MS is tevens 'slashline species' *Streptococcus mitis/oralis* geëxcludeerd.
- Onderstaande resultaten zijn berekend op basis van het aantal correct geïdentificeerde niet-pneumokokken SMG species.

De resultaten met betrekking tot de diagnostische accuraatheid van de MALDI-TOF MS voor species van de *S. mitis* groep staan samengevat in tabellen 8a, 8b en 9 (MALDI Biopyter) en in tabellen 8c, 8d en 9 (Vitek MS).

Tabel 8a: Identificatie *S. mitis* isolaten (zonder voormalige *S. sanguinis* groep en *S. pneumoniae*) op species en groep niveau, MALDI Biotyper (Bruker)

Studie (jaar publicatie) [databank]	Referentiemethode (gen sequentieanalyse)	n (170)	species	% correcte identificatie	
				species	groep
López Roa, P (maart 2012) [<BDAL-5627*]	sodA gen	38	<i>S. mitis</i> , <i>S. oralis</i> , <i>S. cristatus</i> , <i>S. infantis</i>	55,2	92,1
Davies, AP (september 2012) [<BDAL-5627*]	16S rRNA gen	28	<i>S. mitis</i> , <i>S. oralis</i> , <i>S. infantis</i>	14,3	64,3
Kärpänoja, P (november 2013) [<BDAL-5627*]	16S rRNA gen	5	<i>S. mitis</i> , <i>S. oralis</i>	0	100
Isaksson, J (december 2014) [BDAL-5627]	rpnB gen	4	<i>S. australis</i> , <i>S. cristatus</i>	100	100
Angeletti, S (maart 2015) [BDAL-5627]	rpoB gen	73	<i>S. pseudopneumoniae</i> , <i>S. mitis</i> , <i>S. oralis</i> , <i>S. australis</i> , <i>S. cristatus</i> , <i>S. infantis</i>	50,7	100
Zhou, M (augustus 2016) [BDAL-5989]	gyrB gen + 16S rRNA gen	22	<i>S. pseudopneumoniae</i> , <i>S. mitis</i> , <i>S. oralis</i>	4,5	100
gemiddelde				39,4	91,5

* versie voor BDAL-5627, exacte versie niet expliciet vermeld

De slechte score voor identificatie op species niveau bij López Roa P et al. is het gevolg van het foutief rapporteren van 6 *S. mitis* isolaten en 8 *S. oralis* isolaten als *S. pneumoniae*, naast het onvermogen van de MALDI Biotyper om 2 isolaten te identificeren. De slechte score bij Davies AP et al. is het gevolg van het foutief rapporteren van alle 20 *S. mitis* isolaten, waarvan 13 als *S. oralis* en 7 als *S. pneumoniae*, naast het foutief rapporteren van het grootste deel van de *S. oralis* isolaten. Ook bij Kärpänoja P et al. is de slechte score te wijten aan het foutief rapporteren van *S. mitis* en *S. oralis* als *S. pneumoniae*. De matige score bij Angeletti S et al. is te wijten aan het onvermogen van de MALDI Biotyper om alle *S. pseudopneumoniae* en *S. cristatus* isolaten te identificeren, naast misidentificatie van de helft van de *S. mitis* species als *S. pneumoniae*. Ook bij Zhou M et al. is de zeer slechte score te wijten aan misidentificatie van 21/22 species als *S. pneumoniae*.

Tabel 8b: Identificatie isolaten voormalige *S. sanguinis* groep op species en groep niveau, MALDI Biotyper (Bruker)

Studie (jaar publicatie) [databank]	Referentiemethode (gen sequentieanalyse)	n (85)	species	% correcte identificatie	
				species	groep
López Roa, P (maart 2012) [<BDAL-5627*]	sodA gen	19	<i>S. sanguinis</i> , <i>S. parasanguinis</i> , <i>S. gordonii</i>	100	100
Davies, AP (september 2012) [<BDAL-5627*]	16S rRNA gen	11	<i>S. sanguinis</i> , <i>S. parasanguinis</i> , <i>S. gordonii</i>	90,9	90,9
Kärpänoja, P (november 2013) [<BDAL-5627*]	16S rRNA gen	10	<i>S. gordonii</i> , <i>S. sanguinis</i>	100	100
Isaksson, J (december 2014) [BDAL-5627]	rpnB gen	18	<i>S. sanguinis</i> , <i>S. parasanguinis</i> , <i>S. gordonii</i>	100	100
Angeletti, S (maart 2015) [BDAL-5627]	rpoB gen	15	<i>S. sanguinis</i> , <i>S. parasanguinis</i> , <i>S. gordonii</i>	93,3	100
Zhou, M (augustus 2016) [BDAL-5989]	gyrB gen + 16S rRNA gen	12	<i>S. gordonii</i> , <i>S. sanguinis</i>	100	100
gemiddelde				97,6	98,8

* versie voor BDAL-5627, exacte versie niet expliciet vermeld

De diagnostische accuraatheid van de MALDI Biotyper voor de voormalige *S. sanguinis* isolaten is wel zeer goed met een score van 97,6% correcte identificatie op species niveau en 98,8% op groep niveau. Enkel voor *S. parasanguinis* is identificatie tot op species niveau geen 100% betrouwbaar.

Tabel 8c: Identificatie *S. mitis* isolaten (zonder voormalige *S. sanguinis* groep, *S. pneumoniae* en 'slashline species' *S. mitis/oralis*) op species en groep niveau, VITEK MS (BioMérieux)

Studie (jaar publicatie) [databank]	Referentiemethode (gen sequentieanalyse)	n (35)	species	% correcte identificatie	
				species	groep
Isaksson, J (december 2014) [VITEK MS IVD V2]	rpnB gen	2	<i>S. cristatus</i>	100	100
Angeletti, S (maart 2015) [VITEK MS IVD V2]	rpoB gen	24	<i>S. cristatus</i> , <i>S. pseudopneumoniae</i> , <i>S. infantis</i>	8,3	100
Zhou, M (augustus 2016) [VITEK MS Plus]	gyrB gen + 16S rRNA gen	9	<i>S. pseudopneumoniae</i>	88.9	100
gemiddelde				34.3	100

De slechte score voor identificatie op species niveau bij Angeletti S et al. is voornamelijk het gevolg van foutieve identificatie van 15/17 *S. pseudopneumoniae* isolaten als *S. mitis/oralis*, naast het onvermogen van VITEK MS om de *S. cristatus* en *S. infantis* isolaten te identificeren.

Tabel 8d: Identificatie isolaten voormalige *S. sanguinis* groep op species en groep niveau, VITEK MS (BioMérieux)

Studie (jaar publicatie) [databank]	Referentiemethode (gen sequentieanalyse)	n (55)	species	% correcte identificatie	
				species	groep
Kärpänöja, P (november 2013) [VITEK MS Plus]	16S rRNA gen	10	<i>S. gordonii</i> , <i>S. sanguinis</i>	100	100
Isaksson, J (december 2014) [VITEK MS IVD V2]	rpnB gen	18	<i>S. sanguinis</i> , <i>S. parasanguinis</i> , <i>S. gordonii</i>	100	100
Angeletti, S (maart 2015) [VITEK MS IVD V2]	rpoB gen	15	<i>S. sanguinis</i> , <i>S. parasanguinis</i> , <i>S. gordonii</i>	100	100
Zhou, M (augustus 2016) [VITEK MS Plus]	gyrB gen + 16S rRNA gen	12	<i>S. gordonii</i> , <i>S. sanguinis</i>	100	100
gemiddelde				100,0	100

In deze literatuurstudie worden er geen problemen gemeld met betrekking tot de identificatie van de voormalige *S. sanguinis* groep isolaten door VITEK MS.

Tabel 9: Vergelijking MALDI Biotyper (Bruker) versus VITEK MS (BioMérieux) voor identificatie *S. mitis* groep isolaten (zonder *S. pneumoniae*) op species en groep niveau

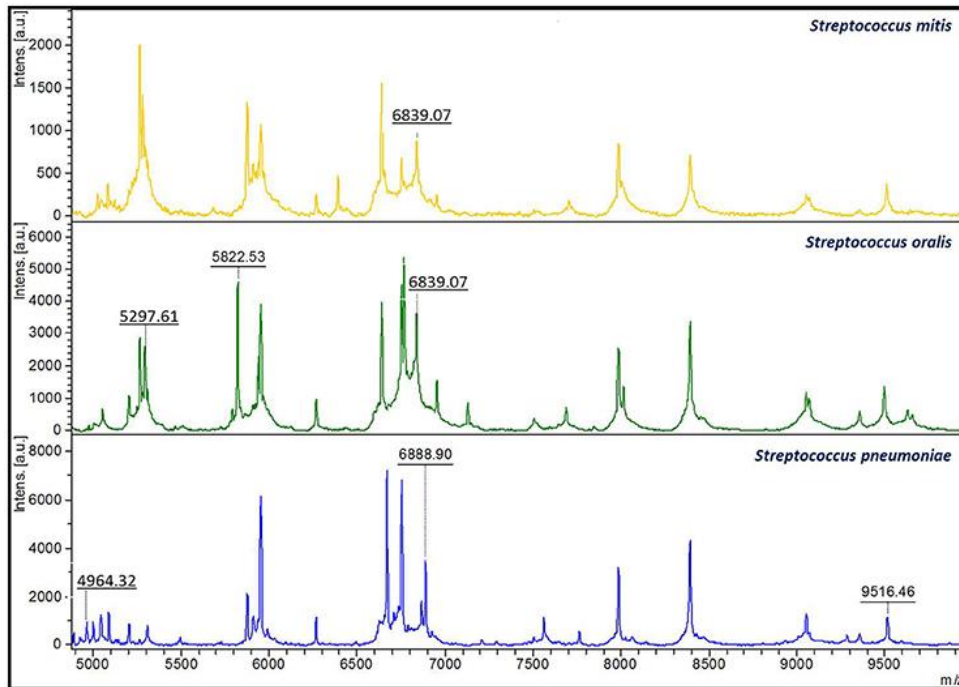
methode (firma)	n	% correcte identificatie	
		species	groep
MALDI Biotyper (Bruker)	255	58.8	98.5
VITEK MS (BioMérieux)	80	83.7	100

In totaal bedraagt de diagnostische accuraatheid van MALDI Biotyper en VITEK MS voor SMG isolaten op species niveau respectievelijk 58.8% en 83.7%. De slechte score van de MALDI Biotyper is voornamelijk het gevolg van het foutief rapporteren van *S. mitis* en *S. oralis* als *S. pneumoniae*.

Het foutief rapporteren van *S. mitis/S. oralis* isolaten als *S. pneumoniae* door de MALDI Biotyper is een welomschreven probleem en een gevolg van hun zeer gelijkaardige massaspectra (figuur 1). [41-43] In UZ Leuven wordt dit probleem omzeilt door van elk isolaat dat door MALDI-TOF als *S. pneumoniae* geïdentificeerd wordt, de optochine gevoeligheid na te gaan op een bloedagar na incubatie in 5% CO₂.

Figuur 1: Massaspectra van de nauwverwante *S. mitis*, *S. oralis* en *S. pneumoniae*

afbeelding overgenomen uit "Accurate differentiation of *Streptococcus pneumoniae* from other species within the *Streptococcus mitis* group by peak analysis using MALDI-TOF MS", by Marin M et al., 2017, Front Microbiol, 8, p. 5.



Grafische voorstelling van de massaspectra van *S. mitis*, *S. oralis* en *S. pneumoniae*. De 6839,07 m/z piek is zowel terug te vinden bij *S. mitis* als bij *S. oralis*, maar niet bij *S. pneumoniae*. Het massaspectrum van *S. oralis* vertoont bovendien nog 2 kleine specifieke pieken, nl. op 5822,53 m/z en op 5297,61 m/z. De pieken op 4964,32 m/z, 6888,90 m/z en 9516,46 m/z zijn daarentegen uniek voor *S. pneumoniae*.

Om dit probleem op te lossen heeft Bruker haar databank de laatste jaren verder uitgebreid. Een recente studie door Harju I et al. toont aan dat de 5627 massaspectra bevattende databank (BDAL-5627), 99% van de SMG isolaten correct gedifferentieerd kunnen worden van *S. pneumoniae*. Na toepassen van een algoritme (figuur 2) waarbij men een numerieke waarde toekent aan de eerste 10 isolaten op de ranglijst is het volgens deze studie zelfs perfect mogelijk om alle SMG correct van *S. pneumoniae* te onderscheiden. [42] Deze methode is echter vrij omslachtig en daarom niet meteen toepasbaar in de routine praktijk.

Figuur 2: Algoritme voor correcte differentiatie tussen de nauwverwante *S. mitis*, *S. oralis* en *S. pneumoniae* afbeelding overgenomen uit "Improved differentiation of *Streptococcus pneumoniae* and other *S. mitis* group Streptococci by MALDI Biotyper using an improved MALDI Biotyper database content and a novel result interpretation algorithm", by Harju I et al., 2017, J Clin Microbiol, 55(3), p.919.

log(score)										
strain # xyz	Ranking List Position									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<i>S.pneumoniae</i>	2.42	2.36	2.36	2.36		2.32		2.30		2.28
<i>S.mitis</i>					2.35				2.30	
<i>S.oralis</i>							2.32			

"weighted log(score)"											
strain # xyz	Ranking List Position x Multiplier										list(score)
	1 x 10	2 x 9	3 x 8	4 x 7	5 x 6	6 x 5	7 x 4	8 x 3	9 x 2	10 x 1	
<i>S.pneumoniae</i>	24.2	21.2	18.9	16.5		11.6		6.9		2.3	101.6
<i>S.mitis</i>					14.1				4.6		18.7
<i>S.oralis</i>							9.3				9.3

Spn	Smi	Sor	Ssp.
101.6	18.7	9.3	

Het algoritme is gebaseerd op de lijstscore. In een eerste sta wordt elke log (score) van de eerste 10 posities van de ranglijst vermenigvuldigd met een factor (1-10). Voor de eerste positie is dit factor 10, voor de tweede positie factor 9, ... en voor de 10^e positie factor 1. In een tweede stap wordt de lijst score voor elke afzonderlijke soort berekend op basis van het totaal van de gewogen log (scores). In dit voorbeeld wordt de hoogste lijstscore, 101,6, waargenomen voor *S. pneumoniae*.

Márin M et al. tonen aan dat met behulp van een 6903 massaspectra bevattende databank een 100% correcte differentiatie tussen *S. pneumoniae* en andere *S. mitis* groep isolaten mogelijk is met MALDI Biotyper. [43] Indien

deze positieve resultaten bevestigd worden, zou het in de toekomst dus niet langer nodig zijn om van alle *S. pneumoniae* isolaten de optochine gevoeligheid na te gaan.

2.4 Besluit en antwoord op vraagstelling

Op basis van bovenstaande literatuurstudie kunnen we stellen dat met behulp van de MALDI-Biotyper 72.7% van de VGS correct tot op species niveau geïdentificeerd kunnen worden (tabel 10a). Correcte identificatie tot op groep niveau is mogelijk in 98,8% en na voorbereiding van de Bruker databank tot minstens 6903 referentie massaspectra, zelfs in 100% van de gevallen. [43]

Tabel 10a: Identificatie VGS met MALDI Biotyper (Bruker)

groep	n (475)	% correcte identificatie	
		species	groep
<i>S. bovis</i> groep	89	86,0	100
<i>S. anginosus</i> groep	124	90,3	100
<i>S. salivarius</i> groep	17	70,6	88,2
<i>S. mutans</i> groep	7	100	100
<i>S. mitis</i> groep*	255	58,8	98,5
gemiddelde		72,7	98,8

*zonder *S. pneumoniae*

Tabel 10b: Identificatie VGS met VITEK MS (BioMérieux)

groep	n (250)	% correcte identificatie	
		species	groep
<i>S. bovis</i> groep	66	90,2	100
<i>S. anginosus</i> groep	92	96,7	100
<i>S. salivarius</i> groep	7	57,1	100
<i>S. mutans</i> groep	5	100	100
<i>S. mitis</i> groep*	80	82,5	100
gemiddelde		89,8	100,0

* zonder *S. pneumoniae* en 'slashline species' *S. mitis/oralis*

VITEK MS is in staat om 89.8% van de VGS correct te identificeren tot op species niveau, wat opvallend beter is dan de MALDI Biotyper (tabel 10b). Dit verschil valt gedeeltelijk te verklaren door een verschil in piekanalyse. MALDI Biotyper gebruikt als referentiespectra zogenaamde consensuspectra berekend uit meerdere spectra verkregen uit één enkele stam. Deze methode vergelijkt de overeenstemmende signalen van de monsterspectra en referentiespectra waardoor een scorewaarde wordt gecreëerd en is bijgevolg gebaseerd op patroonvergelijking. VITEK MS-identificatie wordt verkregen met behulp van een algoritme voor geavanceerde spectrumclassificatie (ASC). Na de identificatie van significante pieken wordt het spectrum onderverdeeld in kleine stukjes (data binning). Elk stukje massaspectrum of bin wordt dan gewogen op basis van de frequentie dat dit binnen een bepaalde soort voorkomt in vergelijking met alle soorten in de database (d.w.z. hoe informatief is dit stukje massaspectra vanuit differentieel diagnostisch standpunt). Door dit bin-wegingsproces is VITEK MS gevoeliger om specifieke pieken te detecteren, wat zijn beter discriminerend vermogen voor sommige nauw verwante viridans streptokokken kan verklaren. [47]

Met de huidige MALDI Biotyper databank van Bruker (BDAL-7311) in UZ Leuven is probleemloze identificatie tot op groep niveau mogelijk voor de VGS. Vanuit klinisch standpunt volstaat tevens identificatie tot op groep niveau. We kunnen dus besluiten dat de MALDI-TOF MS een betrouwbare en snelle methode is voor de diagnose van klinisch relevante viridans streptokokken in het routine bacteriologisch laboratorium.

To do/ACTIONS

- 1) Aanpassen van de SOP's op bacteriologie met betrekking tot de identificatie van de VGS.
- 2) Aanpassen van de MALDI-TOF/LIS-koppeling, met automatisch toewijzen van de geïdentificeerde MALDI-TOF species tot juiste viridans groep.