

2 oktober 2002

Geachte leden,

Door de commissie kwaliteit van de NVMM is gevraagd een richtlijn “detectie van meticillineresistente *Staphylococcus aureus* in Nederland” op te stellen. De leden die dit op zich hebben genomen zijn: Arjanne van Griethuysen (secretaris), Dr. Jan Kluytmans (voorzitter), Dr. Han de Neeling, Prof. Dr. Christina Vandenbroucke-Grauls, Dr. Greet Vos (qq Cie kwaliteit), hierna te noemen de commissie MRSA.

Naar aanleiding van uw commentaar op de eerste versie van deze richtlijn zijn enkele kleine wijzigingen in de tekst aangebracht. De onderstaande tekst wordt u ter accordering in de Najaarsvergadering aangeboden.

Om de conclusies en aanbevelingen in de richtlijn richting te geven heeft de commissie gekozen voor de volgende aanduidingen:

A: Het is aangetoond dat ..

B: Het is aannemelijk dat..

C: Er zijn aanwijzingen dat..

I: de werkgroep is van mening dat u dit moet doen

II: de werkgroep is van mening dat u dit kan doen

III: de werkgroep is van mening dat u dit niet moet doen

De tekst van de richtlijn volgend na de conclusies en aanbevelingen fungeert als ondersteuning en achtergrond van de gegeven aanbevelingen.

Namens de commissie MRSA

Arjanne van Griethuysen  
Ziekenhuis Rijnstate Arnhem  
Afdeling medische microbiologie en immunologie

Postbus 9025  
6800 EG Arnhem  
[AvanGriethuysen@alysis.nl](mailto:AvanGriethuysen@alysis.nl)  
Tel:026-3788880  
Fax: 026-3787279

# Richtlijn detectie van meticillineresistente *Staphylococcus aureus* in Nederland

## Conclusies en aanbevelingen

### ➤ Doelstelling:

- het opstellen van een richtlijn voor de optimale detectie en rapportage van MRSA passend binnen het Nederlandse “search and destroy” beleid.

### ➤ Definitie MRSA:

- De aanwezigheid van het *mecA*-gen in *S. aureus*, ongeacht de hoogte van de MIC voor oxacilline. <A>

### ➤ Definitie dragerschap:

- de aanwezigheid van MRSA in één of meerdere kweken van een persoon, ongeacht de localisatie of de hoeveelheid. <A>

### ➤ Detectie dragerschap:

#### *Afname:*

- Het is niet noodzakelijk wattendragers voor afname te bevochtigen. <C-II>
- Het gebruik van een transportmedium verbetert de opbrengst in vergelijking met een droge wat. <C-II>

#### *Personeel:*

- Een éénmalig goed uitgevoerde neuskweek detecteert ongeveer 85% van alle dragers. <A-II>
- De toevoeging van een keelkweek naast een neuskweek verhoogt de gevoeligheid. <A-I>
- Ter detectie van dragerschap bij personeel worden een neus- en keelkweek gedaan. <B-I>
- Bij aanhoudende problemen van verspreiding wordt een perineumkweek toegevoegd. <B-II>
- Bij het kweken van medewerkers wordt geadviseerd om zoveel mogelijk aan het begin van de dienst de kweekafname te doen. Dit voorkomt detectie van transiënt dragerschap. <B-II>

#### *Patiënten:*

- Naast de neus-, keel- en perineumkweek worden aanvullende kweken afgenomen van sputum bij productieve hoest, tracheostoma of beademing, van urine bij aanwezigheid blaascatheter en van huidlaesies, wonden en onder gips indien aanwezig (hieronder vallen ook de insteekplaatsen van intravasale, spinale, ventriculaire, thoracale en suprapubische katheters). <B-I>

## ➤ **Kweek**

### *Media:*

- Bij een specifieke kweek op MRSA wordt een ophopingmedium toegepast. Dit verhoogt de detectiekans significant. <A-I>
- Doordat er een ophopingmedium wordt gebruikt kan met één kweekafnameset worden volstaan. <A-II>  
(NB dit i.t.t. het gestelde in de WIP richtlijn, het hier gestelde wordt overgenomen in de volgende versie van deze WIP richtlijn)
- Onderscheid wordt gemaakt tussen het opsporen van een nog onbekende stam en een bekende stam. <A-I>
- Bij een onbekende stam kan het toepassen van selectieve bestanddelen in het isolatiemedium leiden tot een verlies aan gevoeligheid. <A>
- Bij een *bekende* stam worden de media en de bewerking ervan zo nodig aangepast aan de specifieke eigenschappen van deze stam. <B-I>

### *Identificatie:*

- Voor de snelle identificatie van alle voor *S. aureus* verdachte isolaten wordt een latexagglutinatie test gebruikt die naast de detectie van clumping factor en proteïne A, tevens antistoffen tegen *S. aureus* specifieke kapselpolysacchariden of tegen groepsspecifieke celoppervlakte antigenen bevat. <A-II>
- Voor een optimale identificatie wordt naast een screening met een latexagglutinatie een confirmatie aanbevolen (bv buiscoagulase, DNase, AccuProbe culture identification test voor *S. aureus* (bioMérieux, Frankrijk) of in house PCR's voor detectie van bijvoorbeeld het coagulase gen). <A-II>

### *Gevoeligheidsbepaling:*

- Gevoeligheidsbepalingen kunnen meticillineresistentie missen doordat heteroresistente MRSA stammen een MIC hebben rond of net onder het breekpunt van gevoelig. <A>
- Voor de gevoeligheidsbepaling van *S. aureus* wordt naast een dilutie methode (agar, bouillon of geautomatiseerde methode) de oxa-1 disk of oxa-screen agar te gebruikt. <A-I>
- Wanneer oxacilline gevoelig is, maar resistentie wordt gevonden voor één van de volgende antibiotica: fluoroquinolonen, aminoglycosiden, macroliden, clindamycine of tetracycline, wordt aanbevolen de aanwezigheid van PBP2a of het *mec-A* gen uit te sluiten. <C-II>
- Elke verdenking op meticillineresistentie moet worden bevestigd danwel verworpen met testen op PBP2a of het *mecA*-gen. <I>
- Bij een aangetoonde MRSA worden tenminste de gevoeligheid voor vancomycine en mupirocine bepaald. <C-I>

*Epidemiologie:*

- Alle eerste MRSA isolaten van elk individu worden naar het RIVM gestuurd voor bevestiging en nationale surveillancedoeleinden. <I>

## 1.1 Doelstelling en achtergrond

Het formuleren van een richtlijn voor de detectie en rapportage van meticillineresistente *Staphylococcus aureus* bij mensen in Nederland, gebaseerd op literatuurgegevens. In deze richtlijn wordt gestreefd naar een “optimale” detectie, hetgeen moet worden onderscheiden van “maximaal”. Daarbij is deze richtlijn gebaseerd op het Nederlandse beleid om de incidentie van MRSA tot een minimum te beperken, ook wel Search and Destroy Strategy geheten (1). Indien deze strategie wordt veranderd kan dit ook gevolgen hebben voor de te hanteren detectiemethode en moet deze richtlijn worden herzien.

## 1.2 Definitie van MRSA

MRSA staat voor meticillineresistente *Staphylococcus aureus*. Deze resistentie berust op de aanwezigheid van het *mecA*-gen. Dit codeert voor de productie van een gemodificeerd penicillinebindend eiwit, het PBP-2a, wat een verminderde affiniteit heeft voor beta-lactam antibiotica. Dit resulteert in een ongevoeligheid voor alle beta-lactamantibiotica. Het *mecA*-gen komt wisselend tot expressie hetgeen kan resulteren in zeer hoge MIC-waarden, maar ook in MIC-waarden die rondom, en zelfs onder het afbreekpunt van gevoelig/ongevoelig liggen. Ongeacht de hoogte van de MIC, wordt de aanwezigheid van het *mecA*-gen beschouwd als de definitie van MRSA. Stammen met een verhoogde MIC berustend op een hyperproductie van beta-lactamase worden borderline *S. aureus* (BORSA) genoemd en derhalve onderscheiden van MRSA. BORSA is in tegenstelling tot MRSA vrijwel nooit multipel resistent en hebben niet de neiging om zich epidemisch te verspreiden. Het Nederlandse MRSA-beleid is niet bedoeld voor BORSA. Het is dus van belang om in het laboratorium dit onderscheid te maken.

## 1.3 Definitie van dragerschap

*S. aureus* komt als commensaal voor bij een groot deel van de algemene populatie. Bij een éénmalige screening wordt bij 30-40% van de mensen *S. aureus* gevonden. Bij vervolg in de tijd worden drie dragerschappatronen onderscheiden. Ongeveer 20% van de mensen heeft vrijwel altijd *S. aureus* bij zich (persisterende dragers), 60% heeft af en toe *S. aureus* bij zich (intermitterende dragers). Tenslotte wordt bij ongeveer 20% van de mensen vrijwel nooit *S. aureus* gevonden (niet-dragers) (2). *S. aureus* houdt zich met name op in de neusholten/vestibula. Van daaruit verspreidt hij zich over de rest van het lichaam. Als de neus lokaal effectief behandeld wordt, verdwijnt de koloniserende stam in het merendeel van de gevallen ook van de rest van het lichaam. Een belangrijke uitzondering hierop vormen personen die wonden, eczeem of andere huidlaesies hebben. Bij hen zal een lokale behandeling van de neus zelden leiden tot eradicatie.

MRSA is tot op heden een probleem van de ziekenhuispopulatie. Goed epidemiologisch inzicht over het voorkomen van MRSA in de gezonde populatie ontbreekt. Uit observaties bij patiënten en medewerkers is gebleken dat dragerschap zeer wisselend van duur kan zijn. Bij medewerkers waar MRSA wordt gevonden toont een hernieuwde kweek vaak al geen MRSA meer aan.

Daartegenover staan patiënten, veelal met onderliggend lijden, waarbij het dragerschap gedurende jaren kan voortbestaan. In een studie werd een halfwaardetijd van 40 maanden gevonden (3). Soms zijn bij deze personen in een of meerdere kweken geen MRSA aangetroffen waarna weer kweken met MRSA volgen. Het is dan niet duidelijk of de patiënt tijdelijk “MRSA-vrij” is geweest en vanuit de omgeving is gerekoloniseerd of dat de hoeveelheid MRSA tijdelijk tot onder de detectiegrens is gedaald. Beide fenomenen kunnen voorkomen.

Het bovenstaande leidt tot de volgende definitie van dragerschap:

“de aanwezigheid van MRSA in één of meerdere kweken van een persoon, ongeacht de lokalisatie of de hoeveelheid die wordt aangetroffen”.

## 2.1 Afname van kweken

Het aantonen van de aanwezigheid van MRSA kan worden onderscheiden in de toevallige bevinding en in het resultaat van een gericht onderzoek. Onder de toevallige bevinding wordt verstaan dat uit een klinisch materiaal ingestuurd voor bacteriologisch onderzoek naar het microbiologisch laboratorium, MRSA wordt geïsoleerd. Daarom dient ieder laboratorium in staat te zijn om *S. aureus* te identificeren en een adequate resistentie bepaling te verrichten. Dit wordt later toegelicht.

Daarnaast kan bij een verdenking op de aanwezigheid van MRSA een gericht onderzoek worden uitgevoerd. Hiervoor worden inventarisatiekweken afgenomen. Bij gezonde individuen, zonder huidlaesies, urinekatheters etc. is de belangrijkste plaats om *S. aureus* te isoleren de neus, meer precies het voorste gedeelte van de neusholte, vestibulum nasi geheten. Beide neusgaten worden uitgestreken met een wattendrager. De kennis omtrent dragerschap berust grotendeels op studies bij meticillinegevoelige *S. aureus* isolaten. Hiervoor geldt dat een éénmalige, goed uitgevoerde neuskweek ongeveer 85% van alle dragers herkent (4). Ongeveer 15% van de individuen draagt *S. aureus* op andere plaatsen, met name op de huid en in de keel. De toevoeging van een keelkweek verhoogt de gevoeligheid met ongeveer 12,5% en de overige 2,5% is alleen in het perineum aanwezig. Het achterwege laten van een keel- en perineumkweek vermindert dus de gevoeligheid en kan tot hernieuwde problemen leiden (5,6). De toegevoegde waarde van keel- en perineumkweek voor detectie van MRSA-dragerschap is niet exact in getal uit te drukken omdat goed onderzoek ontbreekt. Wel staat vast dat het achterwege laten van deze kweken in een aantal gevallen aantoonbaar tot problemen heeft geleid. Het lijkt aantrekkelijk om alleen de keelkweek toe te voegen omdat dit de grootste opbrengst heeft. Daarnaast is het afnemen van een perineumkweek minder eenvoudig uit te voeren en vindt een aantal mensen het gênant. Anderzijds zijn juist perineumdragers relatief vaak strooiers die de omgeving besmetten en zo tot problemen leiden. Om kosten en werklust te besparen, is het te overwegen om aan medewerkers te vragen om met één wattendrager, een kweek van zowel de neus, de keel en het perineum te maken. Is dit niet acceptabel dan kunnen de drie wattendragers ook op of in dezelfde media worden geënt zodat in het laboratorium de kosten worden beperkt. Indien een drager wordt gevonden, kan alsnog een gedifferentieerde kweek van de drie lokalisaties worden genomen om de aanwezigheid van MRSA per lokalisatie te bepalen. Bij het afnemen van kweken bij medewerkers wordt geadviseerd om deze zo mogelijk bij de aanvang van de dienst te kweken en niet na afloop. Dit omdat het merendeel van de medewerkers dat besmet wordt tijdens de dienst, spontaan de MRSA weer kwijt raakt. Dit transiënte dragerschap hoeft niet te leiden tot uitsluiting van de werkzaamheden en behandeling. Indien aan het begin van de dienst gekweekt wordt is de kans op deze bevinding veel kleiner.

Bij patiënten zijn vaak naast de neus-, keel- en perineumkweek, aanvullende kweken nodig omdat er andere plaatsen zijn waar *S. aureus* zich kan bevinden. Dit betreft: sputum bij productieve hoest, tracheostoma of beademing, urine als een blaaskatheter aanwezig is en indien aanwezig huidlaesies, wonden en onder gips (hieronder vallen ook de insteekplaatsen van intravasale, spinale, ventriculaire, thoracale en suprapubische katheters). Het aantal kweken dat moet worden afgenomen en de tussenliggende tijdsduur is een onderwerp van discussie. Helaas heeft deze voortdurende discussie nog niet geleid tot uitgebreide studies. Een onderzoek toonde dat (7) drie sets van inventarisatiekweken een optimale gevoeligheid gaf. Hierbij wordt opgemerkt dat in deze studie in het laboratorium geen gebruik werd gemaakt van een ophopingmedium wat de gevoeligheid van de kweek sterk verhoogt. Een studie vond dat het achterwege laten van een ophopingmedium in bijna 45% van de kweken met MRSA een fout-negatieve uitslag gaf (8). In een prospectieve geblindeerde studie is aangetoond dat een ophopingmedium significant meer positieve kweken oplevert en dat het aantal herkende dragers significant hoger is (9). In een studie met MSSA was het effect van meerdere afnamen min of meer gelijk aan het toevoegen van een ophopingmedium (10). De tijdsduur tussen de kweekafnamen staat ook ter discussie. Waarschijnlijk is de tijd op zich niet van het grootste belang maar het feit dat er meerdere keren afgenomen wordt. Indien dit zich ook nog over meerdere uren uitstrekt wordt de kans groter dat verschillende personen de kweken uitvoeren. Dit verlaagt de kans op foutieve kweekafname. Op dit moment is de optimale hoeveelheid kweken in relatie tot de gehanteerde laboratorium methode niet bekend. Bij gebruik van een ophopingmedium kan in principe met één afname worden volstaan.

## 2.2 Afnamemateriaal en transportcondities

Stafylokokken zijn bijzonder goed bestand tegen omgevingsinvloeden en stellen in het algemeen weinig eisen aan transport en opslagcondities. Om de detectie te optimaliseren is het van belang om een aantal aspecten in het oog te houden.

Voor de kweekafname kan gebruik worden gemaakt van steriele katoenen of dacron wattendragers. Een studie toonde dat het gebruik van katoenen wattendragers die geïmpregneerd waren met koolstof een significant hogere opbrengst had dan gewone katoenen wattendragers (11). Geïmpregneerde wattendragers hebben dan ook de voorkeur. Deze worden in het voorste gedeelte van beide neusgaten (praktisch aan te duiden als het neuspeuter gebied) enkele malen langs de wand rondgedraaid. Vaak wordt geadviseerd om de wattendragers voor afname te bevochtigen met een steriele fysiologisch zoutoplossing. Er zijn geen proefondervindelijke gegevens die dit ondersteunen uit het oogpunt van de sensitiviteit van de kweek. Nadelen zijn dat het de uitvoerbaarheid bemoeilijkt en de kans op contaminatie wordt verhoogd. Het advies is dan ook dat bevochtigen niet nodig is.

Zoals gezegd zijn stafylokokken uitstekend bestand tegen uitdroging. Derhalve zouden droge wattendragers moeten kunnen volstaan. Toch wordt geadviseerd om een transportmedium te gebruiken. In een studie bleek dat bewaren van kweken in Stuart's transportmedium bij 4<sup>0</sup>C de opbrengst verhoogde ten opzichte van direct inoculeren (11). De kweken worden opgeslagen in de koelkast of bij kamertemperatuur en worden zo mogelijk binnen 24 uur verwerkt.

Tenslotte een hygiënisch aspect. Bij het afnemen van kweken bij patiënten die besmet zijn met MRSA bestaat het risico dat de buitenkant van de kweekmedia besmet wordt. Om besmetting tijdens transport, opslag en verdere verwerking op het laboratorium te voorkomen kunnen maatregelen genomen worden. Dit kan door de kweekmaterialen van aangetoond met MRSA besmette patiënten te desinfecteren in de sluis en dan pas te transporteren of door de kweken in de sluis in een afgesloten plastic zak te verpakken en bij aankomst op het microbiologisch laboratorium te desinfecteren.

## 3.1 Laboratoriummethoden

Voor de detectie van MRSA is een onderscheid te maken tussen *algemene technieken* om in niet specifiek verdachte materialen MRSA aan te tonen en *specifieke technieken* om in materialen die specifiek op MRSA worden aangevraagd deze aan te tonen of uit te sluiten. De algemene technieken dienen in de dagelijkse routine van het laboratorium te zijn geïncorporeerd. De specifieke technieken kunnen aan de omstandigheden worden aangepast, bijvoorbeeld het inzetten van een medium met antibiotica op basis van de resistentie van een stam die op dat moment problemen veroorzaakt in het ziekenhuis.

### 3.2.1 Algemene technieken: identificatie van *S. aureus*

Wanneer kolonies die verdacht zijn voor meticillineresistente *Staphylococcus aureus* worden geïsoleerd is het essentieel eerst aan te tonen dat het ook daadwerkelijk *S. aureus* betreft. *S. aureus* kolonies op niet-selectieve media groeien meestal binnen 24 uur als vrij grote (6-8 mm in doorsnede) gladde, licht verheven kolonies. De meeste isolaten zijn gepigmenteerd, variërend van wit of creme-geel tot oranje en vertonen een hemolytische zone rond de kolonie (12). Op zoutbevattende selectieve media vormen *S. aureus* door langzamere groei vaak kleinere kolonies (13).

Allereerst wordt met behulp van een Grampreparaat (Grampositieve coccen in groepjes) en de katalase test (positief) bevestigd dat het om een Stafylokok gaat. Wanneer de koloniemorfologie zeer verdacht is voor *S. aureus* wordt deze stap meestal overgeslagen. Het is goed zich te realiseren dat hierdoor fouten kunnen optreden.

Voor snelle identificatie van *S. aureus* zijn verschillende commerciële latexagglutinatietesten beschikbaar. Tussen de testen bestaan verschillen in sensitiviteit en specificiteit. Met name de sensitiviteit kan voor MRSA isolaten bij gebruik van oudere generatie testen, zoals Staphaurex (Murex Diagnostics Ltd., Engeland) en Staphylect (Oxoid Ltd., Engeland), die alleen clumping factor en proteïne A detecteren, een probleem opleveren (14, 15). Een aantal MRSA isolaten

brengen geen clumping factor en proteïne A tot expressie, mogelijk doordat deze gemaskeerd worden door kapselpolysacchariden (14). De nieuwste generatie latexagglutinatietesten, zoals Staphaurex Plus (Murex Diagnostics Ltd. Engeland), Pastorex Staph Plus (Sanofi Diagnostics Pasteur, Frankrijk), Staphylect Plus (Oxoid Ltd., Engeland) en Slidex Staph-Plus (bioMérieux, Frankrijk), bevatten daarom tevens antistoffen tegen *S. aureus* specifieke kapselpolysacchariden of tegen groepsspecifieke celoppervlakteantigenen, om de sensitiviteit bij MRSA te verhogen (15).

Ook de specificiteit is niet 100% en wisselt per test. Fout-positieve resultaten worden met name gezien bij *S. schleiferi* en *S. lugdunensis* omdat deze species clumping factor produceren (12). *S. haemolyticus* geeft fout-positieve resultaten omdat dit species kapselpolysaccharide type 8 kan produceren, waartegen een aantal van de nieuwste generatie latexagglutinatietesten antistoffen bevatten (14). Omdat met name *S. haemolyticus* vaak ook meticillineresistent is kan dit voor verwarring zorgen. De oudere generatie latexagglutinatietesten is niet geschikt vanwege de lage sensitiviteit om kolonies geïsoleerd op selectieve media te testen (16). De nieuwere generatie testen kan wel gebruikt worden om verdachte kolonies van selectieve media te testen. Kolonies van media met een hoog zoutgehalte zijn echter soms lastig te emulgeren, zij produceren draderige kolonies, en de testresultaten zijn dan lastig te interpreteren (17).

Aanbevolen wordt één van de nieuwste generatie latexagglutinatietesten te gebruiken en deze te confirmeren met behulp van een andere techniek. De buis coagulase test is hiervoor geschikt (12, 15). Andere mogelijkheden zijn de deoxyribonuclease (DNase) test, of de specifiekere hitte-stabiele nuclease (thermonuclease) test (12, 18). Wanneer een discrepantie bestaat tussen de gebruikte methodes, of wanneer om andere reden aan de identificatie getwijfeld wordt, kan een moleculair diagnostische techniek als “gouden standaard” dienen. Commercieel verkrijgbaar is de AccuProbe culture identification test voor *S. aureus* (Gen-Probe; San Diego, Calif.), die rRNA sequenties specifiek voor *S. aureus* aantoont.

### 3.2.2.1 Algemene technieken: detectie van meticillineresistentie

MRSA is de term die van oudsher gebruik wordt om *S. aureus* isolaten aan te duiden die resistent zijn voor penicillinase-stabiele penicillines. In het laboratorium wordt op dit moment echter meestal oxacilline in plaats van meticilline getest, o.a. omdat oxacilline stabiel is tijdens het bewaren.

Meticillineresistentie is het gevolg van de aanwezigheid van een veranderd penicillinebindend eiwit, PBP2a, dat gecodeerd wordt door het *mecA*-gen. Algemeen wordt aangenomen dat MRSA isolaten resistent zijn tegen alle  $\beta$ -lactam antibiotica, inclusief  $\beta$ -lactam/ $\beta$ -lactamase remmer combinaties, cefalosporines en carbapenems. Ongeacht het resultaat van *in vitro* gevoeligheidsbepalingen dient een MRSA als resistent voor alle  $\beta$ -lactam antibiotica te worden gerapporteerd.

Detectie van meticillineresistentie met behulp van standaard gevoeligheidsbepalingen kan lastig zijn doordat isolaten heterogeen kunnen zijn in hun expressie van meticillineresistentie. Dit fenomeen wordt ook wel heteroresistentie genoemd en wordt veroorzaakt doordat *in vitro* slechts een klein aantal van de geteste cellen resistentie tot expressie brengt, hoewel alle cellen het *mecA*-gen bezitten. Onder standaard test condities kan dit een MIC voor oxacilline rond en zelfs net onder het breekpunt tot gevolg hebben. Om de expressie van resistentie te versterken wordt veelal gebruik gemaakt van aangepaste testcondities: testen van oxacilline i.p.v. meticilline, incubatie bij een temperatuur  $\leq 35^{\circ}\text{C}$ , toevoeging van NaCl aan het testmedium en een verlenging van de incubatietijd van 18 naar 24 uur. In Bijlage A staan een aantal methoden beschreven die als detectietechniek kunnen dienen. De NCCLS raadt aan naast dilutie (agar of bouillon) de oxa screen agar te gebruiken. De oxa-1 disk wordt gezien als onderdeel van de diskdiffusie methode, hiernaast wordt dan geen oxa screen agar geadviseerd. Voor de oxa-1 disk wordt geen incubatie op MH + zout geadviseerd. Er zijn verschillende artikelen waarin de oxa screen agar sensitiever

is gebleken dan de oxa disk (sensitiviteit oxa disk 61,3% en oxa screen agar 82,5%) (21,22). Een recente publicatie (37) laat echter een hogere sensitiviteit voor de oxa disk zien dan voor de oxa screen agar, resp 100% en 90%, hierbij moet gezegd worden dat het om 19 stammen gaat. In de discussie van dit laatste artikel wordt er nog eens op gewezen dat zowel de oxa screen agar als de oxa-disk lage sensitiviteit hebben bij zeer heteroresistente stammen.

Concluderend zal of de oxacilline disk of de oxacilline screen-agar naast de routinemethode moeten worden gebruikt om de sensitiviteit van de gevoeligheidsbepaling te optimaliseren

Steeds vaker worden isolaten beschreven waarbij solitair meticillineresistentie voorkomt en geen sprake is van multiresistentie. Dit zou met name het geval zijn bij isolaten waarbij geen relatie met een verblijf in het buitenland kan worden aangetoond.

Wanneer in de standaard toegepaste gevoeligheidsbepalingen een isolaat gevoelig lijkt te zijn voor oxacilline, maar resistentie wordt gevonden voor één van de volgende antibiotica: fluoroquinolonen, aminoglycosiden, macroliden, clindamycine of tetracycline, is een verhoogde alertheid op de aanwezigheid van het *mecA*-gen aangewezen. Aanbevolen wordt additionele technieken toe te passen om een MRSA uit te sluiten (zie onder 3.2.2.2).

### **3.2.2.2 Algemene technieken: confirmatie van meticillineresistentie**

Als er aanwijzingen zijn voor de aanwezigheid van het *mecA*-gen vanuit de gevoeligheidsbepaling moet dit geconfirmeerd worden. Deze confirmatie is alleen nodig voor het eerste isolaat van een individu. In principe dient dit op moleculair niveau te gebeuren, bijvoorbeeld middels PCR. In de praktijk kan ook de aanwezigheid van het PBP2a worden bepaald door middel van een relatief eenvoudige latex-agglutinatie test, MRSA screen test (Denka Seiken, Oxoid, bioMérieux). Na een extractiestap wordt met behulp van agglutinatie, gebruik makend van latex partikels gecoat met antistoffen tegen PBP2a, bepaald of het isolaat PBP2a produceert. De uitslag is binnen 20 minuten beschikbaar. Deze test heeft een dusdanige sensitiviteit en specificiteit dat hiermee kan worden volstaan (21, 23, 24, 25). Wanneer bij een sterke verdenking op MRSA de MRSA screen test negatief is, wordt aanbevolen om de test te herhalen na inductie met een  $\beta$ -lactam antibioticum, bijvoorbeeld oxacilline of ceftizoxim (23, 36). Wanneer voor inductie gebruik gemaakt van antibioticum disks moet men, voordat een MRSA screen test ingezet wordt van kolonies rondom deze disk, overtuigd zijn dat het een reïncultuur betreft. Dit laatste is lastig te zien op media die geen bloed bevatten. Een definitieve confirmatie middels PCR wordt door het RIVM verricht. Alle eerste isolaten van een patiënt of medewerker worden naar het RIVM gestuurd voor nadere typering en voor een nationale surveillance. Om een goed beeld te krijgen van de ontwikkelingen binnen Nederland is het van groot belang dat alle laboratoria hieraan meewerken. Ook worden er nu commerciële testen voor de detectie van het *mecA*-gen op de markt gebracht, voorbeelden hiervan zijn Evigene (Staten Serum Institute, Denemarken) en Velogene rapid MRSA identification assay (ID Biomedical Corp. Canada) (26, 27).

### **3.2.2.3 Algemene technieken: Testen van andere antibiotica bij een MRSA**

Bij een aangetoonde MRSA is het aan te bevelen om een uitgebreid antibiogram te bepalen. De behandeling kan zodoende worden geoptimaliseerd. Twee antibiotica moeten altijd getest worden, te weten vancomycine en mupirocine.

Voor de behandeling van MRSA zijn glycopeptiden de belangrijkste antibiotica. Wereldwijd worden in toenemende mate Glycopeptide Intermediate *Staphylococcus aureus* (GISA) isolaten gerapporteerd. Ook in Nederland zijn inmiddels enkele van deze isolaten gevonden (40). Bekend is dat met behulp van diskdiffusie technieken, gevoelige stammen (MIC 0,5–2  $\mu\text{g/ml}$ ) niet goed van verminderd gevoelige (MIC 4–8  $\mu\text{g/ml}$ ) stammen kunnen worden onderscheiden. De NCCLS raadt aan gebruik te maken van de vancomycine agar screen test (19). Deze test wordt beschreven in bijlage A. Uit een recente publicatie blijkt echter dat de sensitiviteit van de vancomycine agar laag is (41). Een voor klinische laboratoria geschikte screeningsmethode zou de methode volgens Etest zijn. Hierbij wordt het rijke BHI medium, een hoog inoculum (2 McFarland) en een langere incubatietijd (48 uur) gebruikt om de heteroresistente stammen te kunnen detecteren (zie bijlage A). Indien er aanwijzing is voor verminderde gevoeligheid voor

de glycopeptiden behoort de stam te worden opgestuurd naar een referentielaboratorium, bijvoorbeeld het RIVM. Daar het niet mogelijk is vancomycine resistentie op moleculair niveau te detecteren wordt voor de confirmatie gebruik gemaakt van een populatie analyse methode, de Population Analysis Profile-Area Under the Curve methode (PAP-AUC), waarbij een ratio bepaald wordt ten op zichte van de bekende heteroresistente GISA stam Mu3 (40).

Voor de beheersing van verspreiding van MRSA is mupirocine het belangrijkste antibioticum.

Zowel low-level (MIC 8 - 256 µg/ml) als high-level (MIC > 256 µg/ml) resistentie voor mupirocine is beschreven onder MRSA isolaten. Met name high-level resistentie heeft consequenties voor de klinische praktijk. Dragerschap van een high-level resistent isolaat zal niet met behulp van mupirocine kunnen worden geëradiceerd (28). Screening voor mupirocine resistentie kan met behulp van disk diffusie (5-µg mupirocine disk: < 14 mm (29). Wanneer sprake lijkt te zijn van resistentie dient de MIC bepaald te worden met behulp van een dilutie techniek. Ook de Etest (AB Biodisk) is een betrouwbare methode voor het bepalen van mupirocine resistentie (29).

Andere antibiotica die zouden kunnen worden getest zijn linezolid en quinupristine-dalfopristine (41).

### **3.3.1 Specifieke technieken**

De kweekmethode voor MRSA dient, met name bij epidemiologische screening, zo sensitief mogelijk te zijn. Het is in eerste instantie niet van belang waar en hoeveel, maar of er überhaupt MRSA aanwezig is.

Bij de screening op aanwezigheid van MRSA is het aan te bevelen onderscheid te maken tussen het opsporen van een nog onbekende stam (bv screening bij opname vanuit het buitenland) en het opsporen van een bekende stam, zoals tijdens een epidemie.

Bij een nog onbekende stam zal men rekening moeten houden met de mogelijkheid dat de stam niet reageert met de gebruikte reagentia of niet groeit in of op de gebruikte media.

Bij een reeds bekende stam kan men bepalen of de betreffende stam groeit en reageert met de gebruikte media of reagentia. Hierna kan een methode op maat gevolgd worden, aangepast aan de specifieke eigenschappen van de stam en de mogelijkheden binnen het laboratorium.

Media bruikbaar voor detectie van MRSA zijn onder te verdelen in vast en vloeibaar met of zonder selectieve middelen. Selectie kan worden verkregen door toevoeging van zout of antibiotica.

#### **3.3.2.1 Specifieke technieken: onbekende stam, vaste media**

Vloeibare media hebben een hogere opbrengst dan vaste media (8, 9). Het voordeel van een vast medium is dat er sneller een uitslag gegeven kan worden. Een vast medium toevoegen bij het beënten van het patiëntenmateriaal is niet strikt noodzakelijk, tenzij alleen een selectief vloeibaar medium gebruikt wordt, dan wordt aanbevolen ter controle van de kwaliteit van het aangeboden materiaal tenminste ook een niet selectief vast medium zoals een bloedagar te beënten. Wanneer in zo'n geval op een bloedagar < 15 KVE groeien bij materialen die normaliter gekoloniseerd zijn met bacteriën, zoals neus, keel en perineum, wordt nieuw materiaal aangevraagd. Het reeds beënte vloeibare medium kan wel verder worden bewerkt in afwachting van het nieuwe materiaal. Gebruik van diverse klassen antibiotica kan tijdelijk een zeer lage kolonisatie graad geven.

Vaste media worden wel routinematig gebruikt voor afenting na ophoping. Bij gebruik van selectieve vloeibare media gebruikt men voor afenting de conventionele bloedagar (BA) en eventueel de phenol-mannitol agar (PHMA). Na niet-selectieve ophoping wordt de bouillon bij voorkeur afgeënt op antibiotica en/of zout houdende media. Het voordeel van een selectief medium is de snellere bewerking in het laboratorium door het onderdrukken van contaminerende flora. Een voorbeeld is de mannitol zout agar (MSA) met 4 of 6µg/ml oxacilline (30). Hierbij wordt opgemerkt dat groei op antibiotica bevattende agar bij 40% van de kweken een incubatieduur van tenminste 48 uur nodig heeft om betrouwbare resultaten te verkrijgen (31). Gezien de hoogte van de zoutconcentratie in de MSA worden sommige *S. aureus* stammen in hun groei geremd hetgeen de sensitiviteit weer vermindert.

#### **3.3.2.2 Specifieke technieken: onbekende stam, vloeibare media**

Vloeibare media verhogen de detectiekans en maken het afnemen van meerdere sets kweken overbodig. Derhalve wordt het gebruik hiervan aangeraden. Bij een onbekende stam is het toevoegen van selectieve ingrediënten (zout/antibiotica) niet zonder gevaar. De stam kan in de groei geremd worden. MRSA stammen kunnen gevoelig zijn voor hoge zout concentraties (bv E-MRSA 16) (32). Hierdoor wordt door deze auteurs aangeraden een NaCl concentratie te gebruiken van maximaal 2,5% (32). Anderen vonden goede resultaten met hogere zoutconcentraties maar deze studies maakten niet de vergelijking met lagere zoutconcentraties (8, 10). De Hospital Infection Society en de British Society for Antimicrobial Chemotherapy bevelen een Brain Heart infusion bouillon met 7,5% zout aan (33). De American Society of Microbiology beveelt een MSA bouillon met 7,5% zout aan (34) waarmee goede resultaten zijn gedocumenteerd (9). Bij het opsporen van een onbekende stam gaat het verhogen van de zoutconcentratie gepaard met een niet precies bekend verlies aan sensitiviteit. Gezien het gebrek aan uitgebreide vergelijkende studies kunnen geen definitieve aanbevelingen over de zoutconcentratie worden gedaan.

Een andere benadering is het toevoegen van antibiotica. In een studie werd hiermee een significant betere detectie gevonden in vergelijking met vaste media bij een aanmerkelijke vereenvoudiging van de laboratorium werkzaamheden (35). Dit medium bestaat uit een phenyl-mannitol bouillon met aztreonam en ceftizoxim. Ceftizoxim is gekozen omdat hierdoor de expressie van meticillineresistentie wordt verbeterd. Men kan de bouillon, ongeacht de kleur, na 48 uur afenten op een bloedagar, waarna de bloedagar verder wordt bewerkt. Echter men kan ook afenten nadat een kleuromslag van rood naar oranje-geel is opgetreden. De kleuromslag wordt beoordeeld na 48 en na 72 uur. Indien de laatste werkwijze wordt gekozen, wordt een gelijktijdig ingezette bloedagar beoordeeld op groei van niet-fermentatieve gram-negatieve staven. Bij aanwezigheid hiervan wordt de bouillon altijd afgeënt, ongeacht de kleur. Non-fermenters maken het milieu alkalisch waardoor de kleuromslag mogelijk niet meer optreedt. Uit de eerder genoemde studie blijkt dat bij deze werkwijze bij ongeveer 75% van alle bouillons geen afenting nodig is.

Opgemerkt moet worden dat bij het zoeken naar een onbekende stam altijd de kans aanwezig is dat een selectief medium deze stam niet detecteert. Het wordt daarom aanbevolen om ook altijd een niet selectief medium in te zetten (bijvoorbeeld een bloedagarplaat), waarvan voor *S.aureus* verdachte kolonies worden getest op MRSA.

### **3.3.3.1 Specifieke technieken: bekende stam**

Indien een bekende stam wordt gezocht, bijvoorbeeld in het kader van een verspreiding binnen een instelling, kan maatwerk worden geleverd. De selectie kan worden gemaximaliseerd op basis van een analyse van de nu bekende MRSA. Zowel zouttolerantie als antibiogram dienen als leidraad. De stam kan door middel van een verdunningsreeks worden getest op gevoeligheid van detectie in het routinematig gebruikte selectieve ophopingsmedium. Afhankelijk van dit resultaat kan worden besloten of het medium bruikbaar is voor de op te sporen stam. In de praktijk blijkt dat een combinatie van een zoutconcentratie van 6,0-7,5% en het toevoegen van antibiotica als aminoglycosiden of ciprofloxacine vrijwel alle gram-negatieve bacteriën onderdrukt. Bij gebruik van aztreonam en ceftizoxim kan met een normale zoutconcentratie gewerkt worden voor een gelijksoortige onderdrukking (35). Nadat de betreffende MRSA in de verschillende media is getest kunnen deze voor het opsporen van de epidemische stam worden toegepast. Dit leidt tot een zeer sterke vereenvoudiging van de werkzaamheden binnen het laboratorium met een behoud van of zelfs verbetering van de gevoeligheid van de detectiemethode.

## Referenties:

1. Vandenbroucke-Grauls CMJE. Management of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the Netherlands. Rev Med Microbiol 1998;9:1-8.
2. Kluytmans J, Van Belkum A, Verbrugh H. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. Clin Microbiol Rev 1997; 10: 505-520.
3. Sanford MD, Widmer AF, Bale MJ, Jones RN, Wenzel RP. Efficient detection of long-term persistence of the carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Clin Infect Dis 1993;19:1123-8.
4. Boe J, Solberg CO, Vogelsang ThM, Wormes A. Perineal carriers of *Staphylococci*. Brit Med J 1964;2:280-281.
5. Kluytmans J, van Leeuwen W, Goessens W, Hollis R, Messer S, Herwaldt L, Bruining H, Heck M, Rost J, van Leeuwen N, van Belkum A, Verbrugh H. Food-initiated outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* analyzed by feno- and genotyping. J Clin Microbiol 1995;33:1121-8.
6. Sewell DL, Potter SA, Jacobson CM, Strausbaugh LJ, Ward TT. Sensitivity of surveillance cultures for the detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a nursing-home-care unit. Diagn Microbiol Infect Dis 1993;17:53-6.
7. Ballemans CAJM, Weersink AJL, Blok HEM, Vandenbroucke-Grauls CMJE, Verhoef J. Screening for MRSA: one hour versus 24 hours sampling interval. J Hosp Infect 1999;42:316-7.
8. Van Ogtrop ML. Effect of broth enrichment cultures on ability to detect carriage of *Staphylococcus aureus*. Antimicrobial Agents Chemother 1995;39:2169.
9. Gardam M, Brunton J, Willey B, McGeer A, Low D, Conly J. A blinded comparison of three laboratory protocols for the identification of patients colonized with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Infect Control Hosp Epidemiol 2001;22:152-6.
10. Wanten GJA, Schneeberger PM, Bevers A, van Ginneken E, Koolen MI. Optimizing screening procedures for *Staphylococcus aureus* nasal carriage in patients on haemodialysis. Nephrol Dial Transplant 1998;13:1256-8.
11. Riewerts-Eriksen NH, Espersen F, Thamdrup Rosdahl V, Jensen K. Evaluation of methods for the detection of nasal carriage of *Staphylococcus aureus*. APMIS 1994;102:407-12.
12. Kloos WE, Bannerman TL. 1999. *Staphylococcus* and *Micrococcus*, p. 264-282. In BR Murray, EJ Baron, MA Tenover, FC Tenover, and RH Tenover (ed.), Manual of clinical microbiology, 7<sup>th</sup> ed. American Society for Microbiology, Washington, DC.
13. Milner AE. Isolation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from non-sterile sites: evaluation of a new selective medium. Br J Biomed Sci 2000;57:114-118.
14. Fournier JM, Bouvet A, Mathieu D, Nato F, Boutonnier A, Gerbal R, Brunengo P, Saulnier C, Sagot N, Slizewicz B, Mazie JC. New latex reagent using monoclonal antibodies to capsular polysaccharide for reliable identification of both oxacillin-susceptible and oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol 1993;31:1342-1344.
15. Personne P, Bes M, Lina G, Vandenesch F, Brun Y, Etienne J. Comparative performances of six agglutination kits assessed by using typical and atypical strains of *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol 1997;35:1138-1140.
16. Adams J, Van Enk R. Use of commercial particle agglutination systems for the rapid identification of methicillin-susceptible and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1994;13:86-89.

17. Brayshaw DP. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: evaluation of detection techniques on laboratory-passaged organisms. *Br J Biomed Sci* 1999;56:170-176.
18. Menzies RE. Comparison of coagulase, deoxyribonuclease (DNase), and heat-stable nuclease test for identification of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Pathol* 1977;30:606-608.
19. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2000. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests, 7<sup>th</sup> ed. Approved standard M2-A7. National Committee for Laboratory Standards, Wayne, Pa.
20. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2000. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests, 5<sup>th</sup> ed. Approved standard M7-A5. National Committee for Laboratory Standards, Wayne, Pa.
21. Cavassini M, Wenger A, Jatou K, Blanc DS, Bille J. Evaluation of MRSA-Screen, a simple anti-PBP2a slide latex agglutination kit, for rapid detection of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 1999;37:1591-1594.
22. Ünal S, Werner K, DeGirolami P, Barsanti F, Eliopoulos G. Comparison of tests for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a clinical microbiology laboratory. *Antimicrob Agents Chemother* 1994;38:345-347.
23. van Leeuwen W, van Pelt C, Luijendijk A, Verbrugh HA, Goessens WF. Rapid detection of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* isolates by the MRSA-screen latex agglutination test. *J Clin Microbiol* 1999;37:3029-3030.
24. van Griethuysen AJ, Pouw M, van Leeuwen N, Heck M, Willemse P, Buiting A, Kluytmans J. Rapid slide latex agglutination test for detection of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 1999;37:2789-2792.
25. Hussain Z, Stoakes L, Garrow S, Longo S, Fitzgerald V, Lannigan R. Rapid detection of *mecA*-positive and *mecA*-negative coagulase-negative Staphylococci by an anti-penicillin binding protein 2a slide latex agglutination test. *J Clin Microbiol* 2000;38:2051-2054.
26. Skov RL, Pallesen LV, Poulsen RL, Espersen F. Evaluation of a new 3-h hybridization method for detecting the *mecA* gene in *Staphylococcus aureus* and comparison with existing genotypic and phenotypic susceptibility testing. *J Antimicrob Chemother* 1999;43:467-475.
27. Louie L, Matsumura SO, Choi E, Louie M, Simor AE. Evaluation of three rapid methods for detection of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 2000;38:2170-2173.
28. Eltringham I. Mupirocin resistance and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *J Hosp Infect* 1997;35:1-8.
29. Finlay JE, Miller LA, Poupard JA. Interpretive criteria for testing susceptibility of Staphylococci to mupirocin. *Antimicrob Agents Chemother*. 1997;41:1137-1139.
30. Lally RT, Ederer MN, Woolfrey BF. Evaluation of mannitol salt agar with oxacillin as a screening medium for methicillin-resistant *S. aureus*. *J Clin Microbiol* 1985;22:501-504.
31. Cookson BD. Author's reply. *J Clin Microbiol* 1990;28:2380-1.
32. Jones EM, Bowker KE, Cooke R, Marshall RJ, Reeves DS, MacGowan AP. Salt tolerance of EMRSA-16 and its effect on the sensitivity of screening cultures. *J Hosp Infect* 1997;35:59-62.
33. Report of a combined working party of the Hospital Infection Society and the British Society for Antimicrobial Chemotherapy. Revised guidelines for the control of epidemic methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *J Hosp Infect* 1990;16:351-377.
34. Clinical Microbiology Procedures Handbook, Chapter 11.15: Prospective focused surveillance for oxacillin-resistant *S. aureus*. Ed. Isenberg H. ASM 1995.
35. Wertheim H, Verbrugh HA, van Pelt C, de Man P, van Belkum A, Vos MC. Improved detection of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* using phenyl mannitol broth containing aztreonam and ceftizoxime. *J Clin Microbiol* 2001;39:2660-2.

36. Sakoulos G, Gold HS, Venkataraman L, Degirolami PC, Eliopoulos GM, Qian Q. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: Comparison of susceptibility testing methods and analysis of *mecA*-positive susceptible strains. J Clin Microbiol 2001;39:46-3951.
37. Swenson JM, Williams PP, Killgore G, O'Hara CM, Tenover FC. Performance of eight methods, including two new rapid methods for detection of oxacillin resistance in a challenge set of *Staphylococcus aureus* organisms. J Clin Microbiol 2001;39:3785-3788.
38. Swenson JM, Spargo J, Tenover FC, Ferraro MJ. Optimal inoculation methods and quality control for the NCCLS oxacillin agar screen test for detection of oxacillin resistance in *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol 2001;39:3781-3784.
39. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2002. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: Twelfth Informational Supplement. NCCLS document M100-S12. National Committee for Laboratory Standards, Wayne, Pa.
40. Walsh TR, Bolmström A, Qwärnström A, Ho P, Wootton M, Howe RA, MacGowan AP, Diekema D. Evaluation of current methods for detection of Staphylococci with reduced susceptibility to glycopeptides. J Clin Microbiol 2001;39:2439-2444.
41. Van Griethuysen A, van 't Veen A, Buiting A, Kluytmans J. In vitro activity of linezolid in methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* in The Netherlands. In: Abstracts of the 41<sup>st</sup> Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2001 Dec 16-19; Chicago, Illinois.

## Bijlage A

### Standaard gevoeligheidsbepaling voor *S. aureus* volgens NCCLS (19, 20, 39)

Als leidraad voor dit document is gebruik gemaakt van de richtlijnen van de National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). De NCCLS geeft richtlijnen voor *in vitro* gevoeligheidsbepalingen door middel van diskdiffusie en dilutie (micro-, macro- en agardilutie) technieken.

De NCCLS doet geen aanbevelingen over het gebruik van commerciële systemen als Etest (AB BIODISK, Zweden) en de geautomatiseerde gevoeligheidsbepalingen met behulp van bijvoorbeeld Vitek (bioMérieux, Frankrijk) of Phoenix (BD Biosciences).

Hieronder volgt een korte beschrijving van de technieken zoals deze door de NCCLS worden aanbevolen voor de detectie van MRSA.

#### 1 Diskdiffusie (papieren disks, Kirby Bauer)

Antibioticum: oxacilline

Disklading: 1 µg

Medium: Mueller Hinton medium

Inoculum: 0,5 McFarland suspensie, verkregen met behulp van de “directe kolonie suspensie methode”(= 18–24 uur oude kolonies van een niet-selectief medium suspenderen in bouillon of fysiologisch zout).

Het medium wordt beënt met behulp van een steriele wattenstok, deze wordt eerst in de suspensie gedoopt en vervolgens wordt de overtollige vloeistof verwijderd door de wattenstok tegen zijkant van buis uit te drukken.

NB. De suspensie binnen een kwartier gebruiken.

Incubatielijd: 24 uur

Temperatuur: 33 – maximaal 35°C

Interpretatie: S zone ≥ 13 mm, I zone 11-12 mm, R zone ≤ 10 mm

NB. Plaat tegen licht aflezen. Let op microkolonies binnen de remmingszone!

#### 2 Bouillon dilutie (micro- of macrodilutie)

Antibioticum: oxacilline

Medium: cation-adjusted Mueller Hinton bouillon + 2% NaCl

Inoculum: Eindinoculum: 5 x 10<sup>5</sup> CFU/ml per buis of micro titer well

Vanuit een 0.5 McFarland (= 1 x 10<sup>8</sup> CFU/ml) suspensie, verkregen met behulp van de “directe kolonie suspensie methode”, wordt door deze door te verdunnen in bouillon (macrodilutie) of water / fysiologisch zout (microdilutie) het gewenste inoculum bereikt

NB. Doorverdunde suspensie binnen een kwartier gebruiken.

Incubatielijd: 24 uur

Temperatuur: 33 – maximaal 35°C

Interpretatie: S MIC ≤ 2, R MIC ≥ 4

#### 3 Agar dilutie

Antibioticum: oxacilline

Medium: Mueller Hinton agar + 2% NaCl + de testen concentratie oxacilline

Inoculum: Eindinoculum:  $10^4$  CFU/spot (diameter 5-8 mm)  
Vanuit een 0,5 McFarland suspensie, verkregen met behulp de “directe kolonie suspensie methode”, wordt door deze door te verdunnen in bouillon of fysiologisch zout het gewenste inoculum bereikt.  
NB. Doorverdunde suspensie binnen een kwartier gebruiken.

Incubatielijd: 24 uur  
Temperatuur: 33 – maximaal 35°C  
Interpretatie: S MIC  $\leq$  2, R MIC  $\geq$  4

#### **4 Oxacilline screening agar**

De NCCLS beveelt aan om, wanneer gebruik gemaakt wordt van de hierboven beschreven bouillon- en/of agardilutie methoden, tevens te screenen op meticillineresistentie met behulp van de oxacilline screening agar.

Antibioticum: oxacilline  
Medium: Mueller Hinton agar + 4% NaCl + oxacilline 6  $\mu$ g/ml  
Inoculum: Met behulp van een 1  $\mu$ l öse gedoopt in een 0,5 McFarland suspensie een spot enten met een diameter van 10 tot 15 mm (38). Als alternatief kan met een steriele wattenstok gedoopt in de suspensie een vergelijkbare spot of een kwadrant worden geënt (39).

Incubatielijd: 24 uur  
Temperatuur: 35°C  
Interpretatie: groei = resistent  
NB. Plaat tegen licht aflezen. Let op microkolonies of een lichte waas van groei!

#### **5 MIC bepaling voor oxacilline met Etest**

Antibioticum: oxacilline  
Medium: Mueller Hinton agar + 2% NaCl  
Inoculum: 0.5 McFarland  
Incubatielijd: 24 uur  
Temperatuur: 35°C  
Interpretatie: S MIC  $\leq$  2, R MIC  $\geq$  4

Let op: de MIC voor oxacilline bij zeer heteroresistente stammen kan onder het breekpunt voor meticillineresistentie liggen.

#### **6 Vancomycine agar screen test**

Antibioticum: vancomycine  
Medium: Brain Heart Infusion agar + vancomycine 6  $\mu$ g/ml  
Inoculum: 1-10  $\mu$ l van een 0,5 McFarland suspensie op het medium enten  
Incubatielijd: 24 uur  
Temperatuur: 35°C  
Interpretatie: groei = verdacht voor resistentie

#### **7 Screening op verminderde gevoeligheid voor glycopeptiden met Etest**

Antibiotica: vancomycine en teicoplanine  
Medium: Brain Heart Infusion agar  
Inoculum: 2 McFarland  
Incubatietijd: 48 uur  
Temperatuur: 35°C  
Interpretatie: R MIC vancomycine en teicoplanine  $\geq 8$  of alleen teicoplanine  $\geq 12$