

CAT Critically Appraised Topic

Titel: Optimalisatie van de workflow voor VRE screening in het routinelabo

Auteur: Annelies Louwagie
Supervisor: Dr. Michael Boudewijns
Datum: 28-04-2016

CLINICAL BOTTOM LINE

Multidrugresistente micro-organismen (MDRO) zijn een wereldwijd gezondheidsprobleem. Infecties met MDRO worden geassocieerd met een hogere mortaliteit en een langere hospitalisatieduur, en leiden vaak tot hogere ziektekosten. Dit roept dan ook de vraag op naar infectiepreventiemaatregelen. Een correcte handhygiëne, een haalbaar isolatiebeleid en een beperkt antibioticumgebruik spelen hierbij een belangrijke rol. Door screening kunnen heel wat asymptomatische dragers van multiresistente micro-organismen opgespoord worden. Screening heeft echter een hoge kostprijs waardoor er vaak gekozen wordt om een beperkte groep 'risicopatiënten' te screenen. Tevens dient een onderscheid gemaakt te worden tussen een epidemische en een niet-epidemische setting.

Klinische laboratoria hebben reeds veel ervaring met de surveillance naar bepaalde MDRO zoals *methicilline resistente Staphylococcus aureus* (MRSA). We worden echter meer en meer geconfronteerd met andere MDRO zoals extended-spectrum bètalactamase producerende *Enterobacteriaceae* (ESBL), carbapenemase-producerende *Enterobacteriaceae* (CPE) en vancomycine resistente enterokokken (VRE). Het is dan ook een hele uitdaging wat betreft controleren van uitbraken, invoeren van ziekenhuishygiënistische maatregelen en opstellen van adequate screeningsvoorschriften, m.i.v. de microbiële detectie. In het kader van deze Critically Appraised Topic werd getracht op zoek te gaan naar een optimale screeningsmethode voor de detectie van dragerschap met VRE. Er werd op zoek gegaan naar een optimale workflow via een literatuurstudie en de validatie van een fenotypische screeningsmethode.

CLINICAL/DIAGNOSTIC SCENARIO

Enterococcus spp. is de 3^e meest voorkomende pathogeen bij gehospitaliseerde patiënten, verantwoordelijk voor ongeveer 12% van nosocomiale infecties(1). Bij de mens worden hoofdzakelijk de species *E. faecalis* en *E. faecium* geïsoleerd. Enterokokken zijn een belangrijke oorzaak van urineweginfecties, endocarditis, bacteriëmie, wondinfecties, abdominale infecties en katheterinfecties. Een toenemende resistentie tegen verschillende antibiotica, in het bijzonder tegen vancomycine, is een majeur klinisch en epidemiologisch probleem. Infecties met VRE zijn moeilijk te behandelen wegens de gelimiteerde effectieve behandelingsopties. Tevens zijn infecties met VRE geassocieerd met een verhoogde morbiditeit en mortaliteit (2).

Momenteel gebeurt er geen screening naar dragerschap van VRE bij patiënten in AZ Groeninge. Recente uitbraken in Belgische ziekenhuizen suggereren echter dat het voorkomen van VRE toeneemt. Asymptomatische kolonisatie met MDRO is een belangrijke bron van transmissie en een predisponerende

factor voor een daaropvolgende infectie. Daarom willen we met deze CAT binnen AZ Groeninge op zoek gaan naar een optimale methode voor detectie van VRE-dragerschap.

QUESTION(S)

A. Literatuurstudie

- 1) *Wat zeggen epidemiologische gegevens over VRE?*
- 2) *Wat is het mechanisme achter glycopeptide resistentie?*
- 3) *Wat is er in de literatuur beschreven over screeningmethoden naar asymptomatisch VRE-dragerschap?*

B. Praktisch luik

- 4) *Welk algoritme kan gebruikt worden voor screening naar VRE in het AZ Groeninge?*

SEARCH TERMS

- 1) *MeSH Database (PubMed): MeSH term: “ VRE ” AND “screening methods” AND “chromogenic medium” AND “epidemiology”*
- 2) *PubMed Clinical Queries (from 1966; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi>): Systematic Reviews; Clinical Queries using Research Methodology Filters “vancomycin resistant enterococci” (diagnosis + specific, diagnosis + sensitive, prognosis + specific)*
- 3) *Pubmed (Medline; from 1966): “vancomycin resistant enterococci”, “VRE”, “screening”, “chromogenic agar”*
- 4) *UpToDate Online version (2016): “vancomycin resistant enterococci”*

A. Literatuurstudie

I. Epidemiologie

I.1 Opmars VRE

De eerste gevallen van vancomycine resistentie bij enterokokken werden in 1988 gerapporteerd in het Verenigd Koninkrijk en Frankrijk. Dit kwam als een verrassing aangezien vancomycine reeds meer dan 30 jaar gebruikt werd zonder enige melding van resistentie. De impact van VRE bleef niet onopgemerkt door de snelle spreiding van VRE in Amerikaanse ziekenhuizen tijdens de jaren 1990, in Europese ziekenhuizen tijdens de jaren 2000 en uiteindelijk wereldwijd(3).

In Europa werd reeds snel gemerkt dat gezonde mensen en dieren dragers waren van enterokokken die resistent waren tegen vancomycine. De vancomycine-resistentie bij mens en dier werd toegeschreven aan avoparcine, een glycopeptide dat gebruikt werd als groeipromotor in de veeteelt. Via epidemiologische studies kon aangetoond worden dat dit aanleiding gaf tot selectie van dierlijke VRE, die via de voedselketen naar de mens overgebracht konden worden. De Europese Unie besloot tijdens de jaren 1995-2005 het gebruik van antibiotica als groeipromotor in de veeteelt te verbieden. Het bannen van avoparcine resulteerde in een significante daling van VRE bij dieren. De daling verliep echter moeizaam en een dierlijk reservoir van resistentiegenen kan nog steeds bestaan en kan mogelijks persisteren in de komende jaren (3).

Het aantal infecties in Europese ziekenhuizen viel aanvankelijk mee, met slechts enkele uitbraken in hoog-risico afdelingen zoals intensieve zorgen, hematologische, nefrologische en transplantatie afdelingen. Pas vanaf 2000, wanneer het dragerschap bij dieren daalde, merkten bepaalde Europese landen een toename van het aantal VRE isolaten op. Tevens vonden enkele grote uitbraken plaats in verschillende Europese ziekenhuizen. EARSS (het huidige EARSNet) toonde aan dat de proportie glycopeptide resistente *E. faecium* isolaten geïsoleerd uit bloedkweek sinds 2000 drastisch gestegen was in verschillende Europese landen (o.a. Ierland, Duitsland en Griekenland). Opmerkelijk was het verschil met de stammen geïsoleerd uit dieren door een hoge resistentie tegen ampicilline (3)!

In de jaren '90 van de vorige eeuw was er een snelle toename van het aantal infecties veroorzaakt door *E. faecium* in Amerikaanse ziekenhuizen. De proportie VRE (van alle enterokokken isolaten) in ziekenhuizen bedroeg 28% in 1993. Deze opkomst van VRE in de VS werd geassocieerd met het intensief gebruik van vancomycine. Het meest voorkomende species was *E. faecium* gekenmerkt door high-level resistentie tegen ampicilline en aminoglycosiden. In tegenstelling tot de situatie in Europa was het gebruik van avoparcine nooit wettelijk toegestaan in de Verenigde Staten en werd VRE-dragerschap in de gezonde bevolking niet gevonden (3).

Er is dus sprake van een paradox: aanvankelijk ampicilline-gevoelige VRE in Europa bij mens en dier, maar geen VRE-problemen in ziekenhuizen en in de Verenigde Staten geen VRE bij mens en dier in de open populatie, maar grote problemen met ampicilline-resistente VRE. Dit kan verklaard worden door te kijken naar de epidemiologie van *E. faecium*. Binnen deze bacteriesoort bestaat een afsplitsing die zich kenmerkt door resistentie tegen ampicilline (ampicilline/amoxicilline-resistente enterokok, ARE) en zich massaal verspreid heeft in ziekenhuizen wereldwijd. Het succes van ARE in ziekenhuizen is, naast de resistentie, vermoedelijk het gevolg van een beter aanhechtingsvermogen aan gastheermoleculen, meer biofilmvorming en specifieke eigenschappen die kolonisatie in de darm vergemakkelijken (4).

In Nederland werd reeds aangetoond dat VRE-uitbraken veroorzaakt werden door verschillende ARE-varianten. Tevens werden van bijna alle VRE-stammen die in de Nederlandse ziekenhuizen circuleren, identieke varianten aangetroffen in andere Europese, Aziatische en Amerikaanse landen. Het ziet er dus naar uit dat het aanwezige reservoir van ARE als 'gastheer' dient voor vancomycine-resistentiegenen. Daarbij is het nog steeds

mogelijk dat VRE-stammen die bij de open populatie en in het milieu voorkomen, als donor fungeren van het vancomycine-resistentie-transposon (4).

1.2 *E. faecium* als belangrijke ziekenhuispathogeen

Aan de hand van multilocus sequence typing (MLST) studies werd wereldwijd een subpopulatie van verwante *E. faecium* stammen geïdentificeerd. Deze stammen met hoge virulentie konden geassocieerd worden met nosocomiale epidemieën: ST18, 17, 78, 117, 192 en 280, zgn. clonaal complex CC17. Isolaten behorend tot dit complex worden gekarakteriseerd door resistentie tegen ampicilline en fluoroquinolones, maar niet noodzakelijk tegen vancomycine. Deze stammen hadden zich verspreid in Amerikaanse ziekenhuizen tegen het einde van de jaren '80 en hebben in een later stadium determinanten verworven voor vancomycine resistentie door horizontale gentransfer(3).

E. faecium stammen die zich aangepast hebben aan de ziekenhuisomgeving worden gekenmerkt door een enorme plasticiteit van het genoom. Hierdoor kan het micro-organisme zich aanpassen aan omgevingsfactoren die selectiedruk uitoefenen, waaronder bijvoorbeeld antibiotica. Figuur 1 toont de belangrijke stappen die plaatsvonden in het verwerven van resistentie bij enterokokken (3).

Figuur 1. De verschillende stappen in het ontstaan van multipel antibiotica resistente *E. faecium* (3)

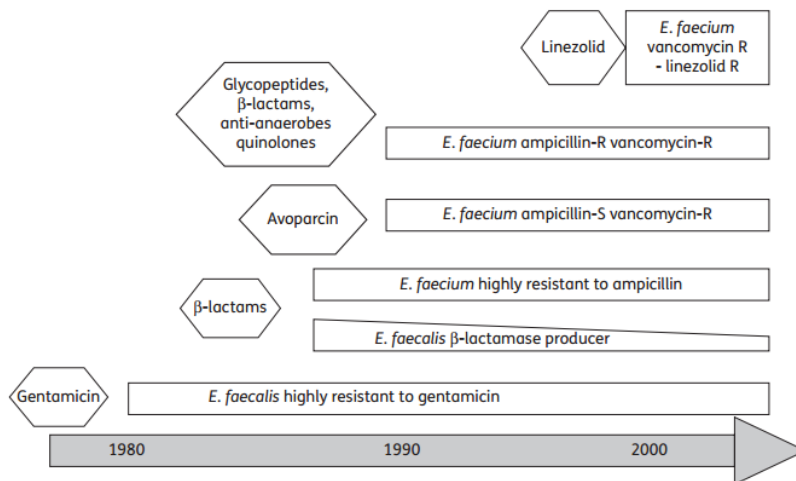


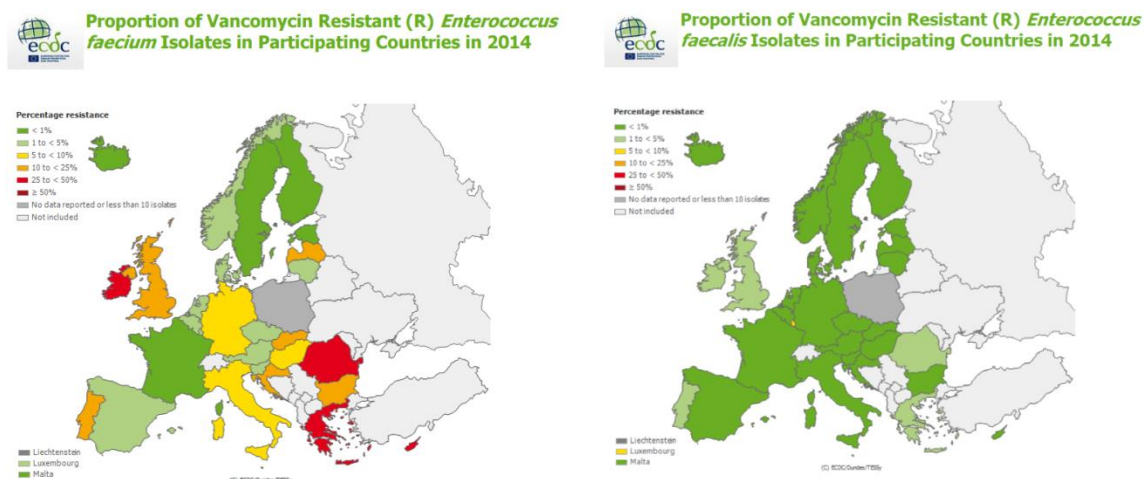
Figure 3. The walk of enterococci towards multiple antibiotic resistance. Selector antibiotics are shown in the lozenges.

1.3 Europa: surveillancegegevens

In Europa is er sinds 2011 een duidelijke toename in het aantal invasieve (i.e. bloedkweken) VR *E. faecium* isolaten. Het gemiddelde percentage invasieve VR *E. faecium* isolaten in Europa in de periode 2011-2014 bedroeg respectievelijk 6.2%, 8.1%, 8.9% en 7.9%. De Belgische cijfers voor de periode 2011-2014 waren respectievelijk 7.0%, 1.4%, 1.7% en 3.1%. Deze dalende trend voor België is echter niet significant wanneer enkel data van consistent rapporterende laboratoria in beschouwing genomen worden (5).

In Europa varieert de prevalentie van VRE afhankelijk van het betreffende land (figuur 2). Een dalende gradiënt van zuid naar Noord-Europa die geobserveerd werd bij MRSA en *E. coli* resistent aan derde generatie cefalosporines, wordt bij VRE niet geobserveerd(3).

Figuur 2 . Percentage invasieve vancomycine resistente *E. faecium* (links) en *E. faecalis* (rechts) isolaten in Europa in 2014 (5)



In een recente studie werd een groot aantal enterokokken stammen verzameld uit verschillende landen. Deze studie bevestigde de grote variabiliteit wereldwijd in voorkomen van VRE (figuur 3). Figuur 3 geeft bovendien weer dat de prevalentie van glycopeptide resistentie hoger is bij *E. faecium* dan bij *E. faecalis* (3).

Figuur 3. Wereldwijd en heteroog voorkomen van VRE (3)

Table 2. Frequency of resistance to vancomycin in enterococci isolated in various continents (adapted from reference 39)

Species	Percentage resistance to vancomycin according to region (no. of isolates)				
	Asia/Pacific	Europe	Latin America	North America	overall
<i>E. faecium</i>	14.1 (270)	31.5 (489)	48.1 (54)	76 (597)	47.6 (1410)
<i>E. faecalis</i>	0.01 (440)	1.5 (919)	3 (195)	5.6 (945)	3 (2499)
All	11.9 (710)	11.9 (1408)	12.9 (249)	32.8 (1542)	19.1 (3909)

1.3 België: surveillancegegevens

Uit de cijfers van het referentielaboratorium blijkt dat er een duidelijke toename is in het aantal geïsoleerde VRE isolaten (figuur 4). Vermoedelijk is er enerzijds een reële toename, maar anderzijds een toename van de participatie aan de VRE-surveillance. Tot op heden is er geen wettelijke verplichting voor laboratoria om VRE stammen op te sturen. Dit maakt het moeilijk een conclusie te trekken uit de geobserveerde trend. Het meest voorkomende genotype is *vanA*, gevolgd door het *vanB* genotype. *VanA* en *vanB* resistentiegenen kunnen verspreid worden gelet ze voorkomen op een transposon. Het *vanC* genotype is een intrinsiek kenmerk van *E. gallinarum* en *E. casseliflavus*. *VanC* resistentiegenen liggen op het chromosoom en kunnen bijgevolg niet verspreid worden. Andere genotypes zijn zeldzaam. ST80, 117 en 203 zijn de meest voorkomende *E. faecium* types in België in worden geassocieerd aan CC17(1).

Figuur 4. Enterokokken-stammen ontvangen in het NRC 2009-2015. Data van het NRC UZA Antwerpen (1)

Jaar	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015
Aantal ontvangen stammen	32	27	81	131	178	300	578
<i>E. faecium</i>	18	19	47	104	95	215	447
<i>E. faecalis</i>	12	3	18	15	67	68	111
<i>E. casseliflavus/gallinarum</i>	2	1	13	9	12	12	14
other Enterococci	0	0	1	1	4	3	4
Nr of VRE (%)	18 (56,3)	21 (77,8)	61 (75,3)	103 (77,4)	85 (47,8)	198 (65,8)	444 (76,1)
<i>vanA</i> (%)	5 (27,8)	8 (38,1)	24 (39,3)	84 (81,6)	61 (71,8)	163 (82,3)	402 (90,5)
<i>vanB</i> (%)	11 (61,1)	12 (57,1)	24 (39,3)	11 (10,7)	12 (14,1)	20 (10,1)	24 (5,4)
<i>vanC</i> (%)	2 (11,1)	1 (4,8)	13 (21,3)	8 (7,7)	12 (14,1)	10 (5,1)	13 (2,9)
other (<i>vanAB</i> , <i>vanBC</i> , <i>vanAC</i> , <i>vanD</i>) (%)	0	0	0	0	0	3 (1,5)	5 (1,1)
Number of outbreaks	1	1	3	4	1	10	22

Recente studies naar de epidemiologie van VRE in Belgische woonzorgcentra (WZC) suggereren dat VRE weinig prevalent zijn, i.t.t. MRSA. In een nationaal screeningsprogramma naar MDRO (MRSA, ESBL en VRE) bij 2791 inwoners van 60 woonzorgcentra in 2013 werd geen enkele VRE-drager geïdentificeerd (6). In 2015 werd een cross sectionele studie uitgevoerd in 29 verzorgingstehuizen om de prevalentie van MRSA, ESBL en CPE in te schatten. Hierbij werd 1 VR *E. faecium* gedetecteerd. Hoewel de prevalentie van VRE in deze centra laag is, zijn dergelijke studies belangrijk. Bewoners van woonzorgcentra kunnen namelijk een reservoir vormen van dragerschap met MDRO (7).

1.4 Transmissie van VRE

Enterokokken zijn micro-organismen die nagenoeg overal in de omgeving kunnen teruggevonden worden. Enterokokken kunnen overleven onder moeilijke omstandigheden en persisteren in de omgeving. Bij de mens behoren enterokokken tot de commensale flora van de darm. Tevens worden ze -in mindere mate- teruggevonden op de urogenitale tractus, de mond en de huid, met als voornaamste plaats de perineale regio. Bij de mens worden *E. faecalis* en *E. faecium* het meest geïsoleerd. Daarnaast worden *E. casseliflavus*, *E. durans* en *E. gallinarum* in wisselende mate teruggevonden. Historisch vertegenwoordigde *E. faecalis* 80-90% van de klinische isolaten en *E. faecium* slechts 5-10%. Er is echter een trend tot geleidelijk dalen van de ratio van *E. faecalis*/*E. faecium*, voornamelijk bij bloedstroominfecties.

‘Virulente’ enterokokken onderscheiden zich van de ‘commensale’ enterokokken doordat ze in staat zijn nieuwe eigenschappen te verwerven die de bacterie toelaten voor een langere tijd te overleven in de gastheer of in de omgeving. Verworven antimicrobiële resistentie en het vermogen om biofilms te vormen zijn hier belangrijke voorbeelden van (8).

Hoewel enterokokken doorgaans alleen in de darm worden aangetroffen, kunnen ze bij zieke patiënten ook de huid koloniseren. Talrijke studies hebben aangetoond dat VRE terug te vinden zijn in de omgeving van patiënten die drager zijn van deze kiemen. Men vindt deze micro-organismen vooral op oppervlakken en voorwerpen die vaak met de handen worden aangeraakt ‘high touch oppervlakken’ (9). Enterokokken kunnen 5 dagen tot 4 maanden overleven op droge oppervlakten (10).

Gehospitaliseerde patiënten met gastro-intestinaal dragerschap van VRE vormen het voornaamste reservoir van VRE in ziekenhuizen. Kolonisatie met VRE kan weken tot maanden duren (8). Kolonisatie wordt bevorderd door antibiotica zoals cefalosporines, vancomycine, en middelen gericht tegen anaerobe bacteriën. Hierbij vormt de dialysepopulatie een apart probleem. Deze groep patiënten gebruikt het meeste vancomycine. Daarnaast worden deze patiënten frequent in het ziekenhuis opgenomen, waardoor VRE zich gemakkelijk in het ziekenhuis kunnen verspreiden (11). Aanbevelingen om de verspreiding van VRE tegen te gaan omvatten een goede naleving van de hygiënische voorschriften en een restrictief gebruik van antibiotica. Daarnaast is de implementatie van surveillance procedures voor vroege detectie van VRE en andere maatregelen (bv isolatieprocedures en educatie over transmissie van VRE) belangrijk om kruisinfecties te limiteren (8).

1.5. VRE Outcome

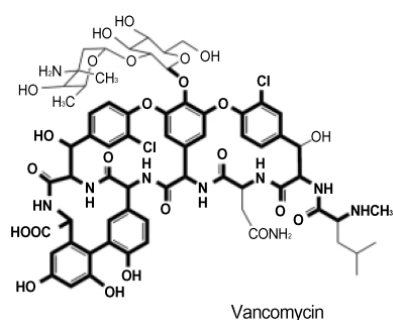
In een systematische review en meta-analyse vond men dat VRE bacteriëmie geassocieerd is met een verhoogde mortaliteit en langere hospitalisatieduur in vergelijking met VSE bacteriëmie, ondanks het bestaan van effectieve moleculen zoals quinpristine-dalfopristine, linezolid en daptomycine. Het is nog onduidelijk of dit te wijten is aan het feit dat VRE bacteriëmie niet ingedekt wordt met empirische therapie. Dit zorgt ervoor dat VRE bacteriëmie pas effectief behandeld kan worden na VRE-positieve microbiologische cultuur. Tevens is verder onderzoek nodig om uit te wijzen of het proportioneel meer voorkomen van *E. faecium* t.o.v. *E. faecalis* bij de VRE patiëntengroep een invloed heeft op deze resultaten, en of patiënten met VRE bacteriëmie meer comorbiditeiten bezitten dan patiënten met VSE bacteriëmie (2).

2. Mechanisme voor glycopeptide resistentie

2.1 Inleiding: vancomycine en teicoplanine

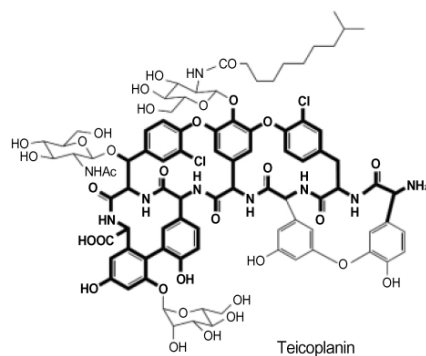
Rond 1950 waren er weinig middelen voor de behandeling van infecties met penicillineresistente stafylokokken. In 1952 werd uit een bodemonster *Streptomyces orientalis* geïsoleerd. Dit micro-organisme produceerde "compound 05865", die na onderzoek actief bleek tegen de meeste Grampositieven, inclusief penicilline-resistente stafylokokken. Deze verbinding, "Mississippi modder" genaamd vanwege de bruine kleur, werd verder opgezuiverd en de resulterende stof werd "vancomycine" genoemd naar het woord "vanquish". In 1958 werd vancomycine goedgekeurd voor de behandeling van ernstige stafylokokkeninfecties. Methicilline, het eerste semisynthetisch penicilline, werd in datzelfde jaar goedgekeurd. Wegens toxiciteitsredenen (thromboflebitis, nefro- en ototoxiciteit) werd vancomycine echter gereserveerd voor patiënten met ernstige bètalactam allergie of patiënten met infecties door micro-organismen die resistent waren aan de nieuwe penicillines. Bijgevolg werd het gebruik van vancomycine kort na zijn ontdekking sterk teruggedrongen door de beschikbaarheid van minder toxische alternatieven.

Vanaf 1980 steeg het verbruik van vancomycine door twee gebeurtenissen. Een eerste gebeurtenis was het gebruik van vancomycine bij pseudomembraneuze colitis, veroorzaakt door *Clostridium difficile*. Het oraal gebruik van vancomycine voor deze indicatie was deels verantwoordelijk voor de selectie van VRE. De tweede gebeurtenis die leidde tot een hoger vancomycine verbruik en een nieuw tijdperk in de geschiedenis van dit antibioticum, was de toenemende verspreiding van resistente Grampositieve kiemen zoals MRSA en de penicillineresistente *Streptococcus pneumoniae* (1, 12). De structuurformule van vancomycine wordt weergegeven in figuur 5.



Figuur 5. Structuurformule vancomycine

Teicoplanine (figuur 6), geproduceerd door *Actinoplanes teichomyceticus* werd ontdekt eind de jaren 1970. Teicoplanine wordt enkel in Europa gebruikt (13). De structuurformule van teicoplanine wordt weergegeven in figuur 6.



Figuur 6. Structuurformule teicoplanine

2.2 Ontstaan van resistentie

Wegens een toegenomen gebruik van vancomycine sinds 1980, was het ontstaan van resistentie onvermijdelijk. In 1988 rapporteerden Uttley et al. voor het eerst de isolatie van vancomycine resistente *E. faecium* en *E. faecalis* in Engeland (14). Kort daarna werden VRE gerapporteerd door onderzoekers in Frankrijk. Ook in de VS werden gelijkaardige stammen gerapporteerd. Vanaf dat ogenblik werd de isolatie van VRE continu gerapporteerd. Dit toonde aan dat VRE in diverse geografische gebieden in epidemische settings voorkwam. VRE stammen werden vanaf dat ogenblik geassocieerd volgens fenotypische en genotypische kenmerken.

2.3 Resistentie types

In de literatuur worden tot negen types glycopeptide resistentie beschreven bij enterokokken: VanA, B, C, D, E, G, L, M en N (figuur 7)(15). De drie meest voorkomende fenotypes zijn VanA, VanB en VanC. Het VanA fenotype wordt gecodeerd door de *vanA* genen en wordt gekenmerkt door een induceerbare high-level resistentie tegen vancomycine (MIC 64-1024 µg/ml) en teicoplanine (MIC 8-512 µg/ml) (16). VanA stammen vormen de grootste bedreiging door een hogere resistentie (i.e. hogere MIC waarden) en de lokalisatie van resistentiegenen op een plasmide waardoor ze overgedragen kunnen worden naar andere bacteriën. Het VanB fenotype wordt gecodeerd door de *vanB* genen en wordt gekenmerkt door variabele levels van induceerbare resistentie tegen vancomycine (MIC 4-1024 µg/ml). VanB stammen blijven echter gevoelig voor teicoplanine (MIC 0.06-1 µg/ml). VanB stammen vormen een bedreiging aangezien de resistentiegenen overgedragen kunnen worden via grote chromosomale elementen. VanC type resistentie is een intrinsiek kenmerk van *E. gallinarum* en *E. casseliflavus/E. flavescentis*. Deze species vertonen een low-level resistentie tegen vancomycine (MIC 4-32), maar niet tegen teicoplanine. VanC resistentie is constitutief en chromosomaal gemedieerd, waardoor VanC stammen niet bijdragen tot de verspreiding van vancomycine resistentie. Het VanD fenotype wordt gekenmerkt door een matige resistentie tegen vancomycine (MIC 16-64 µg/ml), maar niet tegen teicoplanine. Of dit fenotype overgedragen kan worden naar andere bacteriën is nog onduidelijk. VanA en VanB zijn de meest relevante fenotypes en worden gewoonlijk geassocieerd met *E. faecium* en *E. faecalis*. Andere types van glycopeptide resistentie komen slechts sporadisch voor bij enterokokken en worden verder niet besproken (12).

Figuur 7. Karakteristieken van de verschillende types van resistentie tegen glycopeptiden bij enterokokken (8, 17)

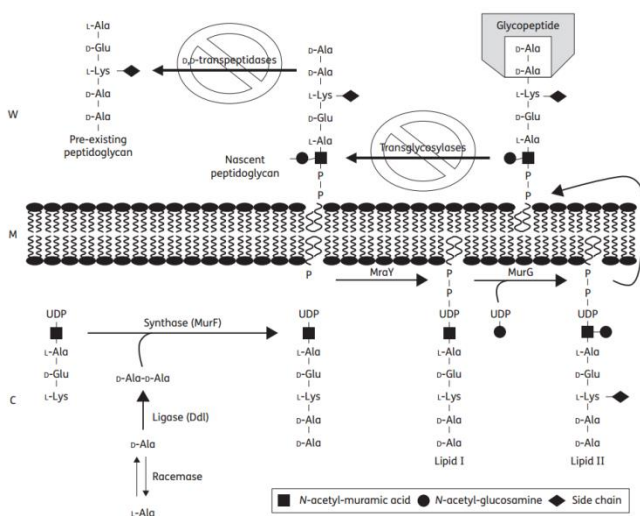
	Verworven resistentie								Intrinsieke resistentie
	high level		variabel	matig	low level				low level
	VanA	VanM	VanB	VanD	VanE	VanG	VanL	VanN	VanC1/C2/C3
Gevoeligheid (MIC, µg/ml):									
Vancomycine	64-1000 (R)	>256 (R)	4-1000 (I/R)	64-128 (R)	8-32 (I)	16 (I)	8 (I)	12-16 (I)	2-32 (S/R)
Teicoplanine	16-512 (R)	64 tot >256 (R)	0.5-1 (S)	4-64 (S/R)	0.5 (S)	0.5 (S)	0.5 (S)	0.5 (S)	0.5-1 (S)
Transfeerbaar (conjugatie)	+	+	+	-	-	+	-	+	-
Locatie van genen	Plasmide (Chr)	Onbekend	Chr (Plasmide)	Chr (Plasmide)	Chr	Chr	Chr	Plasmide	Chr
Mobiele elementen	Tn1546	Onbekend	Tn1547, 1549 of 5382	Onbekend	Onbekend	Onbekend	Onbekend	Onbekend	Onbekend
Expressie	Induceerbaar	Onbekend	Induceerbaar	Constitutief	Induceerbaar	Induceerbaar	Onbekend	Constitutief	Constitutief
Voornaamste species	<i>E. faecium</i> , <i>E. faecalis</i>	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecium</i> , <i>E. faecalis</i>	<i>E. faecium</i> , <i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecium</i>	<i>E. gallinarum</i> , <i>E. casseliflavus</i>
Gemodificeerd target	D-Ala-D-Lac	D-Ala-D-Lac	D-Ala-D-Lac	D-Ala-D-Lac	D-Ala-D-Ser	D-Ala-D-Ser	D-Ala-D-Ser	D-Ala-D-Ser	D-Ala-D-Ser

R, resistent; S, gevoelig; I, intermediair
Chr, chromosoom

2.4 Resistentie mechanisme

De synthese van peptidoglycaan bij de opbouw van de bacteriële celwand bestaat uit verschillende stappen (figuur 8). In het cytoplasma gebeurt de synthese van de precursoren van het peptidoglycaan N-acetylglycosamine (NacG) en N-acetylmuraminezuur (NacM). Vervolgens wordt aan het NacM een pentapeptide vastgehecht met als laatste twee aminozuren D-alanine (D-Ala). Deze rechtsdraaiende vorm van alanine wordt door een racemase gevormd uit het gewone L-alanine. Twee moleculen D-Ala worden aan elkaar gehecht via een ligase, waardoor het dipeptide D-Ala-D-Ala ontstaat, dat wordt aangehecht aan het reeds gevormde tripeptide door een D-alanine-D-alanine synthetase. Daarna wordt nog pentaglycine aangehecht en het geheel wordt door het cytoplasmatisch membraan getransporteerd, gebonden aan een undecaprenol lipide carrier. Tussen het cytoplasmatisch membraan en de celwand worden het NacM-pentapeptide en NacG ingebouwd in de groeiende glycaanketen. Tenslotte worden de lange glycaanketens onderling verbonden door transpeptidasen die de laatste D-Ala van de peptideketen afsplitsen en de rest verbinden aan het pentaglycine gedeelte van een nabijgelegen peptideketen.

Figuur 8. Schematische voorstelling van het werkingsmechanisme van glycopeptiden op de peptidoglycaan biosynthese (3)

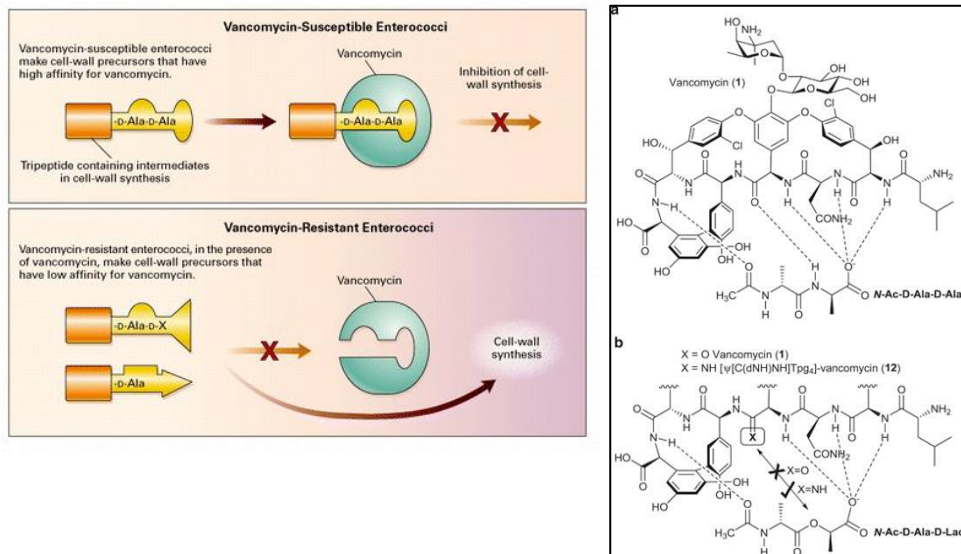


Glycopeptide antibiotica komen dus niet in het bacterieel cytoplasma maar worden gebonden aan de buitenoppervlakte van het cytoplasmamembraan, waar ze de synthese van peptidoglycaan inhiberen (figuur 8). De antibacteriële werking van vancomycine berust op een binding met hoge affiniteit aan de D-Ala-D-Ala C-terminus van het pentapeptide. Door hun hoog molecuulgewicht (1500-200 Da) blokkeren ze via een mechanisme van sterische hindering de transglycosylatie en de daaropvolgende cross-linking door transpeptidatie (3).

Resistentie tegen glycopeptiden berust op de productie van pentapeptide precursoren met een lage affiniteit eindigend op D-lactaat (VanA, VanB en VanD) of D-serine (VanC, VanE en VanG) (figuur 7), en de eliminatie van de normaal geproduceerde precursoren eindigend op D-Ala-D-Ala (3). Deze target-modificatie resulteert uit de coöperatie van verschillende enzymen die noodzakelijk zijn voor het reprogrammeren van de peptidoglycaansynthese, en worden gecodeerd door genen georganiseerd in een operon.

Het vervangen van D-Ala door D-Lac (figuur 9) resulteert in het verlies van een essentiële waterstofbinding en bijgevolg een 1000-malige vermindering in affiniteit en high-level resistentie (hoge MIC waarden) (figuur 10). De verandering van D-Ala tot D-Ser leidt slechts tot een 7-malige reductie in affiniteit en dus tot een lagere level van resistentie voor vancomycine (en dus lagere MIC waarden) (3, 18).

Figuur 9 (links) en 10 (rechts). Resistentiemechanisme van enterokokken tegen vancomycine (18-20)



2.5 Classificatie

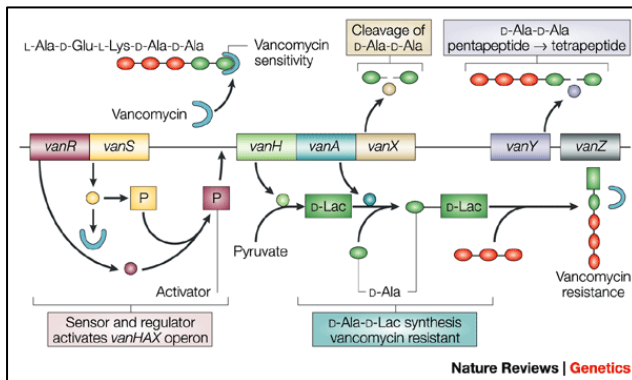
Classificatie van glycopeptide resistentie berust op de primaire sequentie van structurele genen voor de resistentie ligases eerder dan op de mate van resistentie tegen glycopeptiden. Dit komt doordat MIC waarden van vancomycine en teicoplanine voor de verschillende types kunnen overlappen. Hoewel de verschillende resistentietypes berusten op gelijkaardige enzymatische functies, kunnen ze onderscheiden worden op basis van de locatie van de corresponderende genen en de wijze van regulatie van genexpressie.

a) VanA glycopeptide resistentie

Het *vanA* gen en andere genen die betrokken zijn bij de regulatie en expressie van vancomycine resistentie (*vanH*, *vanX*, *vanY*, *vanR*, *vanS*, en *vanZ*, figuur 11), bevinden zich op een transposon (Tn1546), dat vaak voorkomt op plasmiden. Expressie van deze genen resulteert in de synthese van precursoren die eindigen in D-Ala-D-Lac in plaats van D-Ala-D-Ala.

Het *vanA* gen codeert voor een ligase (VanA) met een gewijzigde substratspecificiteit die de productie van D-Ala-D-Lac prefereert boven D-Ala-D-Ala. Het *vanA* gen kan op zichzelf niet leiden tot resistentie tegen vancomycine, vermoedelijk omdat D-hydroxyzuren zoals D-Lac niet aanwezig zijn in de omgeving noch geproduceerd worden door enterokokken. Dit is de rol van het *vanH* gen, dat codeert voor een D-hydroxyzuur dehydrogenase (VanH) dat een pool van D-Lac produceert door reductie van pyruvaat tot D-Lac. Resistentie komt echter nog niet tot expressie aangezien de synthese van wild-type precursoren primeert. Eliminatie van deze 'gevoelige' precursoren is de functie van *vanX*, die codeert voor een D, D-dipeptidase (VanX) die in staat is het dipeptide D-Ala-D-Ala te hydrolyseren, maar niet actief is tegen D-Ala-D-Lac. Het *vanY* gen codeert voor een D,D-carboxypeptidase (VanY) die de terminale D-Ala verwijdert van precursoren in geval van onvolledige eliminatie van het dipeptide door VanX. *vanR* en *vanS* behoren tot een systeem dat de transcriptie reguleert van het VanHAX gencluster. VanS is een histidine kinase die fungeert als sensor om de aanwezigheid van vancomycine te detecteren. VanR is de respons regulator, die zorgt voor de activatie van de transcriptie van VanH, VanA en VanX. Bij het VanA fenotype kan zowel vancomycine als teicoplanine de transcriptie induceren. Het *vanZ* gen tenslotte draagt bij tot de resistentie tegen teicoplanine via een onbekend mechanisme (3).

Figuur 11. Het VanA gencluster (21)



b) VanB glycopeptide resistentie

Het VanB proteïne is eveneens een ligase die de productie van een pentadepsipeptide eindigend op D-Ala-D-Lac prefereert, en is verwant aan het VanA ligase. Analoot aan het *vanA* operon zijn *vanH_B*, *vanS_B*, *vanY_B*, *vanR_B* en *vanS_B* beschreven. Deze genen bevinden zich eveneens op een transposon, Tn1547 of Tn5382. De mate van D,D-dipeptidase activiteit (VanX_B) correleert met de mate van vancomycine resistentie. Er is een hoge mate van sequentie-gelijkenis (67 à 76%) tussen VanHAX en VanH_B BX_B, maar een aanzienlijk lagere homologie (25 à 30%) tussen de R,S en Y proteïnen van VanA en VanB VRE. Tevens bestaat er een zekere heterogeniteit in het *vanB* gencluster, wat leidt tot het bestaan van drie subtypes van het *vanB* ligase gen: *vanB-1*, *vanB-2* en *vanB-3*. Het regulatiesysteem bij VanB stammen is ongevoelig voor induktie door teicoplanine. Teicoplanine induktieert dus de productie van VanA-gerelateerde proteïnen maar niet van VanB-gerelateerde proteïnen. Vancomycine daarentegen induktieert wel de synthese van resistentie-proteïnen van beide klassen, en als dus een teicoplanine-gevoelige enterokok met het *vanB* gencluster vooraf blootgesteld werd aan vancomycine, zal de stam ook resistent worden voor teicoplanine (17).

c) VanC glycopeptide resistentie

E. gallinarum, *E. casseliflavus* en *E. flavescens* zijn intrinsiek resistent tegen lage concentraties vancomycine, maar blijven gevoelig voor teicoplanine. Het *vanC-1* gen is kenmerkend voor *E. gallinarum*, *vanC-2* voor *E. casseliflavus* en *vanC-3* voor *E. flavescens*. Er is een hoge graad van homologie in de gensequenties van *vanC2* en *vanC3*. Het is bijgevolg moeilijk om een *E. casseliflavus* en *E. flavescens* van elkaar te onderscheiden, aangezien intergenetische regio's een hoge mate van overeenkomst vertonen. Drie proteïnen zijn noodzakelijk voor het VanC-type resistentie: VanT, een serine racemase; VanC, een ligase die de productie van een pentapeptide eindigend in D-Ala-D-Ser begunstigt; en Van XYC, met D-D-dipeptidase en D-D-carboxypeptidase activiteit waardoor hydrolyse optreedt van precursoren eindigend met D-Ala. Dit alles verzwakt de binding van vancomycine aan het pentapeptide. Analoot aan het *vanA* en *vanB* resistentie-mechanisme is de graad van resistentie afhankelijk van de verhouding D-Ala-D-Ala en D-Ala-D-Ser. Het *vanC* operon is chromosomaal gelokaliseerd en is niet overdraagbaar (17).

Op basis van *in vitro* studies werd de *in vivo* transfer van mobiele genetische elementen met vancomycine resistentiegenen (*van* genen) naar MRSA mogelijk geacht. Hoewel glycopeptide-resistente *Staphylococcus aureus* tot op vandaag niet erg succesvol bleek, kan de overdracht van de *van* genen van resistente enterokokken naar *Staphylococcus aureus* niet uitgesloten worden (3).

3. Detectie en screening

3.1 Detectie van VRE

De fenotypische detectie van vancomycine resistentie op isolaten is gebaseerd op de resultaten van de gevoeligheidsbepalingen bekomen d.m.v. MIC-bepalingen, disk diffusie methoden of breakpoint agars.

MIC-bepalingen worden uitgevoerd via agar dilutie, broth microdilutie, gradiënt MIC methoden of geautomatiseerde systemen. Huidige MIC-breekpunten van zowel EUCAST als CLSI worden weergegeven in tabel 1 (22-24). In figuur 12 worden de typische MIC waarden de klinisch meest belangrijke Van enzymen weergegeven. Het VanA fenotype wordt gekenmerkt door hoge MIC-waarden die gemakkelijk opgespoord kunnen. Het VanB fenotype daarentegen kent een variabele range van MIC-waarden, die gemist kunnen worden door Vitek 2 (25). Dit toont het belang aan van confirmatie d.m.v. een genotypische methode (23).

Tabel 1. EUCAST en CLSI glycopeptide breekpunten voor enterokokken (22, 24)

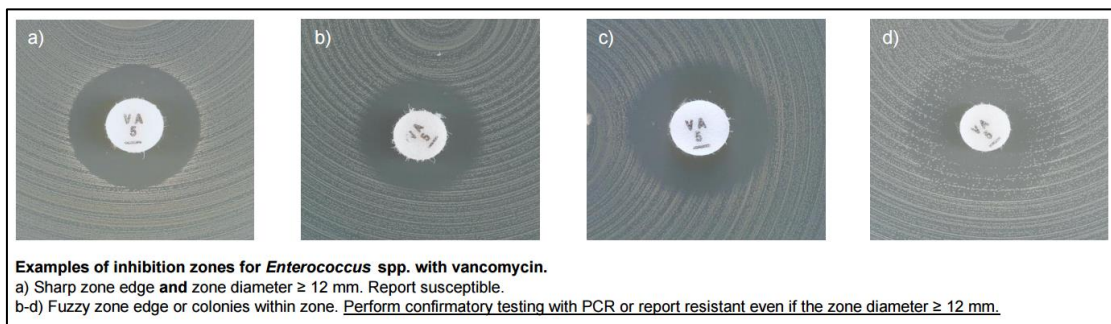
	EUCAST					CLSI						
	MIC (mg/L)		Disk lading	Zone diameter breukpunt (mm)		MIC (mg/L)			Disk lading	Zone diameter breukpunt (mm)		
	S	R		S	R	S	I	R		S	I	R
Vancomycine	≤4	>4	5	≥12	<12	≤4	8-16	≥32	30 µg	≥17	15-16	≤14
Teicoplanine	≤2	>2	30	≥16	<16	≤8	16	≥32	30 µg	≥14	11-13	≤10

Figuur. 12 Typische glycopeptide MIC waarden voor enterokokken met het VanA of VanB fenotype (23)

Glycopeptide	MIC (mg/L)	
	VanA	VanB
Vancomycin	64-1024	4-1024
Teicoplanin	8-512	0.06-1

Bij de disk diffusie methode moeten zones rond antibiotica-schijfjes geïnspecteerd worden op een onscherpe begrenzing en/of op ingroeïende kolonies. Isolaten met zowel een scherpe begrenzing als zone diameters boven het breukpunt kunnen gerapporteerd worden als zijnde gevoelig voor vancomycine. Isolaten met een onscherpe begrenzing of met ingroeïende kolonies kunnen als resistent beschouwd worden, afhankelijk van de zone-diameter. De richtlijnen raden aan te confirmeren met een moleculaire methode (figuur 13).

Figuur 13. EUCAST disk diffusie methode (22)



De breakpoint agar methode maakt gebruik van BHI agar met 6 µg/ml vancomycine. Hierbij wordt 10 µl van een 0.5 McFarland suspensie van de te testen kiem (dit komt overeen met 1×10^5 - 1×10^6 CFU) op de agar geënt en gedurende 24 uur geïncubeerd bij $35 \pm 1^\circ\text{C}$. Groei van meer dan één kolonie wordt als een positief resultaat beschouwd (22, 24, 26).

3.2 Screening naar VRE

3.2.1 Staalttype

Enterokokken behoren tot de commensale flora van de darm, waardoor rectale wissers en stoelgangsstalen algemeen beschouwd worden als het beste materiaal om patiënten te screenen op VRE-dragerschap (15).

De NVMM-richtlijn (15) raadt aan om gebruik te maken van rectale wissers. De richtlijn vermeldt daarentegen dat rectale wissers geassocieerd worden met een hoog percentage vals negatieve resultaten. De studie die geciteerd wordt suggereert dat rectale wissers slechts 60% van de met VRE-gekoloniseerde individuen kunnen opsporen. Deze resultaten moeten echter kritisch geïnterpreteerd worden. Deze studie uit 2002 gebruikte immers bevochtigde katoenen wissers, daar waar de huidige wissers (bv. eSwab) bestaan uit een flocked systeem uit nylon (27). Een hoog aantal vals negatieve resultaten zou verontrustend kunnen zijn omdat dit kan bijdragen tot een verdere toename in de prevalentie van VRE. De bevindingen in bovengenoemde studie werden echter niet elders in de literatuur gerapporteerd.

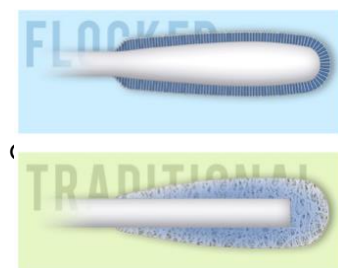
De NVMM-richtlijn vermeldt daarnaast een correlatie tussen de sensitiviteit van rectale wissers en de densiteit van VRE in stoelgang. Naarmate de densiteit toeneemt, wordt een hogere sensitiviteit bekomen (28).

Opgemerkt dient te worden dat weinig gecontroleerde studies bestaan die de sensitiviteit van rectale wissers voor screening naar VRE hebben nagegaan. Eén studie die vaak geciteerd wordt vond een sensitiviteit van 79% (29). De “gouden standaard” was het gecombineerde resultaat van rectale wissers en stoelgangsstalen afgenomen op een eerste dag. Via het percentage positieve wissers in de dagen die volgden, afgenomen bij patiënten die VRE-positief waren op de eerste dag met de “gouden standaard”, werd de sensitiviteit berekend. Opnieuw kunnen we opmerken dat deze studie uit 1996 vermoedelijk gebruik maakte van katoenen wissers. Deze studie vond wel 100% concordante resultaten tussen rectale en perirectale wisser. De auteurs concluderen dat de afname van een perirectale wisser mogelijk is bij neutropene patiënten, voor wie een interne rectale wisser tegenaangewezen is.

De CDC, HICPAC en de Society for Healthcare Epidemiologists of America Guidelines (SHEA) stellen dat zowel stoelgang, rectale en perirectale wissers sensitief zijn voor de detectie van VRE (30, 31). De Clinical Microbiology Procedures Handbook raadt het gebruik van feces aan. Er worden een aantal belangrijke argumenten weerhouden. Ten eerste zijn wissers vaak niet volledig doordrenkt met stoelgang. Met stoelgang kan dus vermoedelijk een hogere opbrengst verkregen worden dan met wissers. Ten tweede moeten rectale wissers correct afgenomen worden d.w.z. ze moeten 1 tot 2 cm in het rectaal kanaal ingebracht worden om stoelgang te collecteren. Deze procedure is invasief en wordt als onaangenaam ervaren bij patiënten. Naast feces kan er volgens de Clinical Microbiology Procedures Handbook ook een wisser afgenomen worden van wonden, mucosale oppervlakten, of van urine; de sensitiviteit is dan echter lager. Nasale wissers zijn geen geschikt staalttype (26).

Recent werd een nieuwe technologie geïntroduceerd voor de productie van wissers. Deze nieuwe “flocked wissers” worden geproduceerd via een gepatenteerd ‘spray-on’ systeem (figuur 14). In tegenstelling tot de traditionele vezels rond wattenstaafjes, hebben flocked swabs geen interne kern die materiaal vasthoudt. De nylon vezels van flocked swabs zijn gerangschikt in een loodrechte wijze, waardoor een dunne absorberende laag ontstaat met een open structuur. De vezels werken zoals een zachte borstel waardoor een verbeterde afname van cellulair materiaal mogelijk is. De aanwezigheid van het materiaal aan het oppervlak zorgt tevens voor een eenvoudiger en snellere elutie van het materiaal vanuit de wissers (32).

Figuur 14. Flocked wissers versus traditionele katoenen wissers



3.2.2 Sensitiviteit van de screeningsmethode

De sensitiviteit van screeningmethoden voor VRE is afhankelijk van een aantal controleerbare factoren zoals het staaltje (zie hierboven). Daarnaast is de sensitiviteit afhankelijk van een aantal niet-controleerbare factoren zoals de stoelgangsdensiteit (27, 28). *E. faecalis* en *E. faecium* komen in stoelgang voor in een densiteit variërend van 10^2 CFU/ml tot 10^8 CFU/ml (33). Recent antibioticagebruik wordt geassocieerd aan een hogere VRE-densiteit. Dit kan vervolgens leiden tot een hogere transmissie van VRE. Deze bevinding ondersteunt tevens de theorie van “kolonisatie resistentie”, waarbij de normale gastro-intestinale flora en in het bijzonder de anaeroben, verhinderen dat andere bacteriën de gastro-intestinale tractus koloniseren. Door de normale flora te eradiceren met antibiotica, kan de aanwezigheid van VRE bevorderd worden(34).

Tot slot is de sensitiviteit afhankelijk van de vancomycine concentratie gebruikt in cultuurbodems en in aanrijkmmedia alsook van de vancomycine MIC-waarde van het isolaat. Deze factoren hebben vooral een invloed hebben op de detectie VanB VRE, die gekenmerkt worden door lagere MIC waarden dan VanA VRE (28).

3.2.3 Staaltransport: hoelang

In de NVMM-richtlijn wordt het gebruik van een transportmedium zoals Amies (bv. eSwab) of Stuart aanbevolen. Stalen kunnen vervolgens bewaard worden bij 4-8°C indien ze niet onmiddellijk verwerkt worden (15).

3.2.4 Weigeren van stalen

De Clinical Procedures Microbiology Handbook keurt stalen af die fout gelabeld zijn, maar ook herhaaldelijke afnames bij eenzelfde patiënt binnen een korte tijdsperiode, aangezien VRE kolonisatie typisch van lange duur is (8). Screening na dekolonisatie is hier uiteraard een uitzondering op. Tot slot zouden rectale wissers zonder visuele aanwezigheid van stoelgang niet aanvaard mogen worden.

3.2.5 Screeningsmethoden ter detectie van VRE

3.2.5.1 Richtlijnen en tekstboeken

De Clinical Microbiology Procedures Handbook beschrijft twee procedures voor screening naar VRE in stoelgang. Enerzijds wordt een methode beschreven die gebruik gemaakt van gal esculine azide agar (Bile esculine azide, BEA) met een vancomycine (concentratie 6, 8 of 10 µg/ml), waarbij het staal geënt wordt op een cultuurbodem alsook in een aanrijkmmedium (BEA broth met vancomycine; concentratie niet vermeld). Anderzijds wordt een methode beschreven waarbij er gebruik gemaakt wordt van een chromogene bodem (CHROMagar VRE) (26). Vergeleken met de BEA methode, is de methode die gebruik maakt van een chromogene cultuurbodem minder arbeidsintensief. Bovendien worden resultaten sneller bekomen (figuur 15).

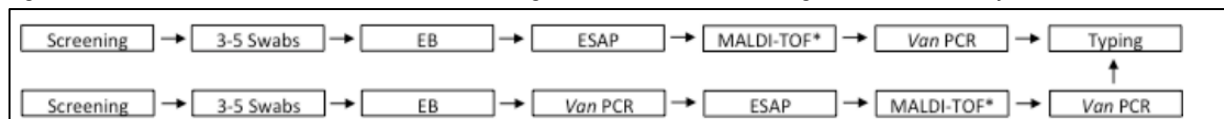
Figuur 15. Clinical Microbiology Procedures Handbook. Links: screening m.b.v. BEAv; Rechts: screening mbv chromogene agar(26)

A. Fecal VRE culture on BEA 1. Inoculation a. Process specimen not in VRE broth as soon as received. NOTE: Use of biosafety cabinet will avoid contamination of the culture or specimen as well as protect laboratory processing personnel. b. Inoculate first quadrant of vancomycin-containing BEA agar heavily with stool or swab; with a loop, streak in three other quadrants, as illustrated in Fig. 3.3.1-1. c. Inoculate VRE broth with a small amount of fecal specimen. 2. Incubate plate and broth at 35°C aerobically for up to 72 h. 3. Check agar plates daily. a. If brown-black color is diffused in medium, then consider it to be bile-esculin positive. Using a stereoscope, check for different morphotypes. With a plate marker, number the colonies, and Gram stain each. b. Subculture only gram-positive cocci to BAP. c. Incubate subculture at 35°C for 24 h. 4. Subculture turbid broth, if black, to vancomycin-containing BEA agar. Incubate for 24 h and subculture black colonies to BAP if they are gram-positive cocci on Gram stain. 5. Perform catalase and PYR tests on suspected colonies from BAP. Because of exposure to vancomycin, the PYR test might be negative; it should turn positive on a second subculture. 6. Lightly inoculate each different morphology of catalase-negative, PYR-positive, gram-positive cocci to 0.5 ml of BHI and incubate at 30°C for 2 h. Observe microscopically at $\times 400$ for motile cocci. a. Nonmotile organisms are considered to be VRE. b. Optionally, inoculate MGP broth. VRE do not produce a yellow color. c. A rapid D-xylose tablet test also differentiates <i>E. gallinarum</i>/<i>E. casseliflavus</i> from <i>E. faecium</i>/<i>E. faecalis</i> (11). d. Further species identification and antimicrobial susceptibility testing (AST) are necessary only if patient has not had a prior positive result (see Table 3.18.1-3). e. Notify caregiver of positive culture findings. f. Hold positive culture plates for at least 7 days.	B. Fecal VRE culture on CHROMagar VRE 1. Process the specimen as soon as received. NOTE: Use of a biosafety cabinet will avoid contamination of the culture specimen as well as protect laboratory processing personnel. 2. Inoculate the first quadrant of the agar heavily with stool or swab; with a loop, streak in three other quadrants, as illustrated in Fig. 3.3.1-1. 3. Incubate the chromogenic media for 18 to 24 h at 35°C before initially checking the plate for growth of mauve or blue colonies. If there is no growth on the chromogenic agar at 24 h, it should be reincubated for another day before reporting as negative for VRE after 48 h. 4. Pick mauve colonies (i.e., presumptive <i>E. faecium</i>) and perform a Gram stain to confirm as gram-positive cocci. Perform a group D typing and PYR to confirm as <i>Enterococcus</i> spp. 5. Pick blue-green colonies (i.e., presumptive <i>E. faecalis</i>) and perform a Gram stain to confirm as gram-positive cocci. Perform a group D typing and PYR to confirm as <i>Enterococcus</i> spp.
---	---

De NVMM richtlijn beschrijft een procedure bestaande uit een screeningsstap en een confirmatiestap (figuur 16). Er wordt aanbevolen om een aanrijkmiddel (enrichment broth, EB) te combineren met een selectieve cultuurbodem met 6 µg/ml vancomycine (*Enterococcus* selectieve agar plate, ESAP). Vervolgens kan species identificatie plaatsvinden d.m.v. MALDI-TOF MS of biochemische methoden. De confirmatiestap bestaat uit de genotypische detectie van het *vanA* of *vanB* gen via PCR(15).

Een andere mogelijkheid die de NVMM-richtlijn beschrijft bestaat uit het screenen naar de aanwezigheid van *vanA* en/of *vanB* genen in het aanrijkmiddel, om vervolgens de aanwezigheid van VRE te confirmeren m.b.v. cultuur en identificatie (MALDI-TOF MS). Bij VR *E. faecium* stammen die negatief zijn voor de *vanA/vanB* genotypische confirmatie dient gezocht worden naar andere vancomycine-resistentie genen(15).

Figuur 16. Laboratoriumdetectie van VRE via een screenings- en confirmatiemethode volgens de NVMM richtlijn



3.2.5.2 Beschikbare media en hun performantie

In de literatuur worden verschillende methoden beschreven voor de detectie van VRE op surveillancetalen. In regel worden kweekmethoden gebruikt. De aandacht gaat hierbij uit naar de verschillende cultuurbodem die gebruikt wordt voor de detectie van VRE, in bijzonder de samenstelling van de cultuurbodem en de incubatieduur. Wat betreft samenstelling kan een onderscheid gemaakt tussen media die selectief gemaakt worden voor VRE (oa. door toevoegen van vancomycine) en media die zowel selectief als differentieel zijn (chromogene media). Verder wordt er een onderscheid gemaakt tussen vaste cultuurbodems en vloeibare aanrijkmiddelmedia.

a) Vaste cultuurbodems

De NVMM richtlijn doet geen uitspraak over de exacte selectieve cultuurbodem die het laboratorium dient te gebruiken. Weliswaar geeft men voorbeelden van media die kunnen gebruikt worden. De richtlijn vermeldt bodems met gal, esculine en azide, waaraan aztreonam (25 µg/ml) en vancomycine (6 µg/ml) kan toegevoegd worden. Daarnaast worden chromogene bodems vermeld (15).

In de literatuur worden verschillende selectieve vaste cultuurbodems beschreven (figuur 17) voor de detectie van VRE zoals gal esculine agar met vancomycine (6 µg/ml) (**BEV**) en gal esculine azide agar met verschillende concentraties vancomycine (4,6, 8, 10 of 15 µg/ml) (**BEAv**). De commerciële bodem. Meer recent worden ook **chromogene bodems** van verschillende producenten gebruikt: ChromID™ VRE (bioMérieux), Brilliance™ VRE (Oxoid), VRESelect™ (Bio-Rad) , CHROMagar™VRE (BD Diagnostics), Spectra™VRE (Remel), Colorex™VRE (Alere) enz. Tot slot beschrijven enkele studies ook het gebruik van **Campylobacter agar**, aangezien deze bodem ook vancomycine bevat (8, 28, 35-48).

Figuur 17. Lijst van de commercieel beschikbare cultuurbodems voor isolatie van vancomycine resistente enterokokken (8)

TABLE 1 List of commercially available agar-based media for isolation of *Enterococcus*

Medium	Distributor	Vancomycin concn (µg/ml)	Organism: colony color	Reference(s)
Bile-esculin agar	Many	None	<i>Enterococcus</i> spp.: black	68, 72
Bile-esculin-azide agar	Many	None; 6/8	<i>Enterococcus</i> spp.: black	63, 90
Enterococcosel agar	Many	6/8	<i>Enterococcus</i> spp.: black	71, 83, 86, 88
Enterococcus selective agar (VSA)	Oxoid	6	<i>Enterococcus</i> spp.: brown with black zones around colonies	82
CHROMagar orientation	bioMérieux; Becton Dickinson	None	<i>Enterococcus</i> spp.: blue	87
CPS-ID-3	bioMérieux	None	<i>Enterococcus</i> spp.: turquoise	87
Brilliance VRE agar	Oxoid/Thermo Fisher Scientific	Not reported	<i>E. faecalis</i> : blue to light blue; <i>E. faecium</i> : navy blue (indigo), pink-purple	89, 90
ChromID VRE	bioMérieux	8	<i>E. faecalis</i> : green to blue; <i>E. faecium</i> : purple	67, 69, 73, 78, 79, 80, 84, 89
Spectra VRE	Remel/Thermo Fisher Scientific	6	<i>E. faecalis</i> : blue to light blue; <i>E. faecium</i> : pink to light purple or navy blue	84
HardyChrom VRE agar	Hardy Diagnostics	10	<i>E. faecalis</i> : dark red; <i>E. faecium</i> : blue	Package insert
VRESelect	Bio-Rad	8	<i>E. faecalis</i> : blue; <i>E. faecium</i> : pink	Package insert
Campy agar	Becton Dickinson; Remel/Thermo Fisher	10	<i>Enterococcus</i> spp.: similar to colonies on regular blood agar media	84

Er zijn slechts enkele studies voorhanden die op systematische en prospectieve wijze meerdere cultuurbodems hebben vergeleken. De resultaten van deze studies suggereren dat het gebruik van een chromogene cultuurbodem de sensitiviteit, alsook de specificiteit verhoogt in vergelijking met selectieve, niet-chromogene media (bv BEAv agar, *Campylobacter* agar). Geen enkele chromogene cultuurbodem is echter duidelijk superieur te noemen. Verschillende studies ondervonden een significante doorgroei van gisten, Gramnegatieve bacillen, en andere kiemen, doch minder dan bij gal esculine bodems. Bovendien kunnen doorgroeiende kiemen op chromogene bodems gemakkelijk onderscheiden worden van VRE (28, 35, 43).

Deze studies kunnen moeilijk onderling vergeleken worden (zie bijlage) door o.a. het hanteren van verschillende definities voor VRE (bv. o.b.v. vancomycine MIC en/of PCR voor *van* genen), het gebruik van verschillende protocollen als 'gouden standaard', het gebruik van verschillende staaltypes (stoelgang versus rectale wissers), het aantal geanalyseerde stalen, het al dan niet gebruiken van een aanrijkingsmedium, het gebruik van verschillende inclusiecriteria voor de studiepopulatie (o.a. onderzoek bij stoelgang met aanvraag voor analyse van *C. difficile*), een verschillende epidemiologie (*vanA* versus *vanB*), etc. Wat betreft het staaltypen evalueerde een recente studie vijf chromogene bodems voor de detectie van VRE uit stoelgang. Na afloop gebeurde een validatie voor rectale wissers, met het bekomen van gelijkaardige resultaten (36).

De incubatietijd van de cultuurbodems beïnvloedt de opbrengst aan VRE. Naarmate men de media langer incubiert verhoogt de opbrengst (28, 35, 37, 39, 43-47, 49). In de meeste studies werden de chromogene cultuurbodems voor minstens 48 uur geïncubeerd. Ook de NVMM richtlijn raadt aan chromogene media 48u te incuberen (15).

VanB VRE kunnen een brede waaier aan MIC waarden vertonen, zelfs onder het breekpunt voor gevoeligheid (4 µg/ml). Een lage sensitiviteit voor de recovery van *vanB* VRE met lage MIC waarden werd reeds aangetoond in meerdere studies (25, 50). De sensitiviteit in deze studies varieerde van 94% tot 98%. Het is dus aannemelijk dat de vancomycine concentratie die gebruikt wordt in de commercieel beschikbare chromogene media, boven de MIC waarde van bepaalde isolaten kan liggen, met als gevolg het missen van die isolaten.

b) Aanrijkingsmedia

De NVMM richtlijn raadt het gebruik aan van een selectief aanrijkingsmedium. De richtlijn meldt dat geen definitieve aanbevelingen gedaan kunnen worden over de samenstelling van een selectief aanrijkingsmedium. Aanpassingen moeten gemaakt worden in functie van de lokale epidemiologie: zo wordt voor de detectie van *vanB* VRE aanbevolen geen vancomycine toe te voegen. Men vermeldt een gal esculine azide aanrijkingsmedium met vancomycine (6µg/l) waaraan eventueel amoxicilline (16 µg/ml) kan toegevoegd worden, gezien VRE uitbraken vaak veroorzaakt worden door amoxicilline-resistente enterokokken. Daarenboven inhibeert amoxicilline de groei van anaerobe kiemen zoals *Clostridium*, het meest relevante species die *vanB* genen kan bezitten (15).

In de literatuur worden verschillende aanrijkingsmedia beschreven: gal esculine azide met vancomycine (Esculine vancomycine broth, EVB) in verschillende concentraties (4, 6 of 8 µg/ml), Brain Heart Infusion (BHI), BHI met verschillende concentraties vancomycine (3, 6, of 30µg/ml), gal broth met vancomycine (3 µg/ml), colistine (5 µg/ml) en amfotericine B (50µg/ml) (8, 28, 36-39).

B. Praktisch luik

Momenteel is er in het AZ Groeninge geen specifieke screeningsmethode voor VRE in gebruik. Op basis van voorgaande literatuurstudie willen wij chromogene media implementeren, al dan niet in combinatie met een selectief aanrijkmiddel.

De laatste jaren komen er steeds meer chromogene cultuurmedia op de markt die een snelle identificatie van micro-organismen in klinische stalen mogelijk maken. Deze cultuurmedia detecteren specifieke microbiële enzymen aan de hand van chromogene enzymsubstraten geïncorporeerd in een vaste agar matrix. In tegenstelling tot conventionele media zoals bloedagar, laten chromogene media directe identificatie toe van pathogenen op basis van koloniekleur en -morfologie. De belangrijkste voordelen van deze media zijn dat ze **tijd- en reagentia besparend** zijn door het rechtstreeks aantonen van target micro-organismen. Bovendien hebben ze een **verhoogde sensitiviteit** doordat gekleurde kolonies gemakkelijk onderscheiden kunnen worden tussen de overige flora. Ook kunnen we zeggen dat er een **verhoogde selectiviteit** is omdat de commensale flora minder goed kan groeien dan op conventionele media..

De chromogene voedingsbodems die geëvalueerd werden zijn **ChromID™VRE** (bioMérieux), **Brilliance™VRE** (Oxoid) en **VRESelect™** (Bio-Rad). Deze media verschillen wat betreft chromogene substraten, antibiotica formulaties en/of concentraties, factoren die een invloed kunnen hebben op de sensitiviteit en specificiteit. In deze CAT werd bovendien de performantie van **Campylobacter agar** (Campylosel, bioMérieux) nagegaan. Enkele studies beschrijven het gebruik van *Campylobacter* agar, die vancomycine bevat, als betrouwbaar screeningmedium voor de detectie van VRE in stoelgangsstalen (44, 48). Er werd dus nagegaan of *Campylobacter* agar, die in de routine reeds gebruikt wordt voor de detectie van *C. jejuni* en/of *C. coli*, voor hetzelfde doel kan gebruikt worden als de chromogene bodems. Een belangrijk voordeel van *Campylobacter* agar is de lagere kostprijs.

Leuconostoc, *Pediococcus* en *Lactobacillus* zijn intrinsiek resistent zijn tegen vancomycine en kunnen voorkomen in stoelgang. Deze micro-organismen kunnen dan ook doorgroeien op bovengenoemde bodems (51, 52).

1.1 Kenmerken van de gebruikte bodems

1.1.1 Chromogene bodems

1.1.1.1 ChromID™ VRE (bioMérieux)(52)

ChromID™ VRE is een selectieve chromogene bodem die de differentiatie van VR *E. faecium* en VR *E. faecalis* mogelijk maakt. Deze bodem is geschikt voor zowel stoelgangsstalen als rectale wissers (bij voorkeur flocced wissers in een vloeibaar transportmedium). De stalen kunnen direct op de bodem geënt worden of na overnacht (18-24u) aanrijking in een vloeibaar medium voor een betere detectie van vanB VRE. Het voorgestelde aanrijkmiddel is BHI met 3.3 µg/ml vancomycine (bekomen door toevoeging van een vancomycine schijfje van 30 µg aan 9ml BHI)

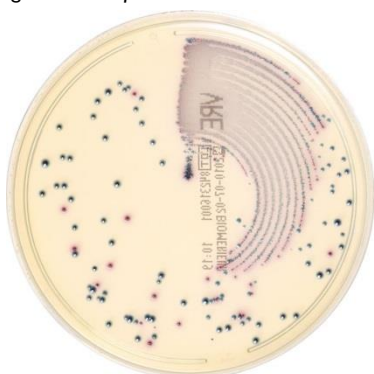
De identificatie van de VRE stam is gebaseerd op de splitsing van de chromogene substraten door specifieke enzymatische activiteiten van *E. faecium* en *E. faecalis*. Productie van β-galactosidase door *E. faecium* leidt tot vorming van violette kolonies en productie van α-glucosidase door *E. faecalis* leidt tot een blauw-groene koloniekleur.

Na een incubatieperiode van 24u bij 37 °C kan ChromID™ VRE afgelezen worden. Bij een negatief resultaat na 24u incubatie (geen groei of geen kleur), dient de bodem een additionele 24u geïncubeerd te worden. De interpretatie wordt weergegeven in tabel 1 en figuur 1. Nutriënt capaciteit en selectiviteit van het medium wordt getest met ATCC-stammen in tabel 2.

Tabel 1. Interpretatie van ChromID VRE (bioMérieux)

Resultaat na 24-28 uur incuberen bij 37°C	Interpretatie	Aangeraden opvolgende acties
Violette kolonies	VR <i>E. faecium</i>	Confirmeren dat kolonies Grampositieve kokken zijn
Blauw-groene kolonies	VR <i>E. faecalis</i>	Confirmeren dat kolonies Grampositieve kokken zijn

Figuur 1. Interpretatie van ChromID™ VRE (bioMérieux)



Tabel 2. QC stammen

Stam	Resultaat bij 33-37 °C
<i>E. faecium</i> (vanA) ATCC®700221	Groei en violette kleur binnen 24u
<i>E. faecalis</i> (vanB) ATCC®51299	Groei en blauw-groene kleur binnen 24u
<i>E. faecalis</i> ATCC®29212	Geen groei na 48u

1.1.1.2 Brilliance™ VRE (Oxoid)(53)

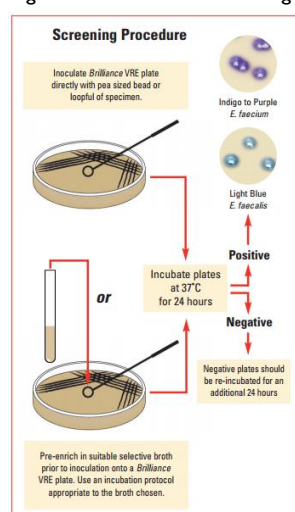
Brilliance™ VRE is eveneens een selectieve chromogene bodem die de differentiatie van VR *E. faecium* en VR *E. faecalis* mogelijk maakt. Deze bodem is geschikt voor het enten van stoelgang, rectale wissers, individuele kolonies of vanuit een vloeibare suspensie van het te onderzoeken micro-organisme. De stalen kunnen direct op de bodem geënt worden of na aanrijking in een selectief medium.

Opnieuw berust identificatie van de VRE stam op het splitsen van chromogene substraten door specifieke enzymatische activiteiten van *E. faecium* en *E. faecalis*. De productie van fosfatase door *E. faecium* en *E. faecalis* resulteert in de vorming van lichtblauwe kolonies. *E. faecium* produceert daarnaast het enzym α -galactosidase, met als gevolg de productie van blauwe én roze chromoforen in de bacterie waardoor indigo-paars gekleurde kolonies gevormd worden. Na een incubatieperiode van 24u bij 37 °C kan de Brilliance™ VRE afgelezen worden. Bij een negatief resultaat na 24u incubatie kan de bodem een additionele 24u geïncubeerd te worden. De interpretatie wordt weergegeven in tabel 3 en figuur 2. Kwaliteitscontrole gebeurt met ATCC-stammen vermeld in tabel 4.

Tabel 3. Interpretatie van Brilliance™ VRE (bioMérieux)

Resultaat na 18-24 uur incuberen bij 37°C	Interpretatie	Aangeraden opvolgende acties
Indigo-paarse kolonies	VR <i>E. faecium</i>	/
Licht blauwe kolonies	VR <i>E. faecalis</i>	/

Figuur 2. Procedure voor enting van Brilliance™ VRE agar (Oxoid) en interpretatie van kolonietypes



Tabel 4. QC stammen

Stam	Resultaat bij 33-37 °C
<i>E. faecalis</i> (VRE) ATCC®51299	Goede groei: licht-blauwe kolonies
<i>E. faecalis</i> (VRE) ATCC®12201	Goede groei: licht-blauwe kolonies
<i>E. faecium</i> (VRE) ATCC®12202	Goede groei: indigo-paarse kolonies
<i>E. faecalis</i> ATCC®35667	Geen groei
<i>E. faecium</i> ATCC®19433	Geen groei
<i>E. gallinarum</i> ATCC®700425	Geen groei

1.1.1.3 VRESelect™ (Bio-Rad)(51)

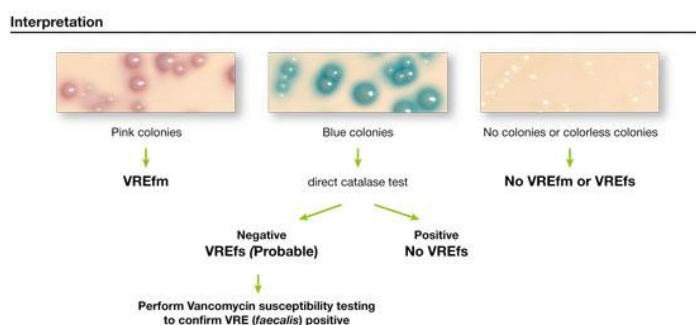
Ook de VRESelect™ is een selectieve chromogene bodem die de differentiatie van VR *E. faecium* en VR *E. faecalis* mogelijk maakt. Deze bodem is geschikt voor zowel stoelgangsstalen als rectale wissers, die direct op de bodem geënt kunnen worden. Als alternatief kan stoelgang (0.5g) of een wisser in 0.5 ml saline gebracht worden waarna gedurende 20s gevortexd wordt. Vervolgens wordt 10-50 µl van de suspensie m.b.v. een wisser of een entnaald op de bodem geënt. Aanbevolen transportmedia zijn Amies zonder houtskool, Cary Blair en LQ Stuart.

De identificatie van de VRE stam berust ook hier op het splitsen van de chromogene substraten door specifieke enzymatische activiteiten van *E. faecium* en *E. faecalis*. Na een incubatieperiode van 24-28u bij 35-37 °C kan de VRESelect™ afgelezen worden. De interpretatie wordt weergegeven in tabel 5 en figuur 3. Kwaliteitscontrole gebeurt met ATCC-stammen vermeld in tabel 6. Van de ATCC stammen dient een 0.5 McFarland suspensie gemaakt te worden, die vervolgens 1:10 verdund wordt. Van deze suspensie wordt uiteindelijk 10 µl geënt op de bodem. De laagste concentratie van VRE die betrouwbaar gedetecteerd kan worden door de VRESelect™ is 10³ CFU/ml.

Tabel 5. Interpretatie van VRESelect™ (Bio-Rad)

Resultaat na 24-28 uur incuberen bij 35-37°C	Interpretatie	Aangeraden opvolgende acties
Roze kolonies	VR <i>E. faecium</i>	Rapporteer VREfm kolonisatie
Blauwe kolonies	VR <i>E. faecalis</i>	Voer katalase test uit *katalase - → doe een gevoeligheidsbepaling *katalase + → geen VRE
Geen kolonies of kleurloze kolonies	Geen VRE	Rapporteer geen VRE isolatie

Figuur 3. Interpretatie van VRESelect™ (Bio-Rad)



Tabel 6. QC stammen VRESelect™ (Bio-Rad)

Stam	Resultaat bij 35-37°C
<i>E. faecium</i> ATCC®700221	Kleine roze kolonies na 24-28u
<i>E. faecalis</i> ATCC®51299	Kleine blauwe kolonies na 24-28u
<i>E. faecalis</i> ATCC®29212	Geen groei na 24-28u

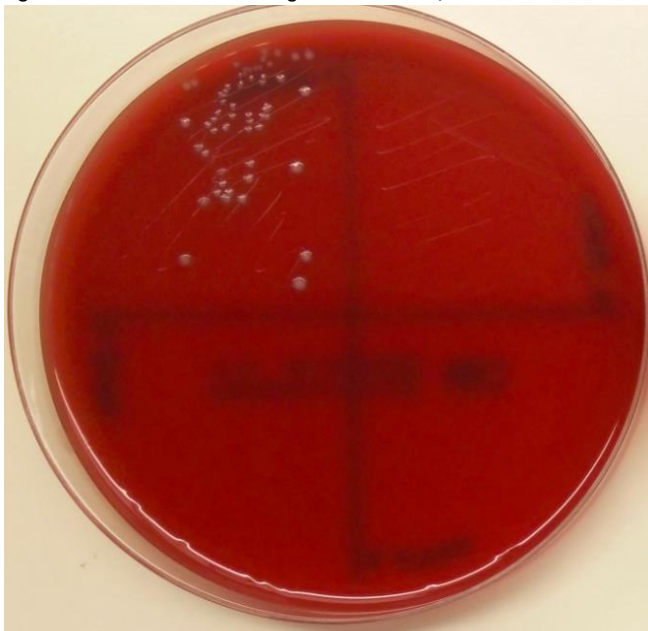
1.1.2 *Campylobacter* agar (*Campylosel*, bioMérieux)

Campylobacter agar wordt gebruikt voor de selectieve isolatie van *C. jejuni/C. coli* uit stoelgang. *Campylosel* (bioMérieux) is samengesteld uit Columbia agar met 5% schapenbloed en bevat volgende antibiotica: vancomycine (10 µg/ml), amfotericine B (3 µg/ml) en cefoperazone (32 µg/ml). De aanwezigheid van vancomycine in de bodem laat toe om VRE te detecteren. Bovendien is de bodem in staat de meeste fecale flora te inhiberen, wat de selectiviteit ten goede komt. De hoge concentratie aan vancomycine zorgt voor een goede inhibitie van VanC type stammen. Hiertegenover staat echter een mogelijks verminderde gevoeligheid voor detectie van VanB type stammen met MIC waarden rond 8 µg/ml (48).

Studies omtrent detectie van VRE in stoelgang met *Campylobacter* agar beschrijven de groei van *Lactobacillus* spp. in 10% van de stalen (48). Dit kan leiden tot vals positieve resultaten gezien de gelijkenissen in koloniemorfologie met enterokokken. Door een 2 µg clindamycine schijfje op de entplaats te plaatsen of door het aanbrengen van een clindamycine oplossing aan het oppervlak van de agar kan de groei van lactobacillen geremd worden terwijl VRE kunnen groeien(54). Een andere, volgens de auteurs meer omslachtige methode om lactobacillen van enterokokken te onderscheiden is door Gramkleuring.

In deze CAT werd de *Campylobacter* agar geïncubeerd bij 35-37°C en in aanwezigheid van 5% CO₂. De bodem werd een eerste maal afgelezen na 24u incubatie en een tweede maal na 48u incubatie. De detectie van VRE berustte op het inspecteren van de bodem op kolonietypes die een gelijkenis vertonen met de gekende typische enterokokken groei op Trypticase Soy Agar met 5% paardenbloed (TSH) (figuur 4). Verdachte kolonies werden geïdentificeerd met MALDI-TOF MS en indien nodig werd een Gramkleuring gemaakt.

Figuur 4. Kwadrant linksboven: groei van VR *E. faecium* ATCC® 70022 (*vanA*) na 48u incubatie (eigen foto)

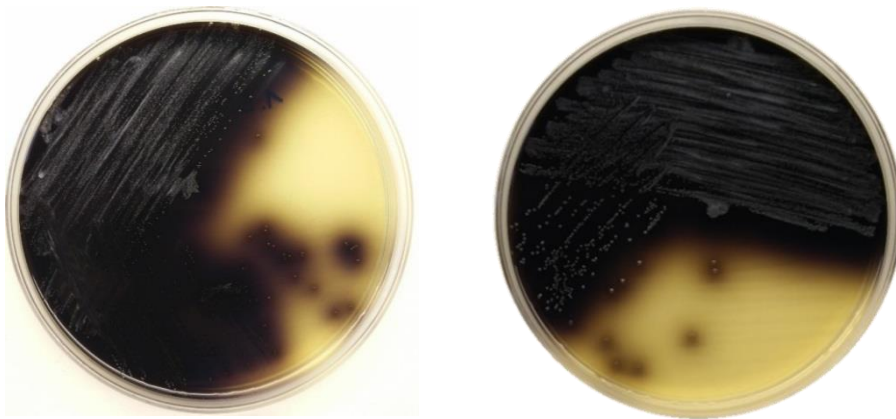


1.1.3 Gal esculine agar met vancomycine (BEAv)

Voordat chromogene media beschikbaar waren, was gal esculine agar met vancomycine de standaardbodem voor VRE screening. Enterokokken groeien als donkerbruine tot zwarte kolonies door hun vermogen tot hydrolyse van esculine. Groei van vancomycinegevoelige enterokokken wordt geremd door de toevoeging van vancomycine aan de bodem (figuur 5). Uitgaande van commercieel beschikbaar gal esculine poeder (Bio-Rad) werd een gal esculine bodem in huis bereid, waaraan vancomycine toegevoegd werd om een finale concentratie te bekomen van 6 µg/ml.

De zwartverkleuring van de bodem kan echter ook een nadeel zijn. Door deze achtergrondkleur zijn kolonies moeilijk van elkaar te onderscheiden. Bovendien beschrijven studies omtrent detectie van VRE in stoelgang doorgroei van *Lactobacillus*. Dit kan leiden tot vals positieve resultaten gezien de lactobacillen esculine kunnen hydrolyseren(48).

Figuur 5 : Links: groei VR *E. faecium* ATCC® 70022 (vanA), na 48u incubatie. Rechts: groei VR *E. faecalis* ATCC® 51299 (vanB), na 48u incubatie (eigen foto)



1.1.4 Aanrijkingsmedium

Op basis van de literatuur en de bijsluiter van ChromID™VRE werd gekozen voor BHI met 3.3 µg/ml vancomycine als aanrijkingsmedium (52). Er werd gebruik gemaakt van Brain Heart Infusion poeder (BD) waaraan twee schijfjes vancomycine 5 µg toegevoegd werden om een eindconcentratie van 3.3 µg/ml vancomycine te bekomen per BHI-tube van 3ml.

1.2 Validatie

Een volledige validatie werd uitgevoerd van de chromogene bodems die in aanmerking komen voor detectie van VRE in screeningsstalen (ChromID™ VRE, Brilliance™ VRE en VRESelect™). De validatie gebeurde volgens een eigen opgesteld protocol oa. gebaseerd op documenten CLSI (document M22-A3)(55-57). Vooreerst werden de eigenschappen van de bodems getest met ATCC stammen (American Type Culture Collection, Manassas, VA). Vervolgens werden 12 gekarakteriseerde enterokokken stammen (8 VR *E. faecium*, 1 VR *E. faecalis*, 2 *E. gallinarum* en 1 *E. casseliflavus*) gespiked in stoelgang om de performantie van de drie chromogene bodems en van *Campylobacter* agar te bepalen (58). Daarnaast werd de reproduceerbaarheid van de bodems nagegaan, alsook de performantie van MALDI-TOF MS voor de directe identificatie van stammen op de chromogene bodems. Tot slot werd een kleine prospectieve klinische vergelijkingsstudie uitgevoerd tussen de vier bodems. Een houdbaarheidsstudie gebeurde in de week van de vervaldatum.

Alle bodems werden (i.t.t. aanbevelingen van de productfiche) voor 48 geïncubeerd. ChromID™ VRE, Brilliance™ VRE en VRESelect™ werden een eerste maal afgelezen na 24u en een tweede maal na 48u. VRESelect™ werd bovendien tussentijds afgelezen na 28u (volgens productfiche).

1.2.1 Selectiviteit

De selectiviteit is een maat voor zowel de inclusiviteit als de exclusiviteit van een bodem. Met de inclusiviteit wordt nagegaan of de voedingsbodem de groei van micro-organismen toelaat die opgespoord worden. Met de exclusiviteit wordt nagegaan of de groei van andere micro-organismen geremd wordt.

De geteste micro-organismen werden gekozen op basis van productfiches van de verschillende media (zie tabel 2,4,6 en 7). Om interferentie van non-target organismen na te gaan, werden enkele stammen geselecteerd, 'challenge' stammen, die in stoelgang kunnen voorkomen en/of waarvan in de literatuur beschreven wordt dat ze vaak doorgroeien (zie tabel 7). De stammen werden geënt op de drie chromogene bodems (ChromID™ VRE, Brilliance™ VRE, VRESelect™), op *Campylobacter* agar en BEAv. Een niet-selectieve voedingsbodem (TSH) werd gebruikt als groeicontrolle en voor de bepaling van het kiemgetal.

Tabel. 7 Stammen gebruikt voor de selectiviteitsstudie

Micro-organisme	Inoculum	Incubatie	Verwachte resultaten
Enterokokken			
<i>E. faecium</i> ATCC® 700221 (vanA)	10 ¹ -10 ² CFU	35±2°C, aeroob, 24-48u	Groei
<i>E. faecalis</i> ATCC® 51299 (vanB)	10 ¹ -10 ² CFU	35±2°C, aeroob, 24-48u	Groei
<i>E. gallinarum</i> ATCC® 700425 (vanC1)	10 ¹ -10 ² CFU	35±2°C, aeroob, 24-48u	Geen groei
<i>E. faecium</i> ATCC® 35667	10 ¹ -10 ² CFU	35±2°C, aeroob, 24-48u	Geen groei
<i>E. faecalis</i> ATCC® 19433	10 ¹ -10 ² CFU	35±2°C, aeroob, 24-48u	Geen groei
<i>E. faecalis</i> ATCC® 29212	10 ¹ -10 ² CFU	35±2°C, aeroob, 24-48u	Geen groei
'Challenge' stammen			
<i>E. coli</i> ATCC® 25922	10 ³ -10 ⁴ CFU	35±2°C, aeroob, 24-48u	Geen groei
<i>P. aeruginosa</i> ATCC® 27853	10 ³ -10 ⁴ CFU	35±2°C, aeroob, 24-48u	Geen groei
<i>C. glabrata</i> QC micro M 13554	10 ³ -10 ⁴ CFU	35±2°C, aeroob, 24-48u	Geen groei
<i>S. aureus</i> ATCC® 29213	10 ³ -10 ⁴ CFU	35±2°C, aeroob, 24-48u	Geen groei
<i>K. pneumoniae</i> ATCC® BAA1705 (KPC)	10 ³ -10 ⁴ CFU	35±2°C, aeroob, 24-48u	Geen groei

Een gestandaardiseerde suspensie van een QC stam is een betere 'challenge' dan directe inoculatie om de performantie van bodems na te gaan. Hierbij detecteert een lichtere suspensie het vermogen van een bodem om adequaat groei te ondersteunen. Anderzijds test een meer geconcentreerde suspensie de capaciteit van selectieve media om groei van bepaalde micro-organismen te remmen. Op basis van dit principe werd ervoor gekozen om 10¹-10² CFU als inoculum te gebruiken voor enterokokken en 10³-10⁴ CFU voor andere micro-organismen (zie tabel 7). Parallel werd hetzelfde inoculum in het aanrijkingsmedium gebracht. Na overnacht incubatie (18-24u, 35-37°C) werd hieruit 10 µl geënt op alle bodems. Op een niet selectieve voedingsbodem (TSH) gebeurde opnieuw een groeicontrolle en werd het kiemgetal bepaald. De bekomen resultaten worden weergegeven in tabel 8 en 9. Een legende wordt weergegeven in figuur 6.

Figuur 6. Legende voor de interpretatie van resultaten in tabel 8 en tabel 9

Beoordeling chromogene bodems:	
GC	Groei VRE, correcte koloniekleur volgens productfiche
GF	Groei van VRE, niet de correcte koloniekleur volgens productfiche
C/A	Groei non-VRE, herkenbaar geen VRE via koloniekleur
GG	Geen groei van VRE
Beoordeling Campylobacter agar en BEAv:	
G	Groei van VRE, identificatie via MALDI-TOF MS
GG	Geen groei van VRE
N	Geen groei van non-VRE
A	Groei non-VRE, te onderscheiden van VRE via koloniemorfologie en/of identificatie MALDI-TOF MS en/of Gramkleuring

Tabel 8. Resultaten directe enting

Stam	QC	1.ChromID VRE		2.Brilliance VRE		3.VRESelect			4.Campylosel		5.Gal-esculine		TSH
		24u	48u	24u	48u	24u	28u	48u	24u	48u	24u	48u	
<i>E. faecium</i> ATCC 700221 (VRE)	1, 3	GC	GC	GC	GC	GF	GF	GC	G	G	GC	GC	40
<i>E. faecalis</i> ATCC 51299 (VRE)	1,2,3	GC	GC	GC	GC	GC	GC	GC	GG	GG	GC	GC	73
<i>E. gallinarum</i> ATCC 700425	2	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	A	86
<i>E. faecium</i> ATCC 35667	2	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	54
<i>E. faecalis</i> ATCC 19433	2	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	43
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	1,3	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	46
<i>E. coli</i> ATCC 25922		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	>1000
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	>1000
<i>C. glabrata</i> QC micro M 13554		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	>1000
<i>S. aureus</i> ATCC 29213		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	>1000
<i>K. pneumoniae</i> BAA1705 (KPC)		N	N	N	N	N	N	N	A	A	N	N	>1000

Tabel 9. Resultaten na overnacht aanrijking

Stam	QC	1.ChromID VRE		2.Brilliance VRE		3.VRESelect			4.Campylosel		5.Gal-esculine		TSH
		24u	48u	24u	48u	24u	28u	48u	24u	48u	24u	48u	
<i>E. faecium</i> ATCC 700221 (VRE)	1, 3	GC	GC	GC	GC	GC	GC	GC	G	G	GC	GC	>1000
<i>E. faecalis</i> ATCC 51299 (VRE)	1,2,3	GC	GC	GC	GC	GC	GC	GC	GG	GG	GC	GC	>1000
<i>E. gallinarum</i> ATCC 700425	2	N	N	N	N	N	N	N	N	N	A	A	>1000
<i>E. faecium</i> ATCC 35667	2	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	0
<i>E. faecalis</i> ATCC 19433	2	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	0
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	1,3	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	0
<i>E. coli</i> ATCC 25922		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	>1000
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	>1000
<i>C. glabrata</i> QC micro M 13554		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	>1000
<i>S. aureus</i> ATCC 29213		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	>1000
<i>K. pneumoniae</i> BAA1705 (KPC)		C/A	C/A	N	N	C/A	C/A	C/A	A	A	N	N	>1000

Conclusie

- Alle VRE stammen die dienden te groeien groeiden binnen het normale tijdsinterval met de te verwachten koloniegrootte, morfologie en kleur op ChromID VRE en Brilliance™ VRE.
- Na incubatie gedurende 28u op VRESelect™ agar produceerden kolonies van VR *E. faecium* ATCC 700221 (*vanA*) niet de karakteristieke kleur. Indien men zich houdt aan de instructies van de fabrikant (nl. incubatie tot max. 28u), zou dit micro-organisme bijgevolg gemist kunnen worden.
- Na aanrijking konden alle VRE stammen reeds na 24u incubatie correct afgelezen worden.
- Uit de resultaten blijkt dat er een aanzienlijk hogere opbrengst is wanneer aanrijking wordt uitgevoerd.
- VR *E. faecalis* ATCC 51299 (*vanB*) groeide niet op *Campylobacter* agar. Dit kan mogelijks verklaard worden door de hogere concentratie van vancomycine in de agar of een lagere MIC-waarde van het isolaat.
- Non-VRE enterokokken groeiden niet door op de chromogene bodems. *K. pneumoniae* (KPC) kolonies groeiden na aanrijking op de chromogene media en *Campylobacter* agar, maar waren gemakkelijk te onderscheiden van VRE kolonies o.b.v. koloniekleur en morfologie, zoals beschreven in de productfiches.
- Er werd steeds een correct kiemgetal bekomen. Na aanrijking werden enkel vancomycine gevoelige enterokokken (vancomycine susceptible enterococci, VSE) geïnhibeerd.

1.2.2 Vergelijkingsstudie

Een vergelijkende studie van de bodems werd uitgevoerd op 2 soorten stalen. Enerzijds werden gekarakteriseerde VRE stammen van het UZ Brussel en het AZ Groeninge gespiked in stoelgang. Anderzijds werden klinische stalen uit de routine getest op aanwezigheid van VRE. Zowel stoelgangsstalen als rectale wissers werden geselecteerd. Hierbij werden enkel stoelgangsstalen verzameld uit de routine waarbij opsporing van *C. difficile* aangevraagd was. Rectale wissers waren afkomstig van screeningsstalen voor CPE uit de routine.

Alle stoelgangsstalen werden geënt zoals in de routine. Hierbij werd met een katoenen wisser een hoeveelheid feces op de verschillende bodems gebracht en verder uitgeplaat om afzonderlijke kolonies te bekomen. Met dezelfde wisser werd een hoeveelheid feces (± 200 mg) in de aanrijkingsbodem gebracht. Na overnacht incubatie werd het aanrijkingmedium manueel gevortexd waarna 10 μ l geënt werd op de verschillende bodems.

Rectale wissers in Amies transportmedium (eSwab, Copan) werden bij ontvangst beoordeeld op visuele aanwezigheid van stoelgang. De stalen werden vervolgens door de WASP gevortexd gedurende 15s, waarna 10 μ l geënt werd op de verschillende bodems en 30 μ l in het aanrijkingsmedium. Na overnacht incubatie werd het aanrijkingmedium manueel gevortexd waarna 10 μ l geënt werd op de verschillende bodems.

De verschillende bodems werden beoordeeld op recovery van de verschillende gespikede VRE isolaten in stoelgang. Daarnaast werden de bodems geëvalueerd wat betreft heterogeniteit van de gegroeide kolonies en het onderdrukken van fecale flora.

1.2.2.1 Spiking experiment

Stoelgangsstalen met een lage consistentie uit de routine werden getest op aanwezigheid van VRE m.b.v. BEAv agar en *Campylobacter* agar. Drie negatieve stalen werden gepoold om een homogene fecale suspensie te bekomen. Hieraan werd elk test isolaat (zie tabel 10) toegevoegd om een concentratie te bekomen van 10^3 - 10^4 CFU/ml feces. De bekomen resultaten worden weergegeven in tabel 11 en 12. Een legende wordt weergegeven in figuur 7.

Tabel 10. Karakteristieken van de isolaten

Enterokokken species	genotype	Vancomycine MIC (mg/L)		Teicoplanine MIC (mg/L)
		VITEK 2	E-test	VITEK 2
<i>E. faecium</i> 14/1700	vanA	≥32	≥256	≥32
<i>E. faecium</i> 14/1702	vanA	≥32	≥256	16
<i>E. faecium</i> 14/1710	vanA	≥32	≥256	≥32
<i>E. faecium</i> 15/0094	vanA	≥32	≥256	≥32
<i>E. faecium</i> 13/0669	vanB	≥32	≥256	≤0,5
<i>E. faecium</i> 14/0201	vanB	≥32	64	≤0,5
<i>E. faecium</i> 14/0786	vanA	≥32	≥256	≥32
<i>E. faecium</i> 26465	vanA	≥32	≥256	4
<i>E. faecalis</i> 10247	vanB	≥32	16	≤0,5
<i>E. casseliflavus</i> 14/0630	vanC2/C3	4	4	≤0,5
<i>E. gallinarum</i> 10/0779	vanC1/vanB	≥32	16	≤0,5
<i>E. gallinarum</i> 10/0780	vanC1	8	6	≤0,5

Figuur 7. Legende voor de interpretatie van resultaten in tabel 8 en tabel 9

Beoordeling chromogene bodems:	
GC	Groei VRE, correcte koloniekleur volgens productfiche
GF	Groei van VRE, niet de correcte koloniekleur volgens productfiche
C/A	Groei non-VRE, herkenbaar geen VRE via koloniekleur
GG	Geen groei van VRE
Beoordeling Campylobacter agar	
G	Groei van VRE, identificatie via MALDI-TOF MS
GG	Geen groei van VRE
N	Geen groei van non-VRE
A	Groei non-VRE, te onderscheiden van VRE via kolonimorfologie en/of identificatie MALDI-TOF MS en/of Gramkleuring

Tabel 11. Resultaten directe enting

Geen aanrijking	Stam	genotype	1.ChromID VRE		2.Brilliance VRE		3.VRESelect			4.Campylosel	
			24u	48u	24u	48u	24u	28u	48u	24u	48u
	<i>E. faecium</i> 14/1700	vanA	GF	GC	GC	GC	GF	GC	GC	G	G
	<i>E. faecium</i> 14/1702	vanA	GF	GC	GC	GC	GF	GC	GC	C/A	G
	<i>E. faecium</i> 14/1710	vanA	GF	GC	GC	GC	GF	GF	GC	C/A	G
	<i>E. faecium</i> 15/0094	vanA	GF	GC	GC	GC	GF	GC	GC	G	G
	<i>E. faecium</i> 13/0669	vanB	GF	GC	GC	GC	GF	GC	GC	G	G
	<i>E. faecium</i> 14/0201	vanB	GF	GC	GC	GC	GF	GF	GC	G	G
	<i>E. faecium</i> 14/0786	vanA	GF	GC	GC	GC	GF	GF	GC	G	G
	<i>E. faecium</i> 26465	vanA	GF	GC	GC	GC	GC	GC	GC	G	G
	<i>E. faecalis</i> 10247	vanB	GG	GC	GG	GC	GG	GG	GC	C/A	GG
	<i>E. casseliflavus</i> 14/0630	vanC2/C3	N	N	N	N	N	N	C/A	A	A
	<i>E. gallinarum</i> 10/0779	vanC1/vanB	N	N	N	N	N	N	N	N	A
	<i>E. gallinarum</i> 10/0780	vanC1	N	N	N	N	N	N	C/A	N	A

Tabel 12. Resultaten na overnacht aanrijking

Aanrijking	Stam	genotype	1.ChromID VRE		2.Brilliance VRE		3.VRESelect			4.Campylosel	
			24u	48u	24u	48u	24u	28u	48u	24u	48u
	<i>E. faecium</i> 14/1700	vanA	GC	GC	GC	GC	GC	GC	GC	G	G
	<i>E. faecium</i> 14/1702	vanA	GC	GC	GC	GC	GC	GC	GC	G	G
	<i>E. faecium</i> 14/1710	vanA	GC	GC	GC	GC	GC	GC	GC	G	G
	<i>E. faecium</i> 15/0094	vanA	GC	GC	GC	GC	GC	GC	GC	G	G
	<i>E. faecium</i> 13/0669	vanB	GC	GC	GC	GC	GC	GC	GC	G	G
	<i>E. faecium</i> 14/0201	vanB	GC	GC	GC	GC	GC	GC	GC	G	G
	<i>E. faecium</i> 14/0786	vanA	GC	GC	GC	GC	GC	GC	GC	G	G
	<i>E. faecium</i> 26465	vanA	GC	GC	GC	GC	GC	GC	GC	G	G
	<i>E. faecalis</i> 10247	vanB	GG	GC	GC	GC	GG	GC	GC	G	G
	<i>E. casseliflavus</i> 14/0630	vanC2/C3	N	N	N	N	N	N	N	A	A
	<i>E. gallinarum</i> 10/0779	vanC1/vanB	N	N	N	N	N	N	N	A	A
	<i>E. gallinarum</i> 10/0780	vanC1	N	N	N	N	N	N	N	A	A

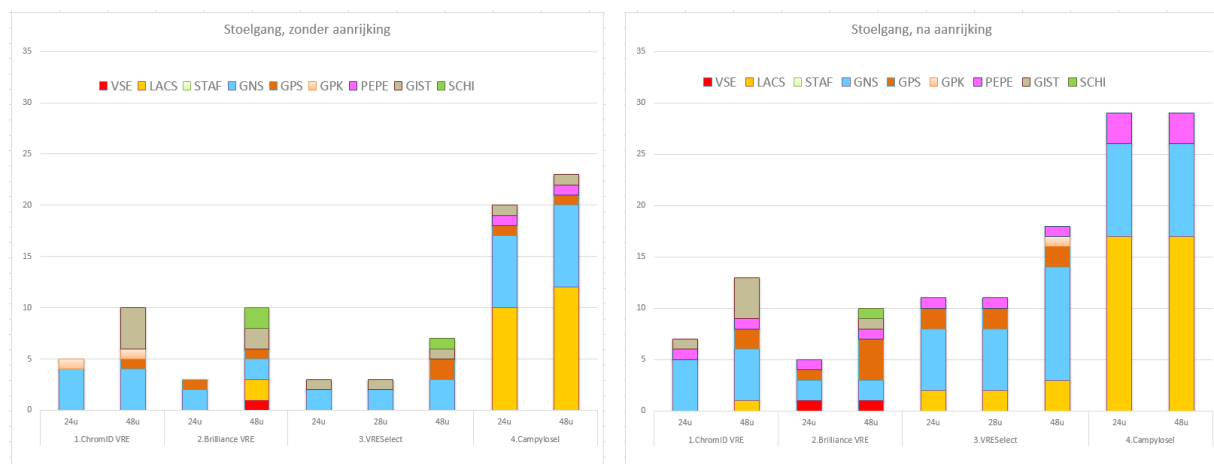
Conclusie

- De meerderheid van de VRE stammen produceerde de karakteristieke kleur pas na 48u incubatie op ChromID VRE en VRESelect™. Op Brilliance™ VRE groeien correct gekleurde VRE reeds na 24u incubatie. Na aanrijking kunnen correct gekleurde VRE kolonies reeds vanaf 24u incubatie afgelezen worden.
- VR *E. faecalis* 10247 groeide op alle bodems pas na een verlengde incubatie van 48u. Een mogelijke oorzaak is de lagere MIC van 16mg/L (zie tabel 10). Na aanrijking groeide deze stam reeds na 24u incubatie op Brilliance™ VRE en *Campylobacter* agar. Op de overige bodems groeide deze stam pas na een verlengde incubatie.
- Uit de resultaten bleek dat er een aanzienlijk hogere opbrengst is wanneer aanrijking wordt uitgevoerd.

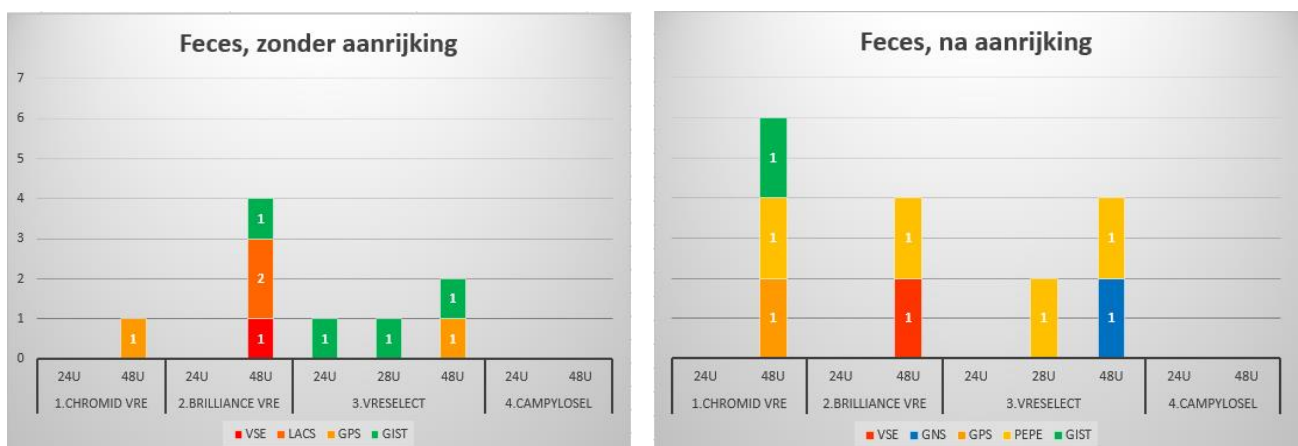
1.2.2.2 Prospectieve klinische studie

Zoals reeds beschreven werden zowel stoelgangsstalen (n=40) als rectale wissers (n=22) getest op aanwezigheid van VRE. De distributie van groei op verschillende media wordt weergegeven in figuren 8,9,10 en 11. Een vals positief resultaat op chromogene agars wordt gedefinieerd als de groei van een kolonie die verkeerdelijk zou afgelezen worden als VRE op basis van koloniekleur en -morfologie. Een vals positief resultaat op *Campylobacter* agar wordt gedefinieerd als een mogelijke VRE op basis van koloniemorfologie én een identificatie van *E. faecium* of *E. faecalis* met MALDI-TOF MS.

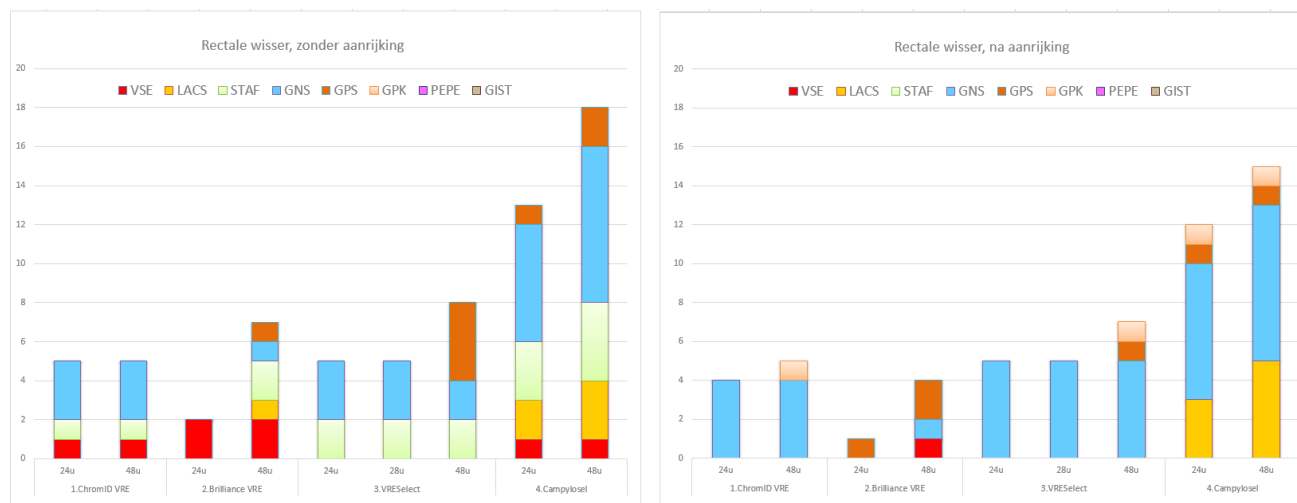
Figuur 9. Stoelgang (n =40) : resultaat van de groei op de chromogene bodems en *Campylobacter* agar na 24, (28) en na 48u. Links: zonder aanrijking; Rechts: met aanrijking (VSE= vancomycin susceptible enterococcus, LACS = lactobacillus, STAF= staflokokken, GNS= Gramnegatieve staven, GPS= Grampositieve staven, GPK= Grampositieve kokken, PEPE= *Pediococcus pentosaceus*, GIST= gist (candida), SCHI= schimmel)



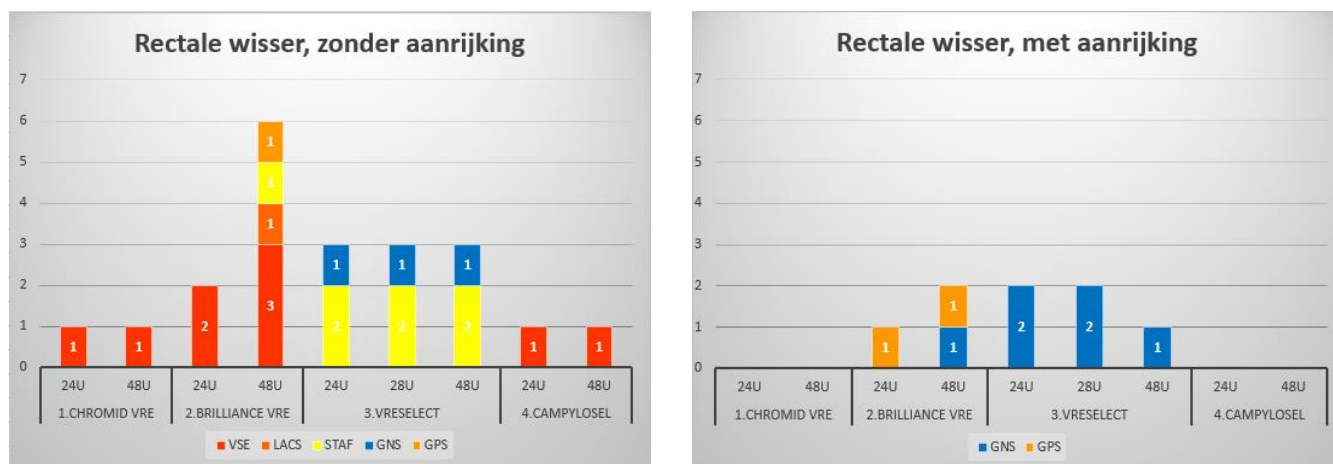
Figuur 10. Stoelgang (n=40): aantal vals positieve resultaten op chromogene agars en *Campylobacter* agar na 24, (28) en na 48u. Links: zonder aanrijking; Rechts: met aanrijking



Figuur 10. Rectale wissers (n= 22): resultaat van de groei op de chromogene bodems en *Campylobacter* agar na 24, (28) en na 48u. Links: zonder aanrijking; Rechts: met aanrijking. (VSE= vancomycin susceptible enterococcus, LACS = lactobacillus, STAF= staflokokken, GNS= Gramnegatieve staven, GPS= Grampositieve staven, GPK= Grampositieve kokken, PEPE= *Pediococcus pentosaceus*, GIST= gist (candida), SCHI= schimmel)



Figuur 11. Rectale wissers (n=22) : aantal vals positieve resultaten op chromogene agars en *Campylobacter* agar na 24, (28) en na 48u. Links: zonder aanrijking; Rechts: met aanrijking



Conclusie

- Er zullen stoelgangsstalen en rectale wisers in transportmedium aanvaard worden in het AZ Groeninge (eSwab, voorwaarde: visuele aanwezigheid van stoelgang).
- O.b.v. gegevens uit de literatuur wordt er gebruik gemaakt van een aanrijkmiddel. Enkele studies tonen een verhoogde sensitiviteit bij gebruik van een aanrijkmiddel gepaard gaand met gelijkaardige of minimaal verlies aan specificiteit. Eigen resultaten tonen een beperkt verlies aan specificiteit aan (m.a.w. een beperkte impact op verdere uitwerking van stalen).
- Het in house bereid aanrijkmiddel kan aangepast worden aan de epidemiologische situatie.
- Eigen resultaten kunnen niet aantonen dat door aanrijking meer VRE gedetecteerd worden.
- Inzage de literatuur en eigen gegevens blijkt dat chromogene bodems van verschillende producenten een gelijkaardige performantie hebben. Chromogene media hebben een duidelijke meerwaarde t.o.v. Campylobacter en Gal esculine. De finale keuze zal dan ook afhangen van andere factoren zoals kostprijs.

1.2.3 Controle reproduceerbaarheid van de bodem

Vier stammen (2 VRE-stammen en 2 non-VRE stammen) werden in drievoud volgens exact dezelfde procedure geënt op de verschillende chromogene bodems. De resultaten worden weergegeven in tabel 13. De resultaten zijn reproduceerbaar.

Figuur 12. Legende voor de interpretatie van resultaten in tabel 13

Beoordeling chromogene bodems:	
GC	Groei VRE, correcte koloniekleur volgens productfiche
GF	Groei van VRE, niet de correcte koloniekleur volgens productfiche
C/A	Groei non-VRE, herkenbaar geen VRE via koloniekleur
GG	Geen groei van VRE
nb	Groei niet bepaald

Tabel 13. Resultaten reproduceerbaarheidsstudie

kiem	bepaling	ChromID		Brilliance		VREselect		
<i>E. faecalis</i> 10247 van B	1	GF	GC	GF	GC	GF	nb	GC
	2	GF	GC	GF	GC	GF	nb	GC
	3	GF	GC	GF	GC	GF	nb	GC
<i>E. faecium</i> 14/1700 (van A)	1	GC	GC	GC	GC	GC	nb	GC
	2	GC	GC	GC	GC	GC	nb	GC
	3	GC	GC	GC	GC	GC	nb	GC
<i>E. casseliflavus</i> 14/0630	1	N	N	N	N	N	nb	C/A
	2	N	N	N	N	N	nb	N
	3	N	N	N	N	N	nb	C/A
<i>E. gallinarum</i> 10/0779	1	N	N	N	N	N	nb	C/A
	2	N	N	N	N	N	nb	C/A
	3	N	N	N	N	N	nb	C/A

1.2.4 Performantie MALDI-TOF MS

Identificatie van species is afhankelijk van de cultuurbodems waaruit kolonies getest worden. Bijgevolg moet de accuraatheid van de MALDI-TOF voor de directe identificatie vanuit chromogene media gevalideerd worden.

Gelijktijdig met de selectiviteit werd de performantie van MALDI-TOF MS voor de directe identificatie van ATCC stammen vanuit ChromID VRE, Brilliance™ VRE, VRESelect™, BEAv en Campylobacter agar geëvalueerd. Van elke gegroeide ATCC stam werden 3 kolonies aangeprikt en geïdentificeerd met MALDI-TOF MS. Als criterium dient 100% van de geteste stammen correct te worden geïdentificeerd. Hieraan werd voldaan.

1.2.5 Houdbaarheidsstudie

In de week van de vervaldatum van de chromogene bodems werd de studie van de selectiviteit herhaald (zie onder 2.2.1). Hierbij werden dezelfde resultaten bekomen. De drie chromogene media hebben een minimum houdbaarheid die overeenkomt met diegene vermeld door de producent.

TO DO/ACTIONS

- 1) Evaluatie van de kosten voor de finale screeningsmethode voor VRE-dragerschap.
- 2) Implementatie van een chromogene bodem in de routine.
- 3) Evaluatie van de meerwaarde van directe genotypische detectie VRE.

RELEVANT EVIDENCE/REFERENCES

1. K. Loens, Herdt ED, Verkroost S, Lammens C, Leven M, Goossens H. PowerPoint. Surveillance of *Enterococci* and invasive beta-hemolytic *Streptococci* not belonging to group B in Belgium (01/01/2009-30/09/2015) (niet gepubliceerde data).
2. Prematunge C, MacDougall C, Johnstone J, Adomako K, Lam F, Robertson J, et al. VRE and VSE Bacteremia Outcomes in the Era of Effective VRE Therapy: A Systematic Review and Meta-analysis. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2016;37(1):26-35.
3. Cattoir V, Leclercq R. Twenty-five years of shared life with vancomycin-resistant enterococci: is it time to divorce? *J Antimicrob Chemother.* 2013;68(4):731-42.
4. Leavis HL, Willems RJ, Mascini EM, Vandenbroucke-Grauls CMJE, Bonten MJM. Vancomycineresistente enterokokken in Nederland. *Ned Tijdsch Geneesk.* 2004;148 (18):878-82.
5. ECDC. Summary of the latest data on antibiotic resistance in the European Union. 2014.
6. Jans B, Schoevaerdts D, Huang TD, Berhin C, Latour K, Bogaerts P, et al. Epidemiology of multidrug-resistant microorganisms among nursing home residents in Belgium. *PLoS One.* 2013;8(5):e64908.

7. Huang T, Jans B, Schoevaerds D, Bogaerts P, Latour K, Catry B, et al. Multicentre point-prevalence survey of multidrug-resistant organisms among nursing home residents in Belgium. ECCMID 2016, Amsterdam, Nederland.
8. Teixeira LM, Carvalho MdGS, Shewmaker PL, Facklam RR. *Enterococcus*. Manual of Clinical Microbiology. Volume 2. 11th ed. Washington, DC: ASM Press; 2015. p. 350-64.
9. Boyce JM. Environmental contamination makes an important contribution to hospital infection. J Hosp Infect. 2007;65 Suppl 2:50-4.
10. Kramer A, Schwebke I, Kampf G. How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces? A systematic review. BMC Infect Dis. 2006;6:130.
11. Bonten MJB, Mascini EM, Willems R, Timmer GJ, Gaillard CA, Vandenbroucke-Grauls CMJE. Wat te doen als men vancomycineresistente enterokokken aantreft? Ned Tijdschr Geneesk. 2000;144 (53):2545-9.
12. Levine DP. Vancomycin: a history. Clin Infect Dis. 2006;42 Suppl 1:S5-12.
13. Trautmann M, Wiedeck H, Ruhnke M, Oethinger M, Marre R. Teicoplanin: 10 years of clinical experience. Infection. 1994;22(6):430-6.
14. Uttley AH, Collins CH, Naidoo J, George RC. Vancomycin-resistant enterococci. Lancet. I. England 1988. p. 57-8.
15. NVMM. Guideline HRMO VRE. 2015.
16. Eucast guideline for the detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance [Available from: www.eucast.org].
17. Courvalin P. Vancomycin resistance in gram-positive cocci. Clin Infect Dis. 2006;42 Suppl 1:S25-34.
18. Butler MS, Hansford KA, Blaskovich MAT, Halai R, Cooper MA. Glycopeptide antibiotics: Back to the future. J Antibiot. 2014;67(9):631-44.
19. Murray BE. Vancomycin-resistant enterococcal infections. N Engl J Med. 2000;342(10):710-21.
20. Butler MS, Hansford KA, Blaskovich MA, Halai R, Cooper MA. Glycopeptide antibiotics: back to the future. J Antibiot (Tokyo). 2014;67(9):631-44.
21. Hughes D. Exploiting genomics, genetics and chemistry to combat antibiotic resistance. Nat Rev Genet. 2003;4(6):432-41.
22. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters Version 6.0, valid from 2016-01-01.
23. Eucast guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance. Version 1.0 December 2013. p31-35.
24. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). M100-26 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, valid from 2016-01-01.

Contact: Dr. M. Boudewijns

25. Hegstad K, Giske CG, Haldorsen B, Matuschek E, Schonning K, Leegaard TM, et al. Performance of the EUCAST disk diffusion method, the CLSI agar screen method, and the Vitek 2 automated antimicrobial susceptibility testing system for detection of clinical isolates of Enterococci with low- and medium-level VanB-type vancomycin resistance: a multicenter study. *J Clin Microbiol.* 2014;52(5):1582-9.
26. Garcia LS, Isenberg HD. *Clinical microbiology procedures handbook*. 3rd ed. Washington, DC: ASM Press; 2010.
27. D'Agata EM, Gautam S, Green WK, Tang YW. High rate of false-negative results of the rectal swab culture method in detection of gastrointestinal colonization with vancomycin-resistant enterococci. *Clin Infect Dis.* 2002;34(2):167-72.
28. Wijesuriya TM, Perry P, Pryce T, Boehm J, Kay I, Flexman J, et al. Low Vancomycin MICs and Fecal Densities Reduce the Sensitivity of Screening Methods for Vancomycin Resistance in Enterococci. In: Carroll KC, editor. *J Clin Microbiol.* 52. 1752 N St., N.W., Washington, DC 2014. p. 2829-33.
29. Weinstein JW, Tallapragada S, Farrel P, Dembry LM. Comparison of rectal and perirectal swabs for detection of colonization with vancomycin-resistant enterococci. *J Clin Microbiol.* 1996;34(1):210-2.
30. HICPAC. *Management of Multidrug-Resistant Organisms In Healthcare Settings*. 2006.
31. Muto CA, Jernigan JA, Ostrowsky BE, Richet HM, Jarvis WR, Boyce JM, et al. SHEA guideline for preventing nosocomial transmission of multidrug-resistant strains of *Staphylococcus aureus* and enterococcus. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2003;24(5):362-86.
32. <http://www.copanusa.com/products/collection-transport/floqswabs-flocked-swabs/>
33. Ogier JC, Serror P. Safety assessment of dairy microorganisms: the *Enterococcus* genus. *Int J Food Microbiol.* 2008;126(3):291-301.
34. Harbarth S, Cosgrove S, Carmeli Y. Effects of Antibiotics on Nosocomial Epidemiology of Vancomycin-Resistant Enterococci. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 2002;46(6):1619-28.
35. Ledebouer NA, Tibbetts RJ, Dunne WM. A new chromogenic agar medium, chromID VRE, to screen for vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2007;59(4):477-9.
36. Suwantararat N, Roberts A, Prestidge J, Seeley R, Speser S, Harmon C, et al. Comparison of five chromogenic media for recovery of vancomycin-resistant enterococci from fecal samples. *J Clin Microbiol.* 2014;52(11):4039-42.
37. Kuch A, Stefaniuk E, Ozorowski T, Hryniewicz W. New selective and differential chromogenic agar medium, chromID VRE, for screening vancomycin-resistant *Enterococcus* species. *J Microbiol Methods.* 2009;77(1):124-6.

38. Cuzon G, Naas T, Fortineau N, Nordmann P. Novel chromogenic medium for detection of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*. *J Clin Microbiol.* 2008;46(7):2442-4.
39. Delmas J, Robin F, Schweitzer C, Lesens O, Bonnet R. Evaluation of a new chromogenic medium, ChromID VRE, for detection of vancomycin-resistant *Enterococci* in stool samples and rectal swabs. *J Clin Microbiol.* 2007;45(8):2731-3.
40. B.M., Willey LL, P. Gnanasuntharam, T. Fung, C. Watt, P., Gnanasuntharam CV, G. Ricci, P. Lo, K. Wong, A. Simor, A., McGeer TM, S.M. Poutanen. B.M. Willey, L. Louie, P. Gnanasuntharam, T. Fung, C. Watt, P. Gnanasuntharam, C. Vermeiren, G. Ricci, P. Lo, K. Wong, A. Simor, A. McGeer, T. Mazzulli, S.M. Poutanen.
41. E.Scopes. Evaluation Of Brilliance VRE Agar For Detection Of Vancomycin Resistant *Enterococci* From Four Geographically Different Hospitals In The United States. Thermo Fisher Scientific, Wade Road, Basingstoke, UK.
42. Anderson NW, Buchan BW, Young CL, Newton DW, Brenke C, Lapsley L, et al. Multicenter clinical evaluation of VRESelect agar for identification of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*. *J Clin Microbiol.* 2013;51(8):2758-60.
43. Grabsch EA, Ghaly-Derias S, Gao W, Howden BP. Comparative study of selective chromogenic (chromID VRE) and bile esculin agars for isolation and identification of vanB-containing vancomycin-resistant *enterococci* from feces and rectal swabs. *J Clin Microbiol.* 2008;46(12):4034-6.
44. Nguyen TD, Evans KD, Goh RA, Tan GL, Peterson EM. Comparison of medium, temperature, and length of incubation for detection of vancomycin-resistant *Enterococcus*. *J Clin Microbiol.* 2012;50(7):2503-5.
45. Jenkins SG, Raskoshina L, Schuetz AN. Comparison of performance of the novel chromogenic spectra VRE agar to that of bile esculin azide and *Campylobacter* agars for detection of vancomycin-resistant *enterococci* in fecal samples. *J Clin Microbiol.* 2011;49(11):3947-9.
46. Peterson JF, Doern CD, Kallstrom G, Riebe KM, Sander T, Dunne WM, Jr., et al. Evaluation of Spectra VRE, a new chromogenic agar medium designed to screen for vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*. *J Clin Microbiol.* 2010;48(12):4627-9.
47. Stamper PD, Shulder S, Bekalo P, Manandhar D, Ross TL, Speser S, et al. Evaluation of BBL CHROMagar VanRE for detection of vancomycin-resistant *Enterococci* in rectal swab specimens. *J Clin Microbiol.* 2010;48(11):4294-7.
48. Shigei J, Tan G, Shiao A, de la Maza LM, Peterson EM. Comparison of two commercially available selective media to screen for vancomycin-resistant *enterococci*. *Am J Clin Pathol.* 2002;117(1):152-5.
49. B.M., Willey, Louie L, Gnanasuntharam P, Fung T, Watt C, et al. Prospective evaluation of Brilliance VRE® and VRESelect® Chromogenic Agars for detection of vancomycin-resistant

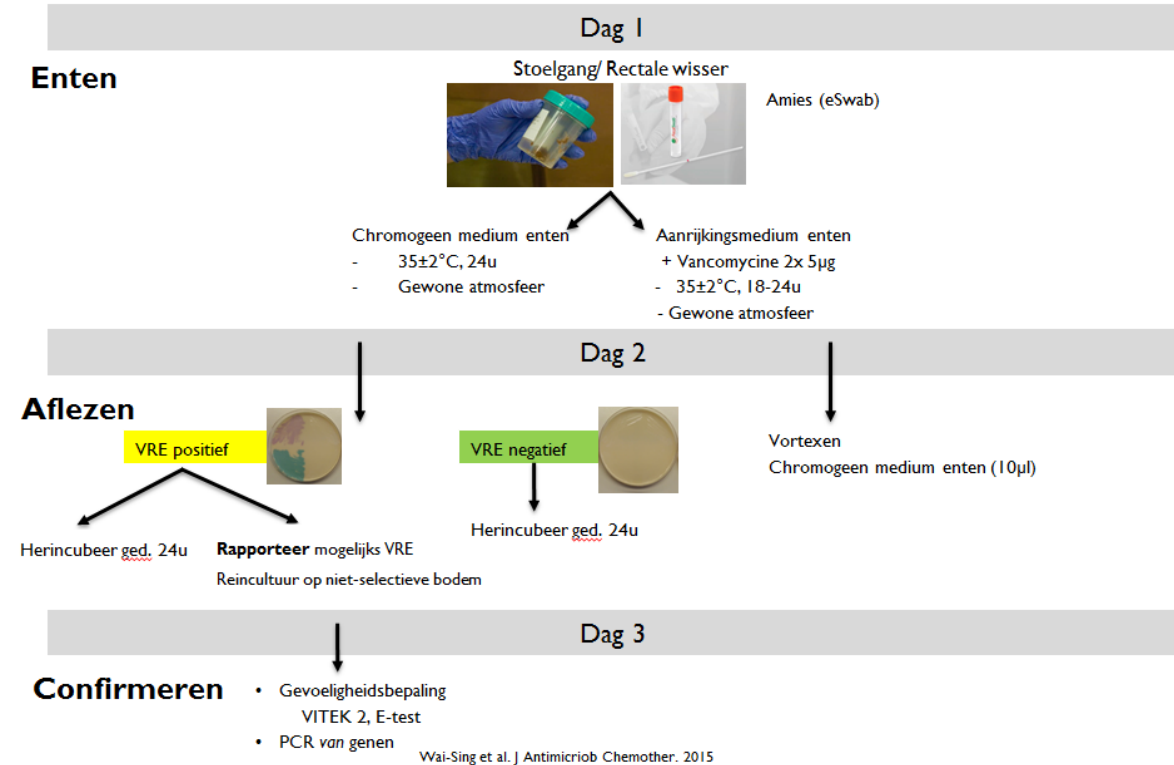
Contact: Dr. M. Boudewijns

enterococci from surveillance specimens. Toronto, CA: 27th International Congress of Chemotherapy, ECCMID; 2011.

50. Klare I, Fleige C, Geringer U, Witte W, Werner G. Performance of three chromogenic VRE screening agars, two Etest((R)) vancomycin protocols, and different microdilution methods in detecting vanB genotype *Enterococcus faecium* with varying vancomycin MICs. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2012;74(2):171-6.
51. Bio-Rad. Bijsluiter VRE™ Select Medium. 2011.
52. bioMérieux. Bijsluiter ChromID™ VRE Agar. 2010.
53. Oxoid. Bijsluiter Brilliance™ VRE. 2009.
54. Edberg SC, Hardalo CJ, Kontnick C, Campbell S. Rapid detection of vancomycin-resistant enterococci. *J Clin Microbiol.* 1994;32(9):2182-4.
55. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). M22-A3 Quality Control for Commercially Prepared Microbiological Culture Media; Approved Standard-Third Edition.
56. Kwaliteit, Validatie microbiologische testen, versie 9.00, UZ Brussel (niet gepubliceerde data).
57. Validatie voedingsbodems. Voedingsbodem: Sabouraud Dextrose Agar + Chloramphenicol (SAB), UZ Brussel, (niet gepubliceerde data).
58. Newell DG, Ketley JM, Feldman RA. *Campylobacters, Helicobacters, and Related Organism.* 1st ed. New York 1996.

ATTACHMENTS

Finaal algoritme VRE-screening AZ Groeninge



Referentie	Patientenpopulatie	Staaltype	n	Kenmerken stalen	defenitie VRE	Methode van uitplaten	Media vergeleken	Sensitiviteit (%)		Specificiteit (%)	
								24u	48u	24u	48u
Wijesuriya <i>et al.</i> , 2014	gekaracteriseerde stammen	gespikete faecale suspensie	18	gekaracteriseerde stalen (ACCESS), <i>van A</i> of <i>van B</i> , MIC 2- MIC >256	<i>van A</i> of <i>van B</i> gen aanwezig (PCR, MLST), onafhankelijk van de MIC waarde	Direct: 10µl suspensie (concentratie 10 ⁶ of 10 ⁶ * CFU/ml faeces), broth: bij verkleuring subcultuur op agar	ChroMagar VRE	89/89*	94/94*	/	/
							ChromID VRE	83/89*	94/94*	/	/
							Brilliance	83/83*	83/83*	/	/
							VRESelect	50/67*	78/94*	/	/
							BEAv broth (4µg/ml Enterococcosel,BD)	50/72*	72/89*	/	/
Ledeboer <i>et al.</i> , 2007	klinische stalen	Stoelgang	120			Direct	ChromID VRE	86,3	88,2	100	98,6
							BEAv agar	90,2	92,2	73,9	72,4
Suwanarat <i>et al.</i> , 2014	klinische stalen met aanvraag analyse <i>C. difficile</i>	Stoegang (nadien validatie met wissers, vergelijkbare resultaten)	396	279 (75%) VRE negatief, 99(25%) VRE positief, 79% VREfm en 15% VREfs	vancomycine resistent= MIC >32 µg/l	Direct: 1 µl stoelgang	ChomID VRE		94,4		99,7
							VRESelect		91,9		99,7
							HardyCHROM VRE		89,9		99,7
							Spectra VRE		93,9		99,7
							InTray Colorex VRE		91,9		98,3
							BEAv agar (6µg/ml, Enterococcosel, BD)		84,8		100
							BEAv broth (6µg/ml, Hardy Diagnostics)		98		100
Kuch <i>et al.</i> , 2009	gekaracteriseerde stammen	suspensie	96	3 VREfs (MIC >256 µg/ml, 14 VREfm (MIC 16-128µg/ml),	niet specifiek gedefinieerd	Direct: 10 ⁶ CFU/ml (8-10 kolonies)					
							ChromID VRE	100	100	/	/
	15 VRE positievepatiënten/ 15 gezonde vrijwilligers	stoelgang	30	<i>van B</i> genotype; alle stalen van gezonde vrijwilligers waren negatief	niet specifiek gedefinieerd	Direct	ChromID VRE	80	93,3	100	60
							BEV (6µg/ml)	80	86,6	60	40
						Aanrijking (12-24u BHI , 30 µg/ml)	ChromID VRE	100	100	100	60
Cuzon <i>et al.</i> , 2008	outbreak setting: screening	rectale wissers	498	outbreak VREfm BCT-1 <i>VanD</i> phenotype <i>van A</i> genotype (overwegend MIC 12-24 µg/ml); VREfm 3,4%	niet specifiek gedefinieerd	Aanrijking (18u, Gal broth 3µg/ml vancomycine, 5µg/ml colistine, 50µg/ml Amfotericine B)	ChromID VRE	/	96,9	/	99,4
							BEAv agar (Enterococcosel, BD)	/	93,9	/	83,4
Delmas <i>et al.</i> . 2007		stoelgang (146) + rectale wissers (861)	1007	22 VRE positief, VREfm <i>van A</i>		Direct	ChomID VRE	54,6	54,6	100	97,6
							BEAv (Enterococcosel, BD, 8µg/ml)	40,9	59,1	97,7	92
						overnacht aanrijking (BHI, 3µg/ml)	ChromID VRE	100	100	99,9	99,9
							BEAv (Enterococcosel, BD, 8µg/ml)	100	100	94,7	92,4

Referentie	Patientenpopulatie	Staaltype	n	Kenmerken stalen	defenitie VRE	Methode van uitplaten	Media vergeleken	Sensitiviteit (%)		Specificiteit (%)		
								24u	48u	24u	48u	
Wiley et al.,	screeningsstalen?	Stoelgang + rectale wissers	3000	141 VRE positief, 126 van A VREfm, 11 van B VREfm, 4 van B VREfs		Direct (geautomatiseerd rotatietoestel)	BrillianceVRE					
							VRESelect	92,2	97,2	88,8	79,8	
							BEAv (6µg/ml, BBL, prep Oxoid)	90,1	95,8	79,4	72	
								78,7	87,9	84,9	70,9	
						mEnterococcus (6µg/ml Difco, prep in house)	80,1	96,5	92,4	83,5		
Scopes	screeningsstalen van asymptomatische patiënten	Stoelgang (398) + rectale wissers (250)	398	221 VREfm en VREfs (alle MIC >256µg/ml)	VRE= MIC>6µg/ml	Direct	Brilliance VRE	/	98,6	/	99,8	
							BEAv (6µg/ml, Remel)	/	96	/	82,2	
Miller <i>et al.</i>	VRE screening tertiair ZH	Stoelgang + rectale wissers	95	22 VRE positief	VRE= MIC ≥8 µg/ml	Overnacht aanrijking (BHI), vervolgens 10µl enten (evaluatie op 22,24 en 26u)	Brilliance VRE	100 (26u)		71,2 (26u)		
							Colorex VRE	95,5 (26u)		90,4 (26u)		
							VREselect	68,2 (26u)		91,8 (26u)		
Anderson <i>et al.</i> , 2013		stoelgang	945		VRE= MIC >32 µg/l	Indirecte enting in saline en vervolgens uitplaten met een wisser of entooog	VRESelect	98,7 (24-28u)		99,0 (24-28u)		
							BEAv (Thermo Fisher Scientific, 6µg/ml)	85,1 (24-28u)	95,1 (48u)	90,1 (24-28u)	84,0 (48u)	
Grabsch <i>et al.</i> 2008	509 patiënten op hoog-risico diensten (oa,nier- en levertransplantatie, ICU)	Stoelgang (247)+ rectale wissers (363)	610	122 VRE van B (faecium en faecalis), MIC ≤4-≥32 µg/ml	VRE= bevattende van genen (PCR) en correctie ID	Direct	ChromID VRE	39,3% vande positieve VRE's gedetecteerd	90,20%			
								21,3% van de positieve VRE's gedetecteerd				
							Enterococcosel broth (6µg/ml BD)	86,8% (na 72u)				
Nguyen <i>et al.</i> , 2012	VRE screening	Stoelgang (20) + rectale wissers (730)	750	90 VRE (82 <i>E.faecium</i> , 1 <i>E.faecalis</i> , 7 beide)	CLSI MIC breekpunten	Direct (stoelgang) , rectale wissers (indirect: in 0,5 ml saline)	Campylobacter (Campy, BD 10 µg/ml)	97,8	/	99,9	/	
							Spectra VRE (Remel, 6µg/ml)	95,6	/	99,1	/	
								BEAV (Remel, 6µg/ml)	90	/	96,1	/
			Stoelgang (17) + rectale wissers (527, polyurethane-tipped swabs)	544	69 VRE (62 <i>E. faecium</i> , 1 <i>E. faecalis</i> , 6 beide)	CLSI MIC breekpunten	Direct (stoelgan) , rectale wissers (indirect: in 0,5 ml saline)	Campylobacter (Campy, BD 10 µg/ml)	94,2	94,2	100	100
						Spectra VRE (Remel, 6µg/ml)	91,3	92,8	98,7	99,3		
						BEAV (Remel, 6µg/ml)	85,5	88,4	96,8	96,2		
Jenkins <i>et al.</i> , 2011	klinische stalen (ICU) met aanvraag analyse <i>C. difficile</i>	Stoelgang	142	58 VRE,55 <i>E.faecium</i> , 4 <i>E.faecalis</i> , 2 beide), MIC voor alle >256 µg/ml	CLSI MIC breekpunten	Direct	Campylobacter (Campy, Remel 10 µg/ml)	96,5	100	91,7	89,3	
							Spectra VRE (Remel, 6µg/ml)	98,3	100	95,2	95,2	
											BEAV (Remel, 6µg/ml)	86,2
Peterson <i>et al.</i> , 2010	klinische stalen met aanvraag analyse <i>C. difficile</i>	Stoelgang	399	NV	CLSI	Direct (m.b.v. dacron (=polyester) wisser	Spectra VRE (Remel, 6µg/ml)	98,2	99,1	99,3	96,5	
							BEAV (Remel, 6µg/ml)	87,6	93,8	87,1	72,4	