

Optimalisatie van de workflow voor VRE screening in het routinelaboratorium

Annelies Louwagie
Supervisor: Dr. Michael Boudewijns



Klinisch/diagnostisch scenario

- MDRO: belangrijk wereldwijd probleem
- Op zoek naar een optimale screeningsmethode voor VRE

DE REDACTIE.BE 6 °C 5 km FILE Het journaal 7 - 17/04/16

HOME VIDEOZONE LIVE CENTER

ONTSLAG MINISTER GALANT BINNENLAND BUITENLAND CULTUUR & MEDIA OOK DAT NOG

ANALYSE "VRE", een superbacterie in opmars - Koen Wauters



vr 06/11/2015 - 17:11 Koen Wauters

Cijfers. Ik heb zelden cijfers gezien die zo duidelijk en tegelijk zo alarmerend zijn. Er zijn in 2009 18 gevallen van resistente enterokokken geregistreerd in België, drie jaar later waren er dat al 103, en dit jaar zitten we voorlopig aan 381. Dat gaat niet stoppen. Bij ons niet, in de buurlanden niet.

de Gelderlander

Home Algemeen Misdaad & 112 Sport Uit & Thuis Extra DGclub

Achterhoek Arnhem e.o. Betuwe De Vallei Liemers Maasland Maas en Waal Nijmegen e.o.

VRE bacterie Alle categorieën

Van: dd-mm- Tot: dd-mm-

Resultaten gesorteerd op:
☒ Datum ☐ Relevantie

ZOEKEN

Je zoekt op VRE bacterie, binnen Alle categorieën

 > Aantal besmette patiënten VRE-bacterie loopt op: 52 5 juni 2015, 12:39	 > 35 VRE-besmettingen in Albert Schweitzer Ziekenhuis 19 mei 2015, 17:04
 > Meer besmettingen met ziekenhuisbacterie Dordrecht 11 mei 2015, 15:13	 > Honderden patiënten getest na bacterie-uitbraak 7 mei 2015, 16:37
 > Bacterie-uitbraak ziekenhuis vaak beheersbaar 17 september 2014, 16:26	 > Onderzoek 300 Hoornse patiënten om bacterie 27 januari 2014, 19:29
 > Deels opnamestop ziekenhuis Hoorn om bacterie	 > Bacterie noopt ziekenhuis tot opnamestop

Inleiding: Enterokokken

- Grampositieve kokken (diplokokken)
- Alomtegenwoordig
- Commensalen GI-tractus
- *E. faecalis* > *E. faecium* meest frequent geïsoleerd
- 12 % nosocomiale infecties
 - urineweginfecties
 - bacteriëmie
 - endocarditis
 - wondinfecties
 - abdominale infecties
 - katheterinfecties
- Resistente bacteriën

TABLE 1. Intrinsic and acquired antimicrobial drug resistance in enterococci^a

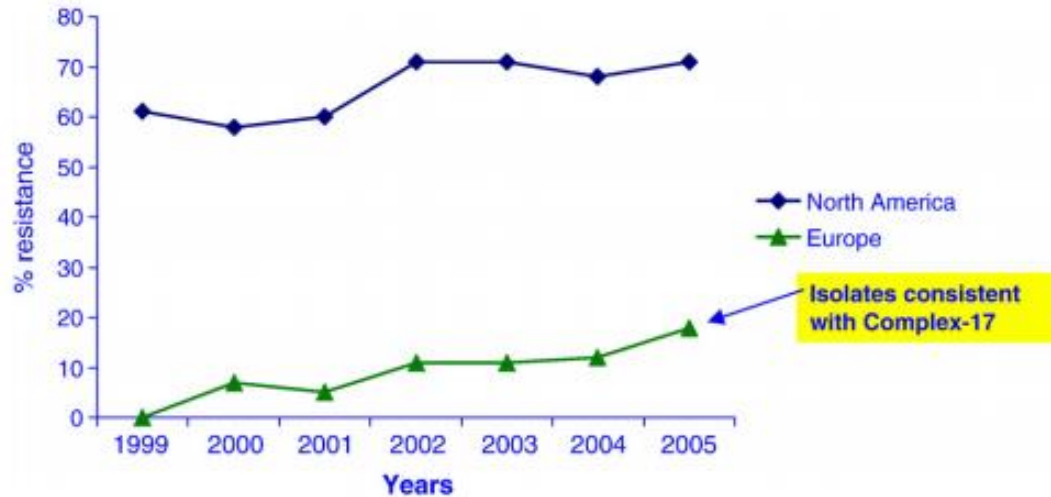
Intrinsic resistance	
β-Lactams (particularly cephalosporins and penicillinase-resistant penicillins)	
Low concentrations of aminoglycosides	
Clindamycin	
Fluoroquinolones	
Trimethoprim-sulfamethoxazole	
Acquired resistance	
High concentrations of β-lactams, through alteration of PBPs or production of β-lactamase	
High concentrations of aminoglycosides	
Glycopeptides (vancomycin, teicoplanin)	
Tetracycline	
Erythromycin	
Fluoroquinolones	
Rifampin	
Chloramphenicol	
Fusidic acid	
Nitrofurantoin	

+ linezolid
+ daptomycine

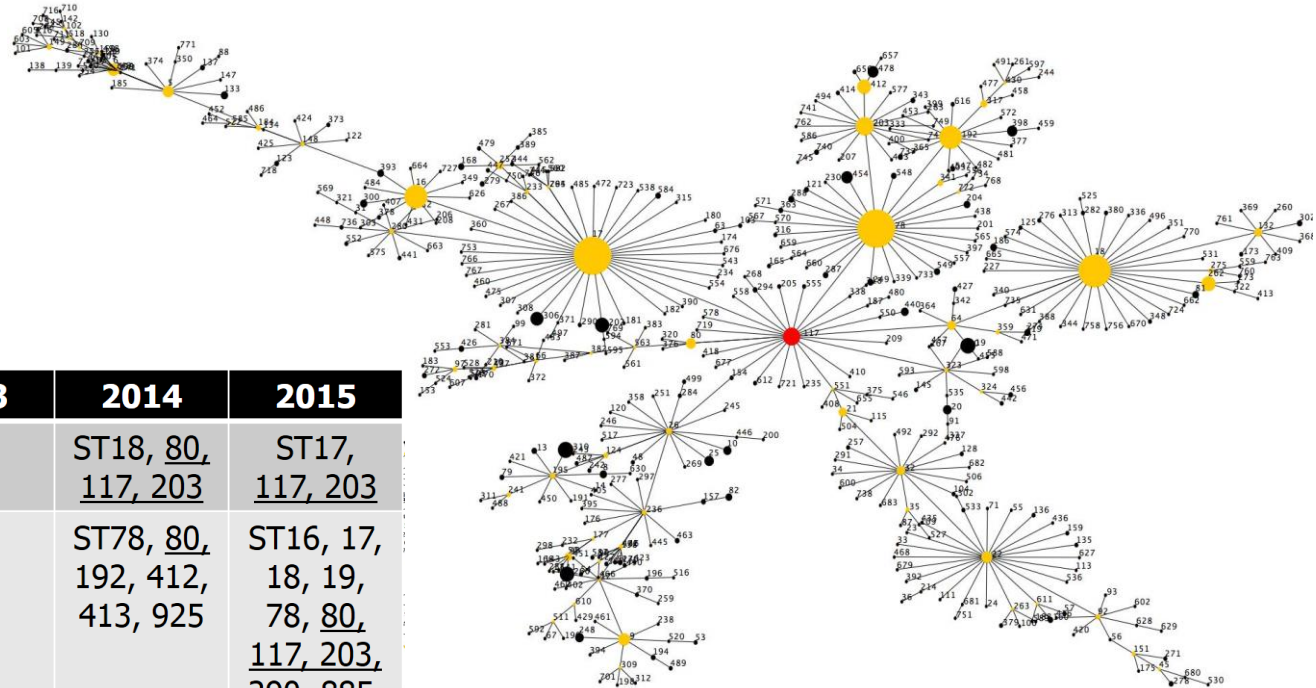
^a Adapted in 2000 from reference 109 with permission; original version Copyright © 1996, Massachusetts Medical Society (all rights reserved).

Inleiding: *E. faecium* als ziekenhuispathogeen!

- Subpopulatie *E. faecium* stammen
- Ampicilline R, fluoroquinolonen R clonaal complex CC17 → 'epidemic potential'
- Massale verspreiding in ziekenhuizen wereldwijd



I) Inleiding: CC 17



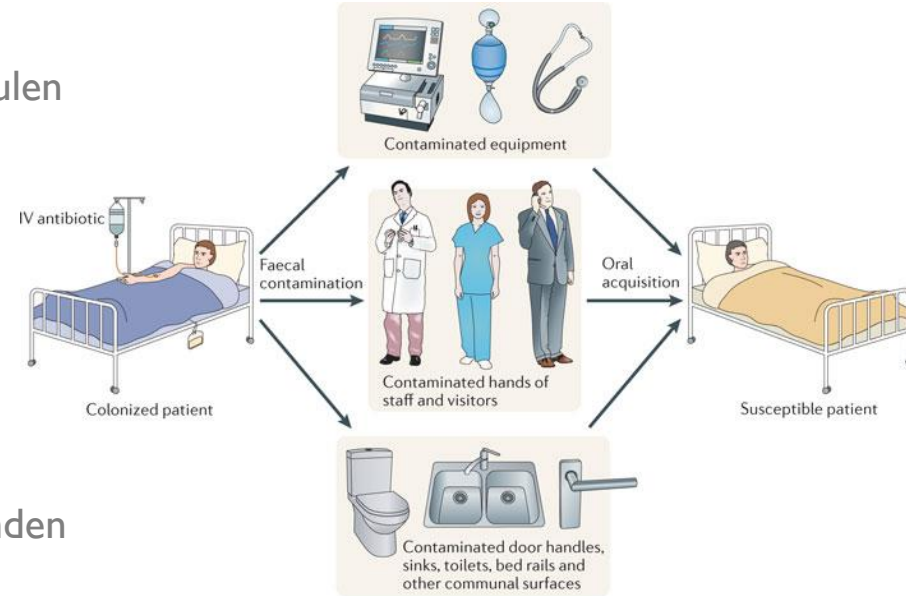
ST-types	2012*	2013	2014	2015
Outbreak	ST203	ND	ST18, <u>80</u> , <u>117</u> , 203	ST17, <u>117</u> , 203
Non-outbreak	ND	ND	ST78, <u>80</u> , 192, 412, 413, 925	ST16, 17, 18, 19, 78, <u>80</u> , <u>117</u> , 203, 290, 885, 925
UNK	ND	ND	ST17, 18, <u>80</u> , <u>117</u> , <u>203</u> , 577, 925	ST17, 18, 78, <u>80</u> , <u>117</u> , <u>203</u> , 612

Inleiding: CCI7, ziekenhuisbacterie *E. faecium*

- Succes van de bacterie?
 - AB → resistentie
 - aanhechtingsvermogen aan gastheermoleculen
 - biofilm vorming
 - kolonisatie darm

- Transmissie
 - omgeving dragers
 - 'high touch oppervlakken'
 - overleving enterokokken: 5 dagen- 4 maanden

- Risicofactoren
 - AB: cefalosporines, anti-anaerobe AB, vancomycine
 - dialysepopulatie !!!



Nature Reviews | Microbiology

Cattoir V., Leclercq R. J Antimicrob Chemother. 2013
Bonten, J.M., Willems R.J. ntvg. 2012
Kramcer A. et al. BMC infect Dis. 2006
Arias CA, Murray BE. Nat Rev Microbiol. 2012

Vraagstelling

- 1) Wat zeggen epidemiologische gegevens over VRE ?
 - Europese gegevens
 - België: NRC
- 2) Wat is in de literatuur beschreven over screeningsmethoden naar VRE dragerschap?
- 3) Praktisch luik: validatie screeningsmethode AZ Groeninge



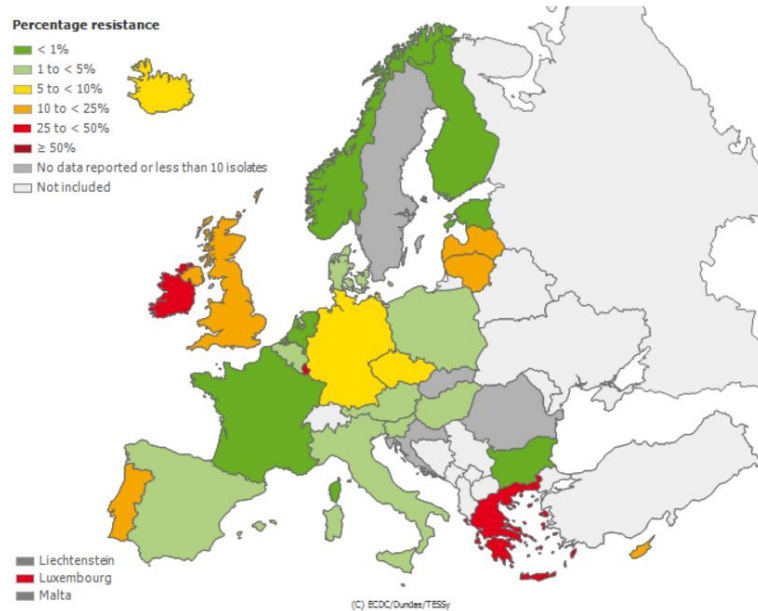
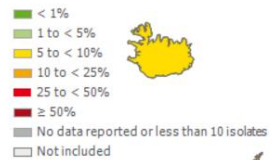
Scientists discover a new superbug.

I) Epidemiologie: Europa



Proportion of Vancomycin Resistant (R) *Enterococcus faecium* Isolates in Participating Countries in 2009

Percentage resistance



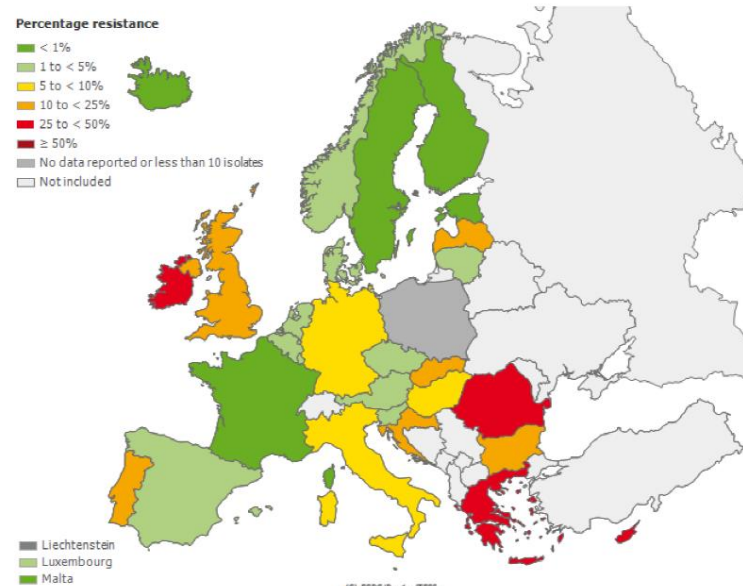
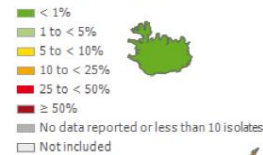
(C) ECDC/Dundes/TESSy

EARSnet 2009



Proportion of Vancomycin Resistant (R) *Enterococcus faecium* Isolates in Participating Countries in 2014

Percentage resistance



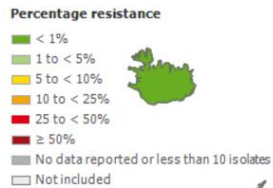
(C) ECDC/Dundes/TESSy

EARSnet 2014

I) Epidemiologie: Europa



Proportion of Vancomycin Resistant (R) *Enterococcus faecalis* Isolates in Participating Countries in 2009

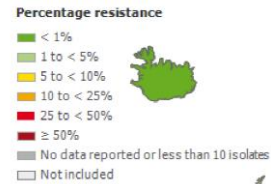


Liechtenstein
Luxembourg
Malta

(C) ECDC/Dundes/TESSy



Proportion of Vancomycin Resistant (R) *Enterococcus faecalis* Isolates in Participating Countries in 2014



Liechtenstein
Luxembourg
Malta

(C) ECDC/Dundes/TESSy

EARSnet 2009

EARSnet 2014

I) Epidemiologie:

VRE: wereldwijd probleem

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)

I) Epidemiologie: België

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. casseflavius/gallinarum</i>	2	1	13	9	12	12	14
other Enteroccci	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)
vanA (%)	5 (27,8)	8 (38,1)	24 (39,3)	84 (81,6)	61 (71,8)	163 (82,3)	402 (90,5)
vanB (%)	11 (61,1)	12 (57,1)	24 (39,3)	11 (10,7)	12 (14,1)	20 (10,1)	24 (5,4)
vanC (%)	2 (11,1)	1 (4,8)	13 (21,3)	8 (7,7)	12 (14,1)	10 (5,1)	13 (2,9)
other (vanAB, vanBC, vanAC, vanD) (%)	0	0	0	0	0	3 (1,5)	5 (1,1)
Number of outbreaks	1	1	3	4	1	10	22

I) Epidemiologie: België

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. casseflavus/gallinarum</i>						12	14
other Enterococci						3	4
Nr of VRE (%)						(65,8)	444 (76,1)
vanA (%)	5 (27,8)	8 (30,1)	24 (37,3)	84 (81,8)	81 (71,8)	183 (82,3)	402 (90,5)
vanB (%)	11 (61,1)	12 (57,1)	24 (39,3)	11 (10,7)	12 (14,1)	20 (10,1)	24 (5,4)
vanC (%)	2 (11,1)	1 (4,8)	13 (21,3)	8 (7,7)	12 (14,1)	10 (5,1)	13 (2,9)
other (vanAB, vanBC, vanAC, vanD) (%)	0	0	0	0	0	3 (1,5)	5 (1,1)
Number of outbreaks	1	1	3	4	1	10	22

- 1) Toenemend aantal stammen worden verzonden naar NRC
- 2) Geen verplichting
- 3) Moeilijk conclusie uit te trekken

I) Epidemiologie: België

2013

Epidemiology of Multidrug-Resistant Microorganisms among Nursing Home Residents in Belgium

Béatrice Jans^{1*}, Didier Schoevaerds²⁺³, Te-Din Huang³, Catherine Berhin³, Katrien Latour¹, Pierre Bogaerts³, Claire Nonhoff⁴, Olivier Denis⁴, Boudewijn Catry¹, Youri Glupczynski³

Conclusion

The prevalence of asymptomatic carriage of ESBLE was found to be low in a large cohort of nursing home residents in Belgium, though with a wide prevalence range being observed between facilities, and that the proportion of MRSA did markedly decrease by 6.8% since the former study in 2005. The latter trend is in line with the nationwide evolution of MRSA infections in acute care hospitals. No cases of VRE were found. Overall, these results are highly encouraging and support further maintaining all initiatives that have been implemented at national level to reduce the spread of MDRO within and across acute and chronic health care facilities.

2015

Multicentre point-prevalence survey of multidrug-resistant organisms among nursing home residents in Belgium

Te-Din Daniel Huang^{*1}, Beatrice Jans², Didier Schoevaerds³, Pierre Bogaerts⁴, Katrien Latour⁵, Boudewijn Catry⁶, Olivier Denis⁷, Margareta Ieven⁸, Youri Glupczynski⁹

Conclusion: Compared to similar surveys carried out in NH in 2005 and in 2011, we observed a continuous decrease of the prevalence of MRSA, while the prevalence of ESBLE increased significantly. This evolution closely parallels the MRSA and ESBLE prevalences reported in acute Belgian hospitals over the same period, strongly suggesting the tight interactions and links between these two healthcare sectors. Although carriage of VRE and of CPE is still exceptionally found in NH residents, the increasing prevalence of ESBLE is worrisome and suggests the need of closer monitoring and review of antimicrobial stewardship in NH.

2) Glycopeptide resistentie: Types

- 9 Resistente fenotypes
 - vanA/vanB*: bedreiging !

	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

3) Detectiemethoden

- MIC bepaling
- Disk diffusie
- Breakpoint agar

Fig 1



ST

EUROPEAN COMMITTEE
ON ANTIMICROBIAL
SUSCEPTIBILITY TESTING

cal Microbiology and Infectious Diseases

EUCAST			CLSI									
MIC (mg/L)	breekpunt	Disk lading	Zone diameter (mm)	MIC (mg/L)	breekpunt	Disk lading	Zone diameter (mm)					
S	R		S	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

Fig 2

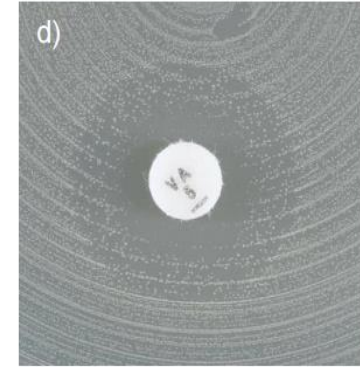
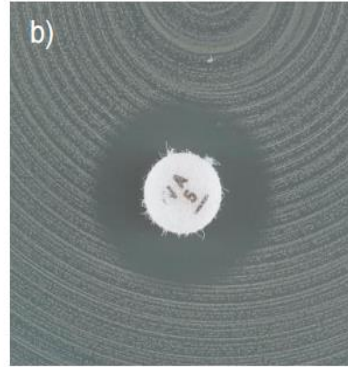
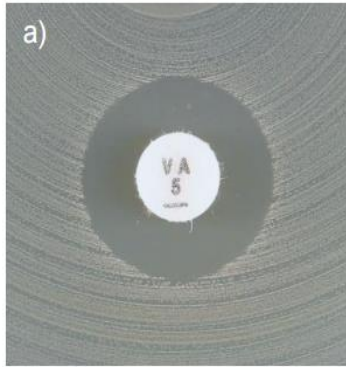
Glycopeptide	MIC (mg/L)	
	VanA	VanB
Vancomycin	64-1024	4-1024
Teicoplanin	8-512	0.06-1



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

3) Detectiemethoden

- MIC bepaling
- Disk diffusie
- Breakpoint agar



Examples of inhibition zones for *Enterococcus* spp. with vancomycin.

a) Sharp zone edge **and** zone diameter ≥ 12 mm. Report susceptible.

b-d) Fuzzy zone edge or colonies within zone. Perform confirmatory testing with PCR or report resistant even if the zone diameter ≥ 12 mm.

3) Detectiemethoden

- MIC bepaling
- Disk diffusie
- Breakpoint agar



BHI met 6 µg/ml vancomycine

10 µl 0.5 McF suspensie

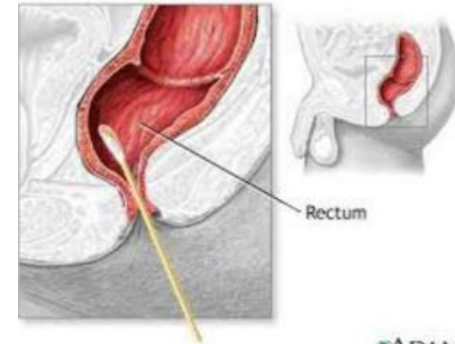
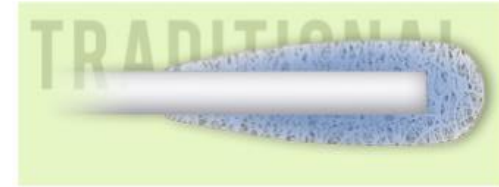
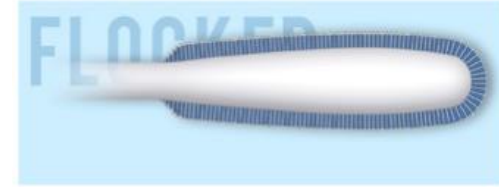
Incubatie 24h bij 35° C

>1 kolonie = positief

3) Screeningsmethoden

Screening naar VRE: algemeen

- Staalttype
 - Enterokokken: commensale flora darm
 - rectale wissers, stoelgangstalen
 - NVMM: rectale wissers
 - Vals negatieve resultaten? Katoenen wissers !
 - Huidige wissers: 'Flocked'
 - CDC: rectale, perirectale wissers en stoelgang
 - Clinical Microbiology Procedures Handbook: stoelgang > wisser
 - Wisser: 1-2 cm in rectaal kanaal: invasief, onaangenaam
 - Wisser: doordrenkt met stoelgang? Opbrengst ?



3) Screeningsmethoden

Screening naar VRE: algemeen

- Sensitiviteit van de methode
 - staaltype
 - VRE stoelgangsdensiteit
 - vancomycine concentratie in screening media
 - vancomycine MIC waarde isolaat → moeilijk(ere) detectie vanB
- Staaltransport
 - NVMM-richtlijn: Amies (eSwab), Stuart
 - 4-8° C indien niet onmiddellijk verwerkt
- Weigeren van stalen
 - rectale wissers zonder visuele aanwezigheid van stoelgang

3) Screeningsmethoden

Screening naar VRE: beschikbare media

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

3) Screeningsmethoden

Screening naar VRE: beschikbare media

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

Medium	[Vancomycin]	Aanbevolen incubatietijd	Kolonie aspect	Staaltype	LOD	Bijkomende testen	QC
ChromID VRE (bioMérieux)	8 µg/ml	lees af op 24u, als negatief lees af op 48u	<i>E. faecium</i> : violet <i>E. faecalis</i> : blauw-groen	Stoelgang, anale wisser	ND	Geen	ENFM ATCC 700221 (<i>vanA</i>) ENFA ATCC 51299 (<i>vanB</i>) ENFA ATCC 29212
Brilliance VRE (Oxoid)	2 µg/ml	lees af op 24u, als negatief lees af op 48u	<i>E. faecium</i> : indigo-paars <i>E. faecalis</i> : lichtblauw	Stoelgang, wisser, isolaat, suspensie	ND	Geen	ENFA ATCC 12202(VRE) ENFA ATCC 51299 (VRE) ENFA ATCC 12201 (VRE) ENFA ATCC 35667 ENFM ATCC 19433 ENGA ATCC 700425
VRESelect (Bio-Rad)	8 µg/ml vanco ²	24-28u bij 35-37°C	<i>E. faecium</i> : roze <i>E. faecalis</i> : blauw	Wisser, stoelgang	10 ³ CFU/ml	Katalase, indien negatief gevoeligheid voor <i>E. faecalis</i>	ENFM ATCC 700221 (<i>vanA</i>) ENFA ATCC 51299 (<i>vanB</i>) ENFA ATCC 2912 0.5 McF, 1:10 verdunning uitplaten

¹FDA approved media

² Vancomycine concentratie niet aangegeven in de bijsluiter. Bron: Manual of Clinical Microbiology, 11th Ed., 2015.

VRESelect	Bio-Rad	8	<i>E. faecium</i> : roze <i>E. faecalis</i> : blauw; <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

3) Screeningsmethoden

Screening naar VRE: beschikbare media → performantie?

- Enkele studies voorhanden
 - Suggesteren:
 - chromogene media > BEAv, *Campylobacter* agar
 - incubatie 48u: sensitiviteit ↑ (maar specificiteit ↓)
 - aanrijking: sensitiviteit ↑
 - Chromogene bodems onderling gelijkaardig performantie
 - Kunnen niet zomaar vergeleken worden:
 - definitie VRE?
 - verschillend protocol/gouden standaard
 - staaltype
 - inclusiecriteria studiepogulatie
 - verschillende epidemiologie (*vanA/vanB*)

3) Screeningsmethoden

Screening naar VRE: aanrijkingsmedia

- NVMM
 - Aan te raden
 - Geen definitieve aanbeveling over samenstelling
 - Aanpassing i.f.v. lokale epidemiologie
 - *vanB* VRE: geen vancomycine
 - BEA met vancomycine (6µg/l), eventueel amoxicilline (16 µg/ml)
- Literatuur: hogere sensitiviteit, minimaal verlies selectiviteit

Medium	Antibiotica
Gal esculine azide	Vancomycine 4, 6 of 8 µg/ml
Brain Heart Infusion (BHI)	/
Brain Heart Infusion (BHI)	Vancomycine 3, 6 of 30 µg/ml
Medium met gal	Vancomycine 3 µg/ml, colistine 5 µg/ml, amfotericine B 50 µg/ml

4) Validatie screeningsmethode

- 1) Chromogene cultuurmedia
- 2) Campylobacter agar

- Principe:
enzymsubstraten in de bodem → hydrolyse door bepaalde bacterie → kleur
- Voordelen:
 - Tijd en reagentia besparend (geen bijkomende testen)
 - Verhoogde sensitiviteit (mengflora)
 - Verhoogde selectiviteit (↓ groei commensale flora)
- 3 bodems
 - ChromID™ VRE (bioMérieux)
 - Brilliance™ VRE (Oxoid)
 - VRESelect™ (Bio-Rad)



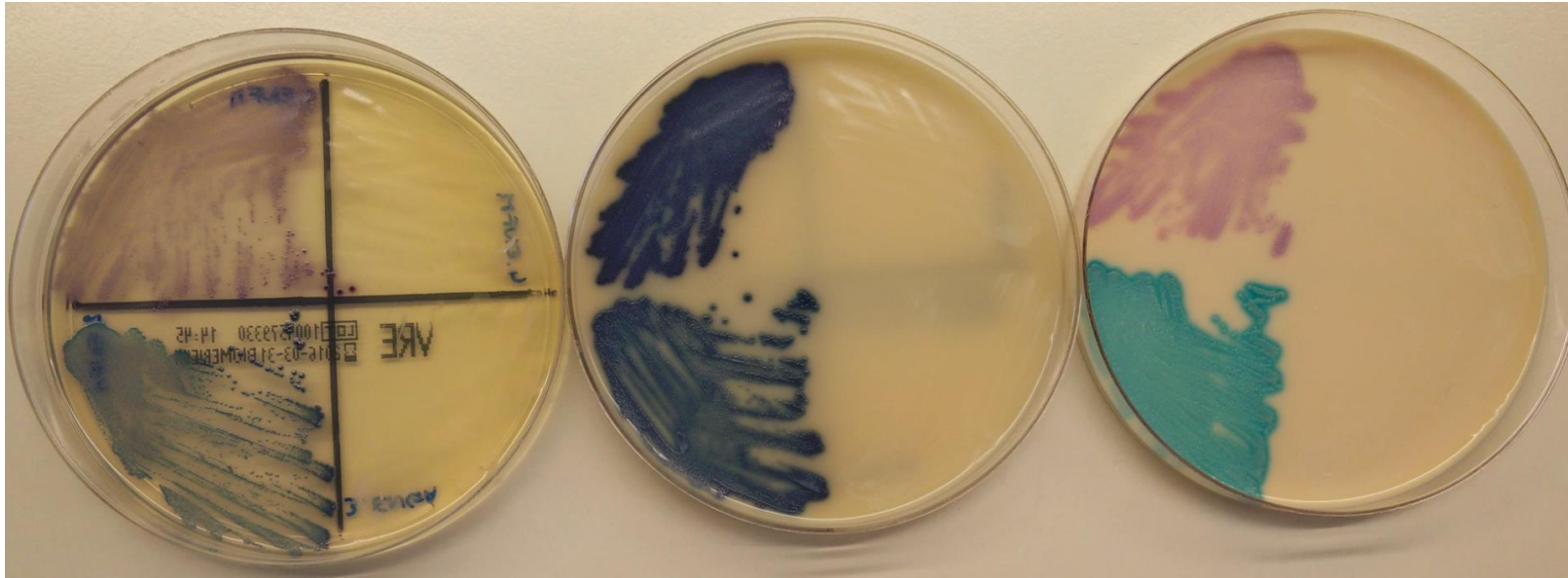
4) Validatie screeningsmethode

- 1) Chromogene cultuurmedia
- 2) Campylobacter agar

ChromID™ VRE (bioMérieux)

Brilliance™ VRE (Oxoid)

VRE™ Select (Bio-Rad)

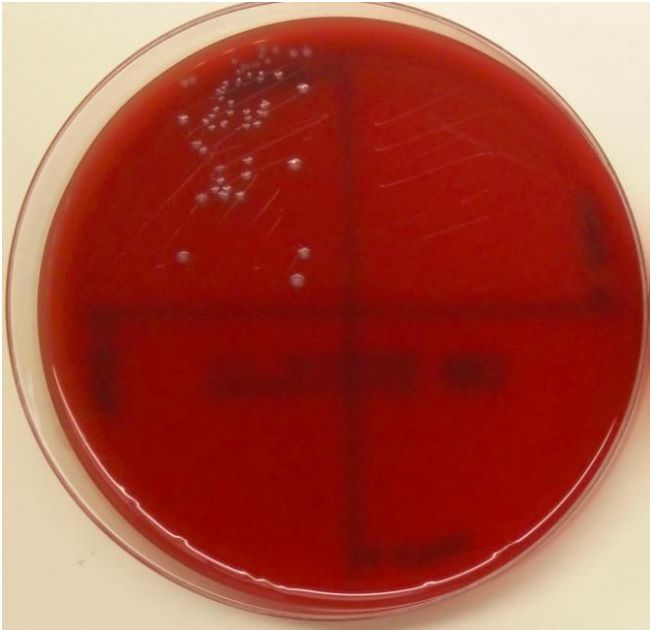


4) Validatie screeningsmethode

1) Chromogene cultuurmedia

2) Campylobacter agar

Campylosel (bioMérieux) 10 µg/ml vancomycine



- reeds gebruikt in de routine (*C. jejuni* / *C. coli*)
- inhibeert fecale flora
- vancomycine (10 µg/ml), amfotericine B (3 µg/ml), cefoperazone (32 µg/ml)
- Goede inhibitie VanC
↓ detectie VanB?
- Studies: *Lactobacillus* spp. 10% vals positieven

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

4) Validatie screeningsmethode

- 1) Selectiviteit
- 2) Vergelijkingsstudie
 - Spiking experiment
 - Prospectieve klinische vergelijkingsstudie
- 3) Houdbaarheidsstudie
- 4) Reproduceerbaarheid

4) Validatie screeningsmethode

1) Selectiviteit

2) Vergelijkingsstudie

→ Spiking experiment

→ Prospectieve klinische vergelijkingsstudie

3) Houdbaarheidsstudie

4) Reproduceerbaarheid

4) Validatie screeningsmethode

- Target opgespoord?
- Andere geremd?

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	$35\pm 2^\circ\text{C}$, aeroob, 24-48u	Groei
<i>E. faecalis</i> ATCC® 51299 (vanB)	10^1 - 10^2 CFU	$35\pm 2^\circ\text{C}$, aeroob, 24-48u	Groei
<i>E. gallinarum</i> ATCC® 700425 (vanC1)	10^1 - 10^2 CFU	$35\pm 2^\circ\text{C}$, aeroob, 24-48u	Geen groei
<i>E. faecium</i> ATCC® 35667	10^1 - 10^2 CFU	$35\pm 2^\circ\text{C}$, aeroob, 24-48u	Geen groei
<i>E. faecalis</i> ATCC® 19433	10^1 - 10^2 CFU	$35\pm 2^\circ\text{C}$, aeroob, 24-48u	Geen groei
<i>E. faecalis</i> ATCC® 29212	10^1 - 10^2 CFU	$35\pm 2^\circ\text{C}$, aeroob, 24-48u	Geen groei
'Challenge' stammen			
<i>E. coli</i> ATCC® 25922	10^3 - 10^4 CFU	$35\pm 2^\circ\text{C}$, aeroob, 24-48u	Geen groei
<i>P. aeruginosa</i> ATCC® 27853	10^3 - 10^4 CFU	$35\pm 2^\circ\text{C}$, aeroob, 24-48u	Geen groei
<i>C. glabrata</i> QC micro M 13554	10^3 - 10^4 CFU	$35\pm 2^\circ\text{C}$, aeroob, 24-48u	Geen groei
<i>S. aureus</i> ATCC® 29213	10^3 - 10^4 CFU	$35\pm 2^\circ\text{C}$, aeroob, 24-48u	Geen groei
<i>K. pneumoniae</i> ATCC® BAA1705 (KPC)	10^3 - 10^4 CFU	$35\pm 2^\circ\text{C}$, aeroob, 24-48u	Geen groei

4) Validatie screeningsmethode

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	telplaat
<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

Geen
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	telplaat
<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

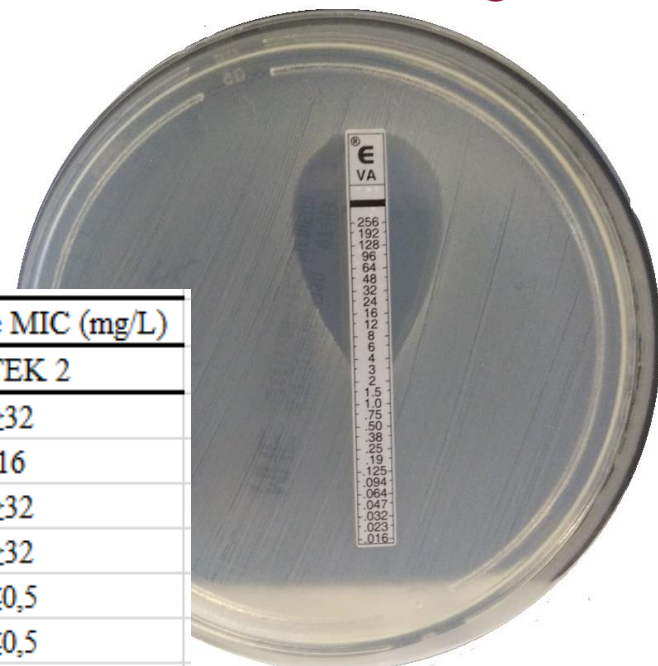
Na
aanrijking

4) Validatie screeningsmethode

- 1) Selectiviteit
- 2) Vergelijkingsstudie
 - Spiking experiment
 - Prospectieve klinische vergelijkingsstudie
- 3) Houdbaarheidsstudie
- 4) Reproduceerbaarheid
- 5) Performantie MALDI-TOF MS

4) Validatie screeningsmethode

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> 14/0631	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



10^3 - 10^4 CFU/ml

4) Validatie screeningsmethode

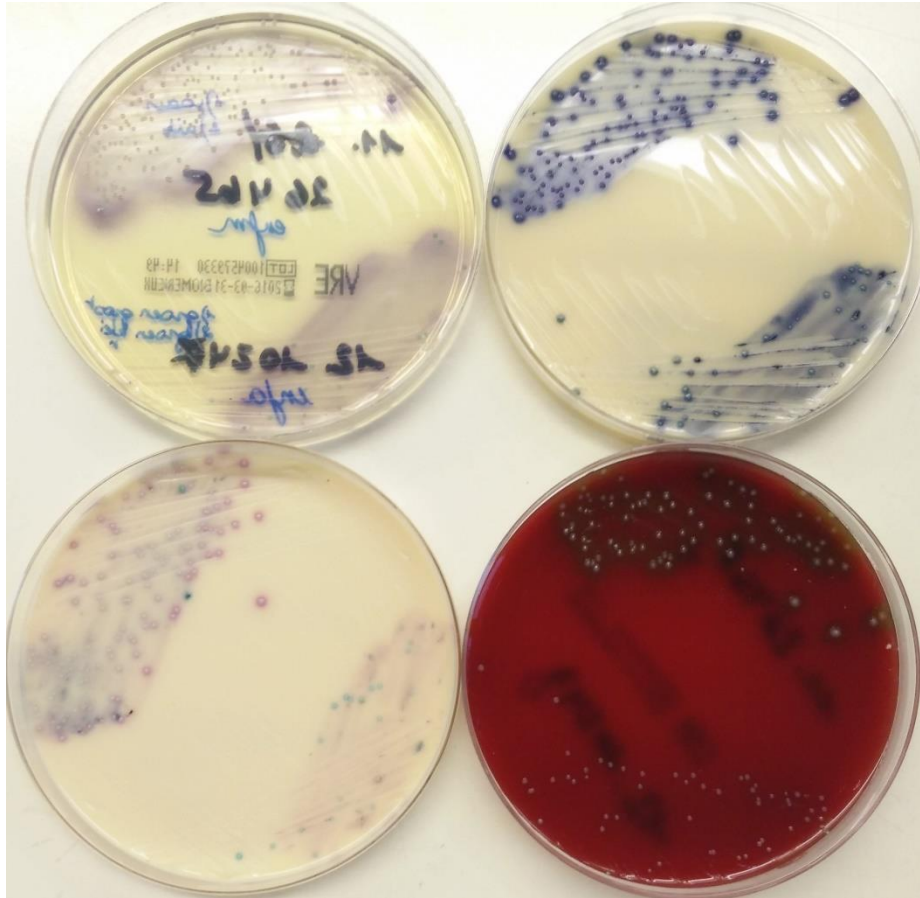
Geen aanrijking		1.ChromID VRE		2.Brilliance VRE		3.VRESelect			4.Campylosel	
Stam	genotype	24u	48u	24u	48u	24u	28u	48u	24u	48u
<i>E. faecium</i> 14/1700	vanA	GF	GC	GC	GC	GF	GC	GC	G	G
<i>E. faecium</i> 14/1702	vanA	GF	GC	GC	GC	GF	GC	GC C/A	G	G
<i>E. faecium</i> 14/1710	vanA	GF	GC	GC	GC	GF	GF	GC C/A	G	G
<i>E. faecium</i> 15/0094	vanA	GF	GC	GC	GC	GF	GC	GC	G	G A
<i>E. faecium</i> 13/0669	vanB	GF	GC	GC	GC	GF	GC	GC	G	G A
<i>E. faecium</i> 14/0201	vanB	GF	GC	GC	GC	GF	GF	GC	G	G A
<i>E. faecium</i> 14/0786	vanA	GF	GC	GC	GC	GF	GF	GC	G	G A
<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	G
<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

Geen
aanrijking

Aanrijking		1.ChromID VRE		2.Brilliance VRE		3.VRESelect			4.Campylosel	
Stam	genotype	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

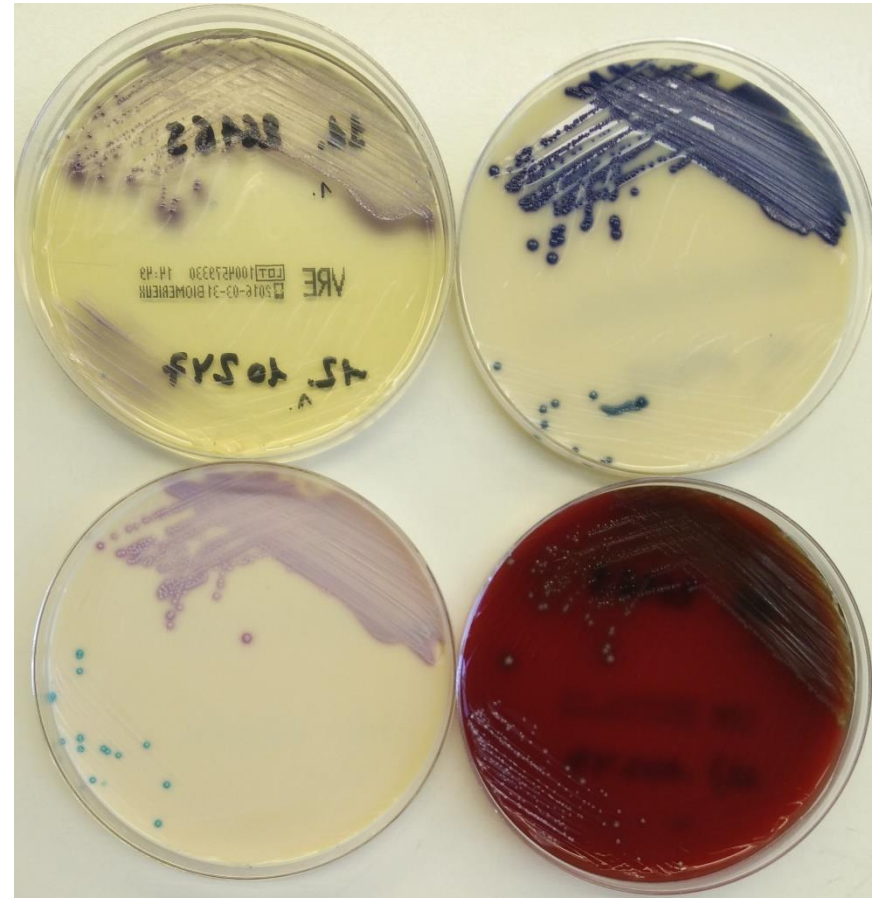
Na
aanrijking

4) Validatie screeningsmethode



Geen aanrijking

48u



Na aanrijking

4) Validatie screeningsmethode

- 1) Selectiviteit
- 2) Vergelijkingsstudie
 - Spiking experiment
 - Prospectieve klinische vergelijkingsstudie
- 3) Houdbaarheidsstudie
- 4) Reproduceerbaarheid
- 5) Performantie MALDI-TOF MS

Dag 1

Enten

Stoelgang/ Rectale wisser



Amies (eSwab)

Chromogeen medium enten

- $35\pm 2^{\circ}\text{C}$, 24u
- Gewone atmosfeer

Aanrijdingsmedium enten

- + Vancomycine $2 \times 5\mu\text{g}$
- $35\pm 2^{\circ}\text{C}$, 18-24u
- Gewone atmosfeer

Dag 2

Aflezen

VRE positief



VRE negatief



Vortexen
Chromogeen medium enten ($10\mu\text{l}$)

Herincubeer ged. 24u

Rapporteer mogelijks VRE

Reincultuur op niet-selectieve bodem

Herincubeer ged. 24u

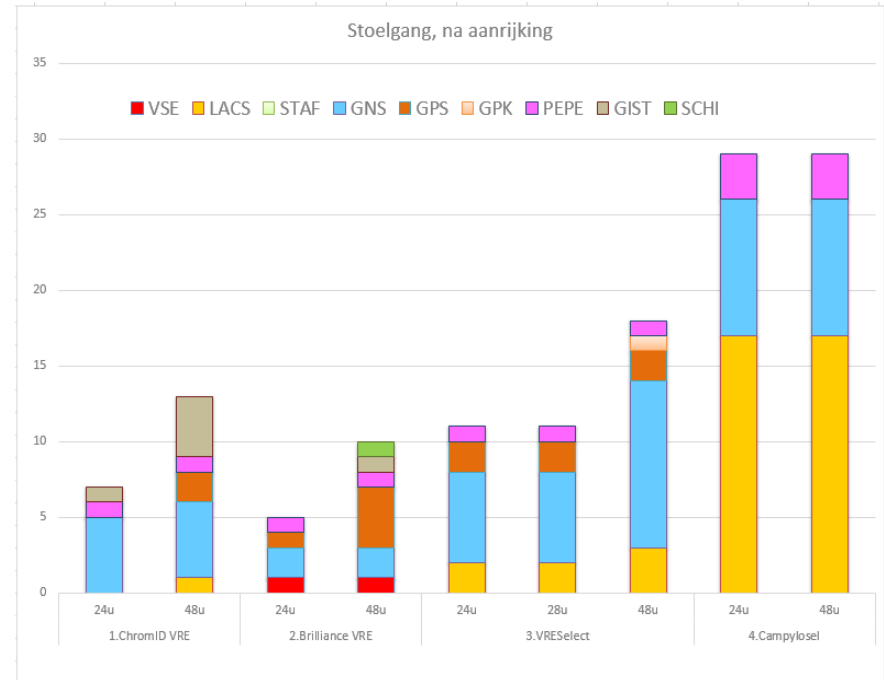
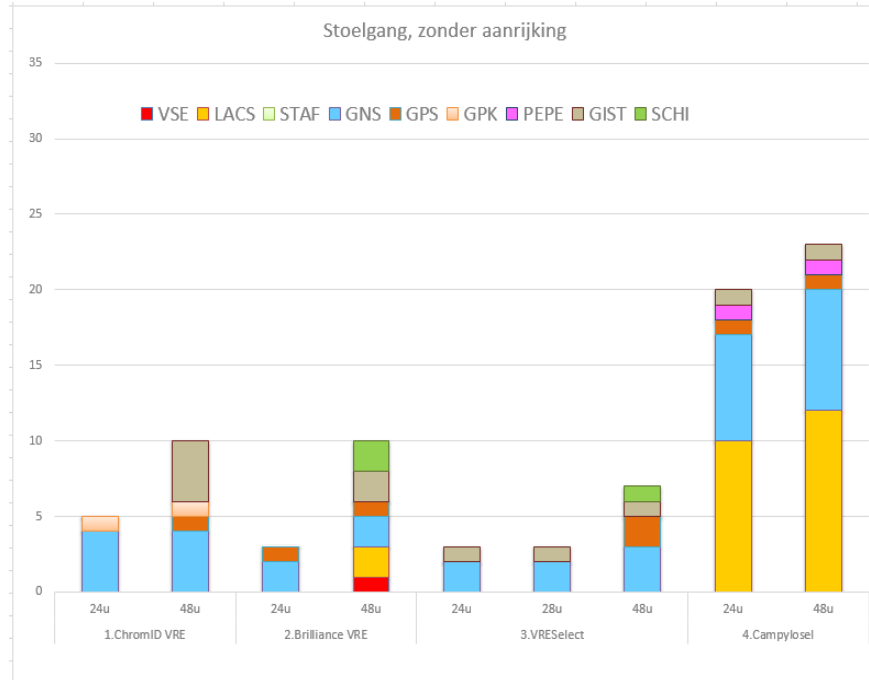
Dag 3

Confirmeren

- Gevoeligheidsbepaling
VITEK 2, E-test
- PCR van genen

Wai-Sing et al. J Antimicrob Chemother. 2015

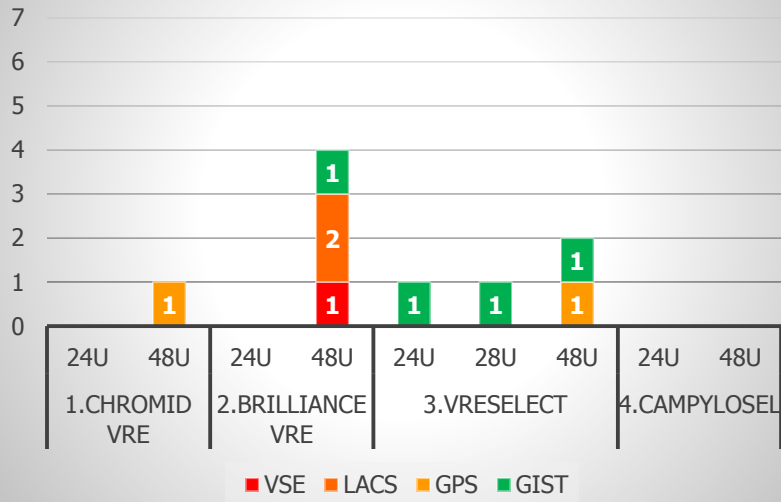
4) Validatie screeningsmethode



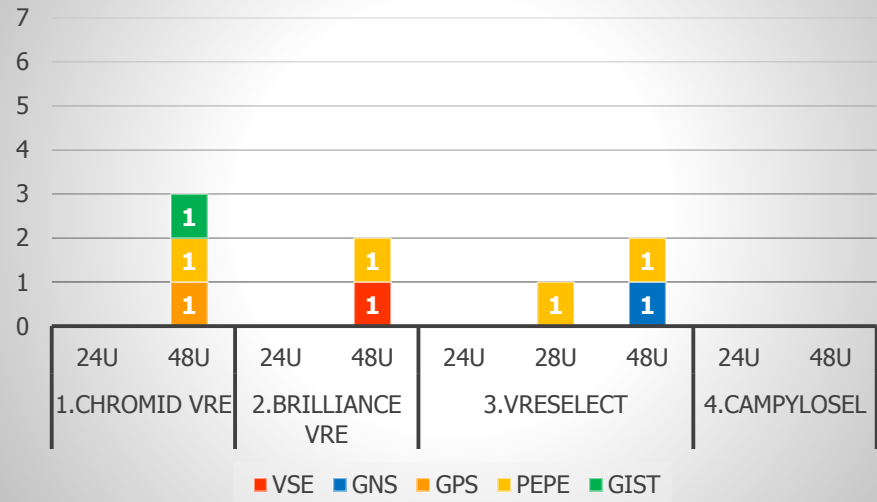
n = 40

4) Validatie screeningsmethode

Feces, zonder aanrijking



Feces, na aanrijking



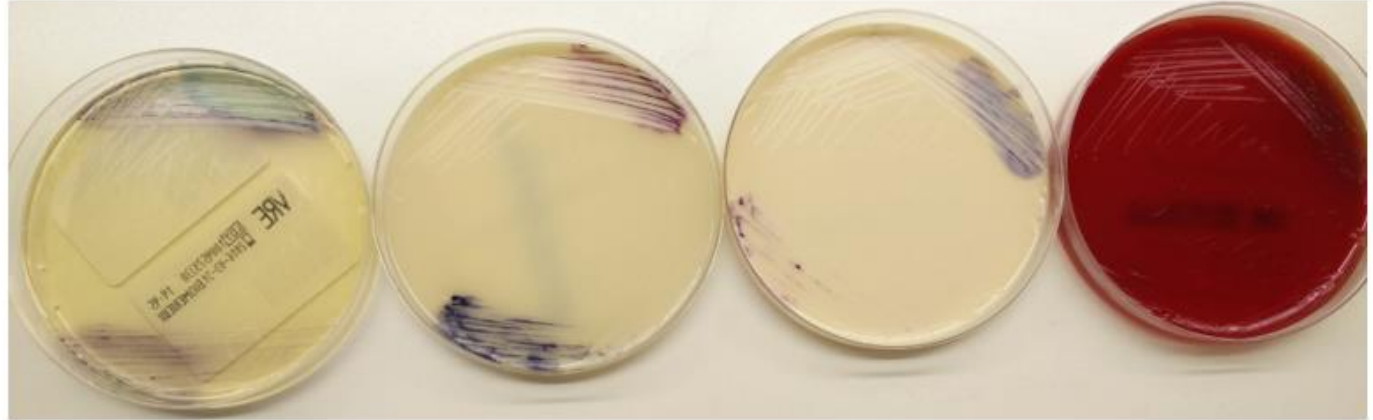
n = 40

4) Validatie screeningsmethode

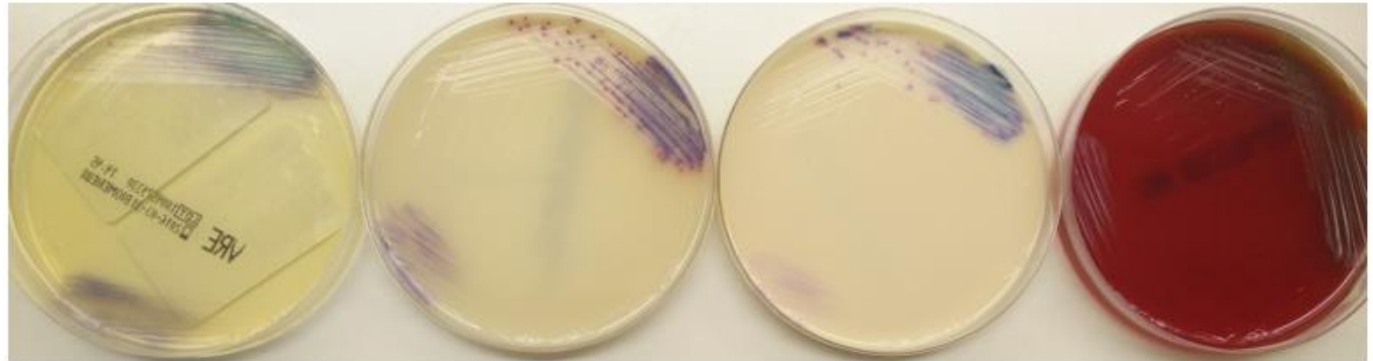
Feces, zonder aanrijking

Pediococcus (PEPE) Feces, na aanrijking

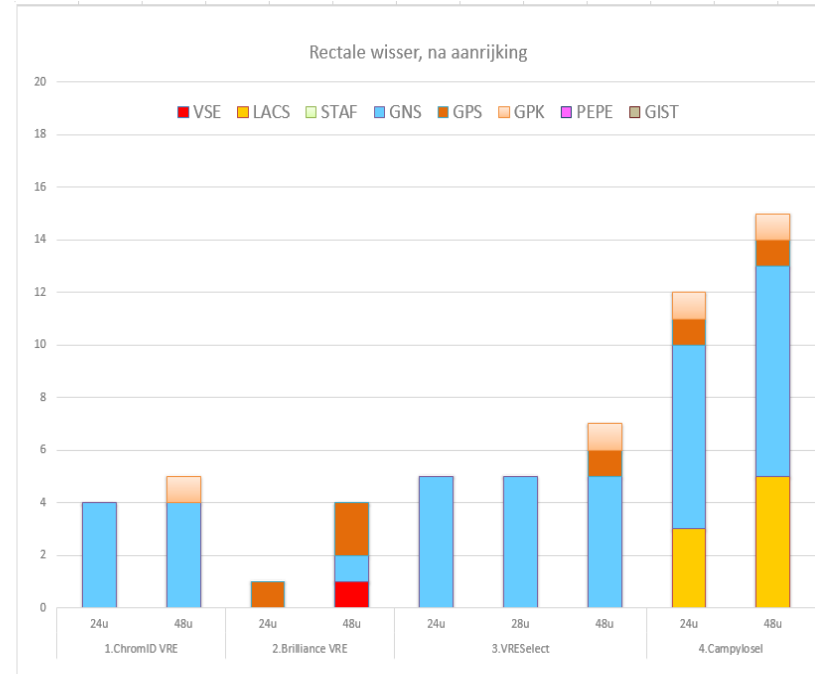
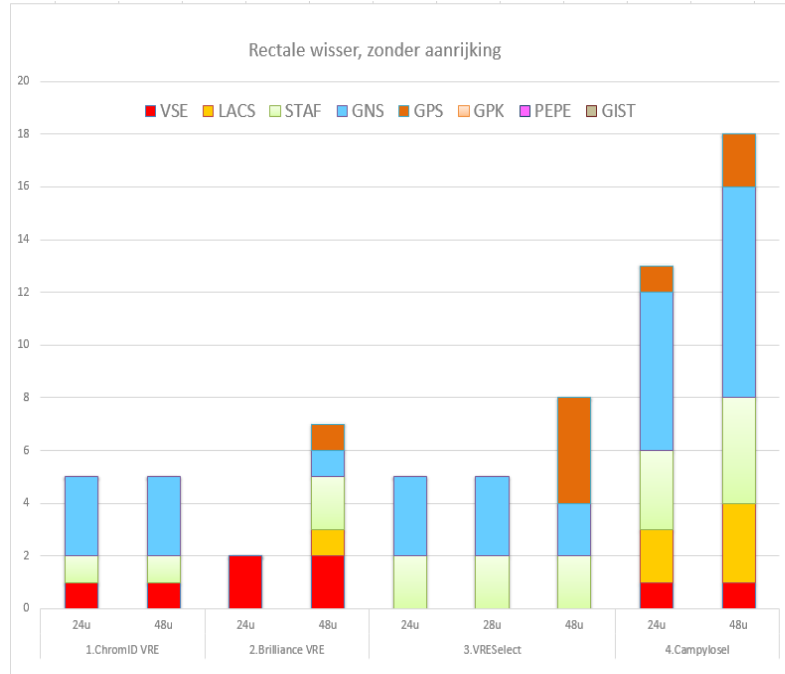
Oorspronkelijk
staal:



Staal na
aanrijking:



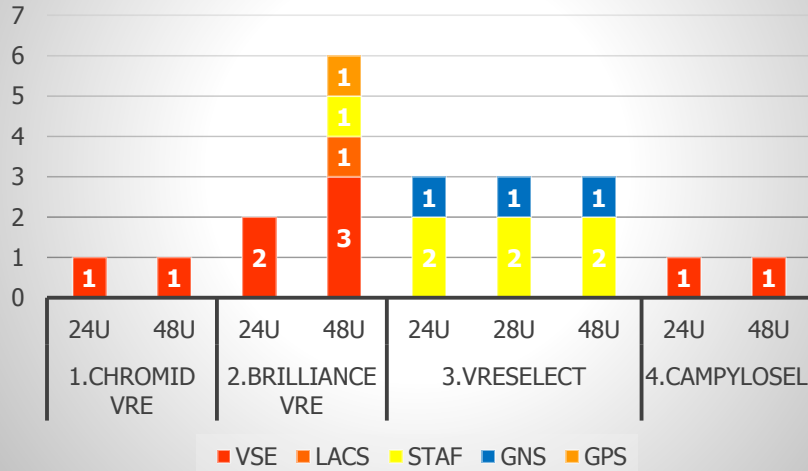
4) Validatie screeningsmethode



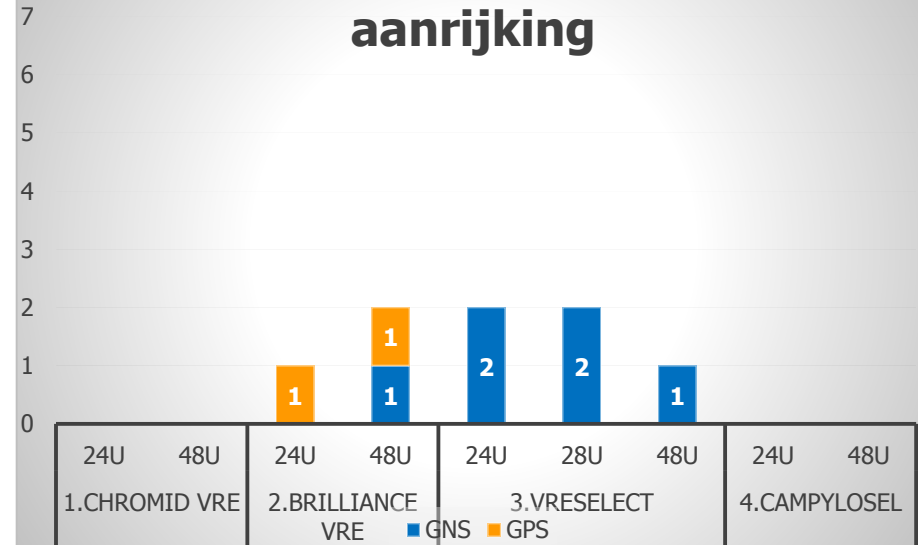
n = 22

4) Validatie screeningsmethode

Rectale wisser, zonder aanrijking



Rectale wisser, met aanrijking



n = 22

4) Validatie screeningsmethode

Conclusie

- Geen detectie VRE
- Geen gouden standaard
 - ‘gouden standaard’ = groei op 1 van de 3 media
- Enkel info over selectiviteit
- Info over gemakkelijkheden om bodem af te lezen (kleine verschillen)

4) Validatie screeningsmethode

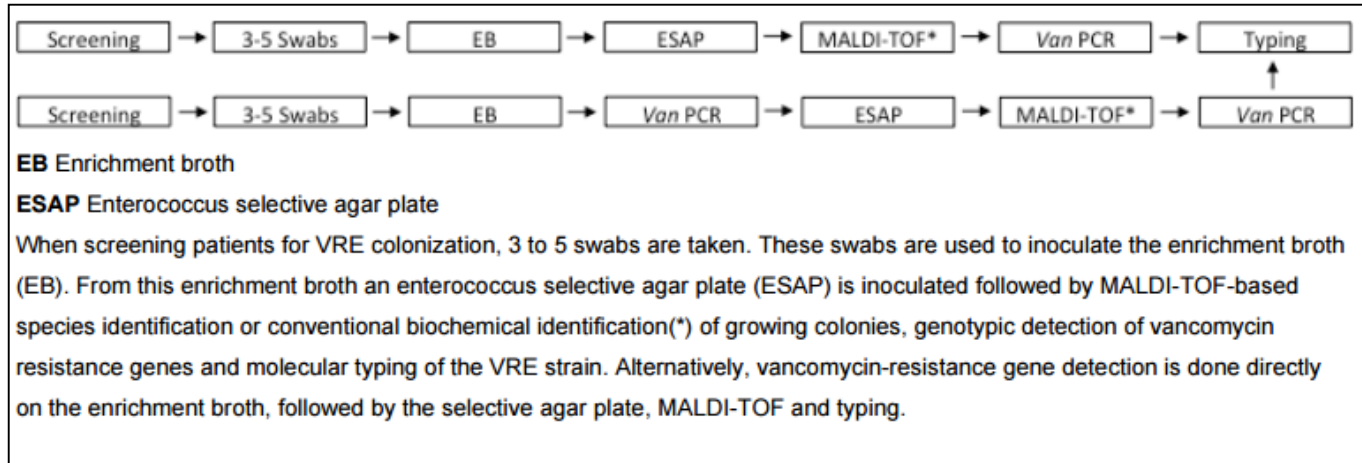
- 1) Selectiviteit
- 2) Vergelijkingsstudie
 - Spiking experiment
 - Prospectieve klinische vergelijkingsstudie
- 3) Houdbaarheidsstudie → OK
- 4) Reproduceerbaarheid → OK

Take home messages:

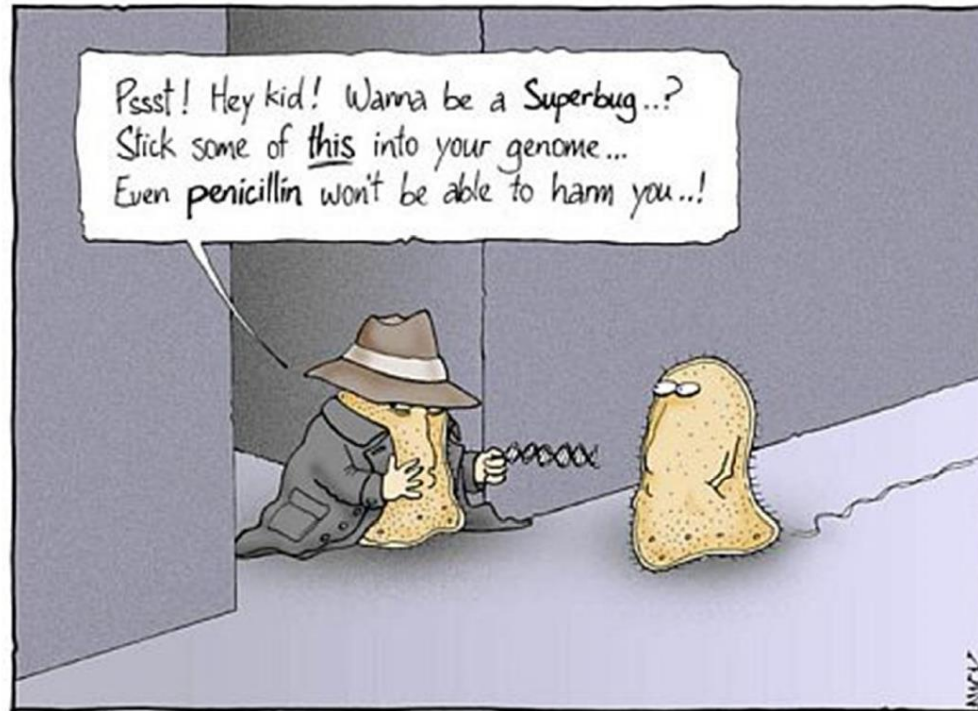
- 1) *vanA/vanB* belangrijk
- 2) Stoelgang/wisser in transportmedium = OK !
- 3) Aanrijkingsmedium
 - 1) In house: aan te passen
 - 2) Geen negatieve interferentie
- 4) Chromogene bodems: gelijkaardige performantie
 - Meerwaarde tov Gal-esculine, *Campylobacter* agar
- 5) Finale keuze obv andere factoren bv. kostprijs

To do/Actions

- 1) Evaluatie kosten
- 2) Implementatie chromogene bodem in de routine
- 3) Evaluatie meerwaarde directe genotypische detectie
 - Problemen met *vanB*
 - Niet beschikbaar tijdens weekend



Bedankt voor de aandacht



Zijn er vragen?