

**CAT**  
**Critically Appraised Topic**

**Heeft MRSA GeneXpert een meerwaarde t.o.v. cultuur? Evaluatie discordanties MRSA screening cultuur en GeneXpert in ZOL Genk.**

Author: Niels Graindor

Supervisor: Dr. Coppens Guy

Date: 21-04-2016

**CLINICAL BOTTOM LINE**

---

Om de verdere verspreiding van MRSA trachten een halt toe te roepen is een goed screeningsbeleid in ziekenhuizen noodzakelijk. Zo zijn bijna alle gevallen van MRSA-kolonisatie en –infectie immers het gevolg van exogene transmissie door andere MRSA-dragers in verzorgingsinstellingen. Een snelle, betaalbare en betrouwbare methode voor opsporen van MRSA is dus naast, o.a. handhygiëne, isolatie en dekolonisatie van MRSA-dragers, een essentieel element in de strijd tegen de nosocomiale transmissie van MRSA. De standaardmethode voor een gevoelige opsporing van MRSA-dragerschap maakt gebruik van een niet selectieve aanrijking gedurende minimaal overnacht incubatie gevolgd door inoculatie op een selectieve chromogene bodem, maar het resultaat hiervan is echter pas definitief na 24-72u. In tussentijd kunnen dragers een belangrijke rol spelen in verdere nosocomiale transmissie indien bij opname geen preventieve isolatie wordt toegepast voor op zijn minst risicopatiënten. Preventieve isolatie van risicopatiënten heeft echter heel wat praktische en logistieke implicaties en onnodige isolatie gaat gepaard met hoge onnodige kosten. Om enerzijds de tijd tot rapportering in te korten en om anderzijds de mogelijkheid te bieden tot een gericht isolatiebeleid, waarbij onnodige preventieve isolatie van risicopatiënten beperkt blijft, werden snelle MRSA-screeningsmethodes op basis van moleculaire technieken ontwikkeld. In het kader van deze Critically Appraised Topic zal nagegaan worden of er een meerwaarde is van de MRSA GeneXpert t.o.v. cultuur, waarbij er voornamelijk gefocust zal worden op de mogelijke discordanties tussen MRSA screening d.m.v. cultuur vs. GeneXpert.

Uit verschillende studies blijkt dat de moleculaire detectie van MRSA m.b.v. GeneXpert een betrouwbare methode is voor het uitsluiten van MRSA-kolonisatie bij risicopatiënten, gezien de hoge negatief predictieve waarde. Een negatief resultaat dient daarom niet noodzakelijk bevestigd te worden d.m.v. de conventionele cultuurmethode. Een positief resultaat dient echter met de nodige voorzichtigheid geïnterpreteerd te worden gezien de lagere positief predictieve waarde, zeker in een populatie met een lage MRSA prevalentie. Daarom wordt aangeraden om een positief screeningsresultaat, bekomen met een moleculaire test, steeds te bevestigen d.m.v. de conventionele cultuurmethode, dit om o.a. onnodige isolatie en daarmee gepaard gaande kosten en lasten te vermijden. De performantie van de GeneXpert MRSA in de literatuur wordt naast de prevalentie, o.a. beïnvloed door de anatomische sites die bemonsterd worden, de MRSA-status van de patiënt in het verleden, de ingestelde cutoff voor de Ct-waarde en kan variëren naargelang het type GeneXpert MRSA-assay. In de literatuur zijn er echter verschillende oorzaken voor discordanties tussen de moleculaire MRSA-assays en de conventionele screening d.m.v. cultuur beschreven. Mogelijke redenen voor discordanties tussen GeneXpert en cultuur zijn: polymorfisme in het rechter

uiteinde van *SCCmec* door bestaan van verschillende subtypes en varianten; het bestaan van *Staphylococcus aureus* “drop-out” stammen, *mecC* positieve methicilline-resistente *Staphylococcus aureus* stammen, of *mecA/mecC* positieve *Staphylococcus aureus* die fenotypisch gevoelig zijn voor oxacilline en/of cefoxitine. De mogelijkheid tot discordante resultaten in vergelijking met cultuur onderstreept het belang van een meer nauwgezette (lokale) evaluatie van dergelijke moleculaire assays, zeker gezien de hoge kostprijs van dergelijke assays en hun niet onomstotelijk bewezen effect op de verdere reductie van nosocomiale MRSA-transmissie.

## **CLINICAL/DIAGNOSTIC SCENARIO**

---

*Staphylococcus aureus* komt als commensaal voor bij een groot deel van de algemene populatie en hoewel het merendeel van de mensen asymptomatisch gekoloniseerd is, kan *S. aureus* ernstige infecties veroorzaken. Methicilline-resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA) is wereldwijd één van de belangrijkste nosocomiale pathogenen en is verantwoordelijk voor een breed spectrum aan infecties. In vergelijking met infecties met methicilline-gevoelige *Staphylococcus aureus* (MSSA), resulteren infecties met methicilline-resistente *Staphylococcus aureus* in een verlengd ziekenhuisverblijf, een hogere morbiditeit/mortaliteit en een verhoogde kostprijs van behandeling. De resistentie aan methicilline en tevens alle andere bèta-lactam antibiotica berust op de aanwezigheid van het *mecA* gen, gelokaliseerd op een mobiel genetisch element dat geïntegreerd wordt in het genoom van *S. aureus*, nl. het staphylococcal cassette chromosome *mec* (*SCCmec*). Het *mecA* gen codeert voor de productie van een gemodificeerd penicillinebindend eiwit, het PBP2a, wat een verminderde affiniteit heeft voor alle bèta-lactam antibiotica. Dit PBP2a met lage affiniteit voor de bèta-lactam antibiotica voorkomt op die manier inhibitie van de celwandsynthese door de bèta-lactam antibiotica<sup>1-4</sup>.

De data van het European Antimicrobial Resistance Surveillance System (EARSS) laten zien dat in 2014, 13.5% van de invasieve *S. aureus* isolaten in België methicilline resistent was<sup>47</sup>. Er is echter een grote variabiliteit in de proportie van methicilline-resistentie in Europa, gaande van om en bij de 1% in de Scandinavische landen en Nederland tot meer dan 50% in sommige Oost- en Zuid-Europese landen<sup>47</sup>. Uit gegevens van het nationaal referentiecentrum voor *S. aureus* (Hôpital Universitaire Erasme-ULB, Brussel) bleek dat het resistentiecijfer, t.t.z. de proportie MRSA-stammen uit klinische *S. aureus* isolaten bij gehospitaliseerde patiënten, een dalende trend vertoonde: van 30.3% in 2004 naar 16.3% in 2014<sup>48</sup>. Verder is er ook een dalende trend in zowel de incidentie van nosocomiaal verworven MRSA, als in de incidentie van MRSA positieve patiënten bij opname. Het aantal patiënten dat bij opname reeds MRSA positief is echter vele malen groter dan het aantal nieuwe gevallen van nosocomiaal verworven MRSA, respectievelijk 6.4/1000 opnames vs. 1.2/1000 opnames. Het externe reservoir gedetecteerd bij opname bestond vooral uit gekende dragers (36.7%) en uit patiënten met recente zorgcontacten (ander ziekenhuis, woonzorgcentra) (36.7%) (health care associated MRSA), terwijl 17.1% echter geen recente zorgcontacten had in de voorgeschiedenis (community acquired MRSA)<sup>48</sup>.

De analyse van grote hoeveelheden MRSA-stammen van wereldwijde oorsprong heeft aangetoond dat de genetische overdracht van de *SCCmec* cassette zich slechts een beperkt aantal keer heeft voorgedaan<sup>6</sup>. De wereldwijde uitbreiding van MRSA is het gevolg van de verspreiding van ongeveer een dozijn epidemische klonen. Zo zijn bijna alle gevallen van MRSA-kolonisatie en –infectie het gevolg van exogene transmissie van andere MRSA-dragers in verzorgingsinstellingen. Patiënten die gekoloniseerd zijn met MRSA fungeren dus bij ziekenhuisopname als een reservoir voor nosocomiale

transmissie. Een gericht en doordacht screeningsbeleid in combinatie met goede (hand)hygiënemaatregelen zijn de belangrijkste factoren ter onderbreking van de nosocomiale transmissieketen<sup>5,20</sup>. Dergelijke screeningsprogramma's voor het opsporen van MRSA-dragers zijn bewezen kosteneffectief, maar over de optimale screeningsstrategie bestaat vooralsnog geen consensus. De 'search-and-destroy' strategie in Nederland en de Scandinavische landen blijkt vrij succesvol te zijn. Deze strategie bestaat uit het actief opsporen van MRSA-dragers gevolgd door isolatie en dekolonisatie van alle MRSA-dragers<sup>20</sup>.

Een snelle, betaalbare en betrouwbare methode voor opsporen van MRSA is dus een essentieel element in de strijd tegen de nosocomiale transmissie van MRSA. Andere elementen die hierin een belangrijke rol spelen zijn o.a. handhygiëne, isolatie en dekolonisatie van MRSA-dragers en natuurlijk ook een rationeel antibiotica gebruik. De standaardmethode voor een gevoelige opsporing van MRSA-dragerschap maakt gebruik van een niet selectieve aanrijking (Tryptic Soy Broth; TSB) gedurende minimaal overnacht incubatie gevolgd door inoculatie op een selectieve chromogene bodem. Het gebruik van een vloeibare aanrijking biedt niet alleen voordelen naar gevoeligheid toe, maar laat ook toe wissers te poolen, wat kosten/baten efficiënt is. Gecombineerde uitstrijkjes van neus, keel en perineum brengen de gevoeligheid op meer dan 98%<sup>13</sup>. Het resultaat van de screening d.m.v. de cultuurmethode is echter pas definitief na 48-72u en in tussentijd kunnen dragers een belangrijke rol spelen in verdere nosocomiale transmissie indien bij opname geen preventieve isolatie wordt toegepast voor op zijn minst risicopatiënten (bv (her)opname van gekende MRSA-drager, patiënten afkomstig uit rust- en verzorgingstehuis, patiënten die recentelijk in een ziekenhuis verbleven). Preventieve isolatie van risicopatiënten heeft echter heel wat praktische en logistieke implicaties en onnodige isolatie gaat gepaard met hoge onnodige kosten. Zo blijkt uit een retrospectieve studie dat slechts 20 à 30% van de patiënten, bij wie tijdens eerdere opnames MRSA werd vastgesteld, bij heropname opnieuw positief is voor MRSA<sup>12</sup>. In een studie uit 2011, uitgevoerd in 60 Belgische woonzorgcentra, bedroeg de prevalentie van MRSA-dragerschap bij bewoners uit woonzorgcentra 13%<sup>7</sup>. Dus indien gebruik gemaakt wordt van MRSA-screening d.m.v. cultuur zou een groot deel van de risicopatiënten bij opname mogelijks onnodig in isolatie verpleegd worden in afwachting van het resultaat van de screening (48-72u), wat resulteert in een hoge onnodige kost. Om enerzijds de tijd tot rapportering in te korten en om anderzijds de mogelijkheid te bieden tot een gericht isolatiebeleid, waarbij onnodige preventieve isolatie van risicopatiënten beperkt blijft, werden snelle MRSA-screeningsmethodes op basis van moleculaire technieken ontwikkeld. Met dergelijke PCR-methodes is het resultaat van de screening gekend binnen de twee uur na aankomst van de stalen in het labo. Deze methode bestaat uit het opsporen van genetisch materiaal via real-time PCR met als target een MRSA specifieke DNA-sequenties in de chromosomale *SCCmec-orfX* junctie.

In het ziekenhuis Oost-Limburg te Genk wordt gebruikt gemaakt van de PCR snelscreening (GeneXpert®, Cepheid) voor de snelle opsporing van de MRSA-status bij risicopatiënten. Gezien de hoge kostprijs van deze moleculaire test, werden de indicaties beperkt tot 3 risicogroepen: (1) (her)opname van gekende MRSA-drager, (2) patiënten afkomstig uit rust- en verzorgingstehuis, (3) kamergenoten van MRSA patiënten. Daar de MRSA sneltest een hoge negatief predictieve waarde heeft, laat deze test toe om in geval van een negatief resultaat de aanwezigheid van MRSA uit te sluiten en bijgevolg moet er geen preventieve isolatie ingesteld worden in afwachting van het resultaat<sup>9</sup>. Ook de klassieke kweek wordt in dit geval niet meer uitgevoerd. De positief predictieve waarde van de sneltest is echter slechts 70-80% en is afhankelijk van de MRSA prevalentie<sup>9</sup>. In geval

van positieve MRSA sneltest wordt de patiënt in isolatie verpleegd en wordt de klassieke kweek ingezet ter confirmatie. Het resultaat hiervan is doorslaggevend voor het verdere ziekenhuishygiënisch beleid. Voor andere MRSA-screeningsindicaties (o.a. follow-up na dekolonisatie) wordt de klassieke MRSA kweek na aanrijking gebruikt.

Hoewel verschillende klinische studies aantonen dat door de invoering van een MRSA-screeningsprogramma de nosocomiale transmissie van MRSA verminderd kan worden, is de meerwaarde van de moleculaire screening, ondanks hun lagere TAT, in de reductie van de nosocomiale MRSA-transmissie beperkt in vergelijking met de conventionele screening d.m.v. cultuur. Zo werd er in een meta-analyse van Tacconelli et al. geen daling vastgesteld in het incidentiecijfer van nosocomiaal verworven MRSA gebruik makende van moleculaire screeningstesten voor MRSA in vergelijking met screening d.m.v. cultuur<sup>17</sup>. In deze meta-analyse concludeerde men dat actieve screening voor MRSA belangrijker is dan de gebruikte screeningstest. In een recente studie van Denis et al. resulteerde universele PCR screening voor MRSA bij opname, ondanks een snellere en gerichtere isolatie, niet in een daling in incidentie van nosocomiaal verworven MRSA<sup>45</sup>. De outcome van de verschillende studies wordt natuurlijk wel beïnvloed door prevalentie van MRSA in de screeningspopulatie, het reeds bestaande screenings- en ziekenhuishygiënisch MRSA-beleid evenals de compliantie ervan en de toepassing van strikte handhygiëne.

Niettegenstaande het feit dat moleculaire screeningsmethodes voor MRSA, door hun hoge negatief predictieve waarde, een betrouwbare test zijn ter exclusie van MRSA-dragerschap in risicopatiënten, is het aangeraden om deze hoge negatief predictieve waarde te blijven evalueren<sup>9</sup>: enerzijds ter validatie van de gebruikte procedure (negatieve GeneXpert zonder bevestiging van het resultaat d.m.v. cultuur), anderzijds ter exclusie van nieuwe MRSA-stammen die niet zouden opgepikt worden door moleculaire screening en zich bijgevolg verder kunnen verspreiden zonder verdere maatregelen. Bovendien zijn er in de literatuur ook verscheidene oorzaken van vals-positieve MRSA resultaten beschreven gebruik makende van moleculaire screeningstesten. Dit kan leiden tot onnodige isolatie, welke gepaard gaat met hoge overbodige kosten.

De mogelijkheid tot discordante resultaten ten opzichte van screening door middel van cultuur, evenals de hoge kostprijs in vergelijking met cultuur en het beperkt effect op de nosocomiale transmissie van MRSA vergeleken met cultuur, onderlijnen de nood aan een meer diepgaande evaluatie van dergelijke moleculaire MRSA-screeningsmethodes. Daarom is het de bedoeling van deze CAT om de performantiekarakteristieken van verschillende moleculaire MRSA-screeningsmethodes (GeneXpert) te evalueren. Bovendien zal in de literatuur gezocht worden naar verschillende oorzaken van discordanties tussen GeneXpert MRSA-screening en conventionele cultuur. Verder zal de performantie van de GeneXpert MRSA-screening in het ziekenhuis Oost-Limburg geëvalueerd worden.

## QUESTION(S)

---

- 1) Wat zijn in de literatuur de performantiekarakteristieken van de verschillende GeneXpert MRSA-assays en welke factoren hebben hier een invloed op?
- 2) Welke mogelijke redenen van discordanties tussen MRSA-screening d.m.v. cultuur vs. GeneXpert zijn beschreven in de literatuur?
- 3) Evaluatie discordanties MRSA screening cultuur en GeneXpert in ZOL Genk.

## SEARCH TERMS

---

- 1) MeSH Database (PubMed): MeSH term: "Methicillin Resistant Staphylococcus aureus, molecular assays".
- 2) PubMed Clinical Queries (from 1966; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi>): Systematic Reviews; Clinical Queries using Research Methodology Filters ("MRSA and screening technique", "MRSA and culture", "MRSA and molecular screening").
- 3) European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC; <http://www.ecdc.europa.eu>), Nederlandse Vereniging voor Medische Microbiologie (NVMM; <http://www.nvmm.nl>), Clinical and laboratory standards Institute (CLSI).
- 4) UpToDate Online version (2016)
- 5) CAT-bibliotheek UZL (<http://www.uzleuven.be/laboratoriumgeneeskunde>)
- 6) Productinformatie firma's: BD, Copan, Cepheid

## RELEVANT EVIDENCE/REFERENCES

---

1. Plata K., Rosato A. E. Węgrzyn G. Staphylococcus aureus as an infectious agent: overview of biochemistry and molecular genetics of its pathogenicity. *Acta Biochim. Pol.* 2009; 56(4): 597-612.
2. Shore A. C., Coleman D. C. Staphylococcal cassette chromosome mec: Recent advances and new insights. *Int. J. Med. Microbiol.* 2013; 303(6-7): 350-359.
3. Deurenberg R. H., Stobberingh E. E. The evolution of Staphylococcus aureus. *Infect. Genet. Evol.* 2008; 8(6): 747-763.
4. R. H. Deurenberg, C. Vink, S. Kalenic, A. W. Friedrich, C. A. Bruggeman, E. E. Stobberingh. The molecular evolution of methicillin-resistant Staphylococcus aureus. *Clin. Microbiol. Infect.* 2007; 13(3): 222-235.
5. Belgian Infection Control Society (BICS) (2003) Guidelines for control and prevention of methicillin-resistant Staphylococcus aureus transmission in Belgian hospitals. Available online at: <http://www.belgianinfectioncontrolsociety.be>
6. Enright MC, Robinson DA, Randle G, Feil EJ, Grundmann H, Spratt BG. The evolutionary history of methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA). *PNAS* 2002; 99(11): 7687-7692.
7. Jans B., Latour K., Catry B., Schoevaerdt D., Huang Te-Din D., Berhin C., Bogaerts P., Glupczynski Y., Nonhoff C., Deplano A., Denis O.; Determinanten van dragerschap van meticilline resistente Staphylococcus aureus (MRSA) in woonzorgcentra; BICS symposium, 17 november 2012. Available online at: [http://www.nsih.be/nursing\\_homes/download\\_nl.asp](http://www.nsih.be/nursing_homes/download_nl.asp)
8. K. Martens, H. De Beenhouwer, J. Frans, A. Van Den Abeele, R. Cartuyvels, G. Coppens on behalf of the Bilulu Study Group. Evaluation of eSwab® for surveillance of MRSA by Xpert MRSA® and culture on pooled samples. 19th ECCMID, Helsinki 16-19 May 2009.
9. M. Depypere, P. Vandecandelaere, J. Frans, A. Van Den Abeele, R. Cartuyvels, G. Coppens, E. Oris, H. De Beenhouwer, K. Van Vaerenbergh on behalf of the Bilulu Study Group. Xpert MRSA: 4 years of experience in a multicenter surveillance protocol. Are negatives really negative? 24th ECCMID, Barcelona 10-13 May 2014.
10. K. Van Vaerenbergh, A. Boel, J. Frans, A. Van Den Abeele, R. Cartuyvels, G. Coppens, H. De Beenhouwer on behalf of the Bilulu Study Group. Is there a need for 'a grey zone' for Xpert MRSA rapid testing? 20th ECCMID, Wenen 10-13 April 2010.
11. Creemers L. CAT: Nut van PCR voor MRSA: wanneer PCR en wanneer kweek? 2009.
12. Van Even E. CAT: Sneltest MRSA, impact in het ziekenhuis, 2010.
13. Muyldermans A. CAT: Optimalisatie en regionale standaardisatie van het MRSA-screeningsbeleid, 2015.
14. Nulens E. thesis: Genetic background and impact of Staphylococcus aureus in a cross-border region, 2010.
15. Cepheid, Bijsluiter Xpert MRSA en SA Nasal Complete, 2015.
16. CHROMagar® MRSA II BD package insert; 2010.
17. Tacconelli E., De Angelis G., de Waure C., Cataldo M. A., La Torre G., Cauda R. Rapid screening tests for methicillin-resistant Staphylococcus aureus at hospital admission: systematic review and meta-analysis. *The Lancet infectious diseases* 2009; 9(9): 546-554.
18. Wolk D. M., Picton E., Johnson D., Davis T., Pancholi P., Ginocchio C. C., Finegold S., Welch D. F., de Boer M., Fuller D., Solomon M. C., Rogers B., Mehta M. S., Peterson L. R. Multicenter evaluation of the

- Cepheid Xpert methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) test as a rapid screening method for detection of MRSA in nares. *J. Clin. Microbiol.* 2009; 47(3): 758-764.
19. Rossney A. S., Herra C. M., Brennan G. I., Morgan P. M., O'Connell B. Evaluation of the Xpert Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) assay using the GeneXpert real-time PCR platform for rapid detection of MRSA from screening specimens. *J. Clin. Microbiol.* 2008; 46(10): 3285-3290.
  20. van Griethuysen A., H. de Neeling, C. Vandenbroucke-Grauls, G. Vos, J. Kluytmans. Richtlijn Detectie van methicilline resistente *Staphylococcus aureus* in Nederland. *Nederlands tijdschrift voor Medische Microbiologie* 2003; 11 (2): 58-65.
  21. Becker K., Denis O., Roisin S., Mellmann A., Idelevich E. A., Knaack D., van Alen S., Kriegeskorte A., Köck R., Schaumburg F., Peters G., Ballhausen B. Detection of *mecA*- and *mecC*-Positive Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Isolates by the New Xpert MRSA Gen 3 PCR Assay. *J. Clin. Microbiol.* 2016; 54(1): 180-184.
  22. Jonckheere S., Van Vaerenbergh K., Boel A., Vankeerberghen A., De Beenhouwer H. How is the Xpert MRSA Gen 3 assay (Cepheid) performing on pooled eSwab medium? *Diag. Microbiol. Infect. Dis.* 2015; 83 (3): 219-221.
  23. Mendes E. R., Watters A. A., Rhomberg P. R., Farrell D. J., Jones R. N. Performance of BD Max StaphSR for Screening of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolates among a Contemporary and Diverse Collection from 146 Institutions Located in Nine U.S. Census Regions: Prevalence of *mecA* Dropout Mutants. *J. Clin. Microbiol.* 2016; 54(1): 204-207.
  24. Laurent C., Bogaerts P., Schoevaerds D., Denis O., Deplano A., Swine C., Struelens M. J., Glupczynski Y. Evaluation of the Xpert MRSA assay for rapid detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from nares swabs of geriatric hospitalized patients and failure to detect a specific SCCmec type IV variant. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2010; 29(8): 995-1002.
  25. Roisin S., Laurent C., Nonhoff C., Deplano A., Hallin M., Byl B., Struelens M. J., Denis O. Positive predictive value of the Xpert MRSA assay diagnostic for universal patient screening at hospital admission: influence of the local ecology. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2012; 31(5): 873-880.
  26. Arbefeville S. S., Zhang K., Kroeger J. S., Howard W.J., Diekema D.J., Richter S.S. Prevalence and Genetic Relatedness of Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus* Isolates Detected by the Xpert MRSA Nasal Assay. *J. Clin. Microbiol.* 2011; 49(8): 2996-2999.
  27. te Witt R., van Belkum A., MacKay W. G., Wallace P. S., van Leeuwen W. B. External quality assessment of the molecular diagnostics and genotyping of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2010; 29(3): 295-300.
  28. Rossney A. S., Herra C. M., Fitzgibbon M. M., Morgan P. M., Lawrence M. J., O'Connell B. Evaluation of the IDI-MRSA assay on the SmartCycler real-time PCR platform for rapid detection of MRSA from screening specimens. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2007; 26(7): 459-466.
  29. Wolk D. M., Marx J. L., Dominguez L., Driscoll D., Schifman R. B. Comparison of MRSA-Select Agar, CHROMagar Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Medium, and Xpert MRSA PCR for Detection of MRSA in Nares: Diagnostic Accuracy for Surveillance Samples with Various Bacterial Densities. *J. Clin. Microbiol.* 2009; 47(12): 3933-3936.
  30. Seungok Lee M.D., Yeon-Joon Park M.D., Kang-Gyun Park M.T., Dong Wook Jekarl M.D., Hyojin Chae M.D., Jin-Kyung Yoo M.T., Sin Won Seo R.N., Jung Eun Choi R.N., Jung Hye Lim R.N., Seon Mi Heo R.N., Ju Hee Seo R.N. Comparative Evaluation of Three Chromogenic Media Combined with Broth Enrichment and the Real-Time PCR-Based Xpert MRSA Assay for Screening of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Nasal Swabs. *Ann. Lab. Med.* 2013; 33(4): 255-260.
  31. Silbert S., Kubasek C., Uy D., Widen R. Comparison of eSwab with traditional swabs for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* using two different walk-away commercial real-time PCR methods. *J. Clin. Microbiol.* 2014; 52(7): 2641-2643.
  32. Wong H., Louie L., Lo R. Y. C., Simor A. E. Characterization of *Staphylococcus aureus* Isolates with a Partial or Complete Absence of Staphylococcal Cassette Chromosome Elements. *J. Clin. Microbiol.* 2010; 48(10): 3525-3531.
  33. Herdman M., Wyncoll D., Halligan E., Cliff P. R., French G., Edgeworth J. D. Clinical Application of Real-Time PCR to Screening Critically Ill and Emergency-Care Surgical Patients for Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: a Quantitative Analytical Study. *J. Clin. Microbiol.* 2009; 47(12): 4102-4108.
  34. Bartels M. D., Boye K., Rohde M. R., Larsen A. R., Torfs H., Bouchy P., Skov R., Westh H. A Common Variant of Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* Type IVa in Isolates from Copenhagen, Denmark, Is Not Detected by the BD GeneOhm Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Assay. *J. Clin. Microbiol.* 2009; 47(5): 1524-1527.

35. Huletsky A., Giroux R., Rossbach V., Gagnon M., Vaillancourt M., Bernier M., Gagnon F., Truchon K., Bastien M., Picard F. J., van Belkum A., Ouellette M., Roy P. H., Bergeron M. G. New Real-Time PCR Assay for Rapid Detection of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Directly from Specimens Containing a Mixture of Staphylococci. *J. Clin. Microbiol.* 2004; 42(5): 1875-1884.
36. Hombach M., Pfyffer G. E., Roos M., Lucke K. Detection of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Specimens from Various Body Sites: Performance Characteristics of the BD GeneOhm MRSA Assay, the Xpert MRSA Assay, and Broth-Enriched Culture in an Area with a Low Prevalence of MRSA Infections. *J. Clin. Microbiol.* 2010; 48(11): 3882-3887.
37. Lepointeur M., Delattre S., Cozza S., Lawrence C., Roux A. L., Rottman M. Comparative Evaluation of Two PCR-Based Methods for Detection of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): Xpert MRSA Gen 3 and BD-Max MRSA XT. *J. Clin. Microbiol.* 2015; 53(6): 1955-1958.
38. Kelley P. G., Grabsch E. A., Howden B. P., Gao W., Grayson M. L. Comparison of the Xpert Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Assay, BD GeneOhm MRSA Assay, and Culture for Detection of Nasal and Cutaneous Groin Colonization by MRSA. *J. Clin. Microbiol.* 2009; 47(11): 3769-3772.
39. Brenwald N. P., Walker B., Chana K., Parsons M., Fleming R., Oppenheim B. Comparison of MRSA detection by Xpert MRSA test, Xpert MRSA/SA nasal test and culture. 20th ECCMID, Wenen 10-13 April 2010.
40. Anil Kumar V., Steffy K., Chatterjee M., Sugumar M., Dinesh K. R., Manoharan A., Karim S., Biswa R. Detection of Oxacillin-Susceptible *mecA*-Positive *Staphylococcus aureus* Isolates by Use of Chromogenic Medium MRSA ID. *J. Clin. Microbiol.* 2013; 51(1): 318-319.
41. Nonhoff C., Roisin S., Hallin M., Denis O. Evaluation of Clearview Exact PBP2a, a New Immunochromatographic Assay, for Detection of Low-Level Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (LL-MRSA). *J. Clin. Microbiol.* 2012; 50(10): 3359-3360.
42. Witte W., Pasemann B., Cuny C. Detection of low-level oxacillin resistance in *mecA*-positive *Staphylococcus aureus*. *Clin. Microbiol. Infect.* 2007; 13(4): 408-412.
43. Deplano A., Vandendriessche S., Nonhoff C., Denis O. Genetic diversity among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates carrying the *mecC* gene in Belgium. *J. Antimicrob. Chemother.* 2014; 69(6): 1457-1460.
44. Paterson G. K., Harrison E. M., Holmes M. A. The emergence of *mecC* methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol.* 2014; 22(1): 42-47.
45. Roisin S., Laurent C., Denis O., Dramaix M., Nonhoff C., Hallin M., Byl B., Struelens M. J. Impact of Rapid Molecular Screening at Hospital Admission on Nosocomial Transmission of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Cluster Randomised Trial. *PLoS One* 2014; 9(5): e96310.
46. Laurent F., Skov R., Pichon B. et al. MRSA harbouring *mecALGA251*, a new highly divergent *mecA* variant: performance of the methods used in routine labs to screen, detect and confirm methicillin resistance. 22th ECCMID, London 31 March-3 April 2012.
47. EARSS 2014: Annual report.
48. Surveillance van antibioticaresistente bacteriën in Belgische ziekenhuizen: Jaarrapport 2014
49. Dodémont M., Verhulst C., Nonhoff C., Nagant C., Denis O., Kluytmans J. Prospective Two-Center Comparison of Three Chromogenic Agars for Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Screening in Hospitalized Patients. *J. Clin. Microbiol.* 2015; 53(9): 3014-3016.
50. BILULU consensus MRSA screening 2011. <http://www.bilulu.be>

***Wat zijn in de literatuur de performantiekarakteristieken van de verschillende GeneXpert MRSA-assays en welke factoren hebben hier een invloed op?***

De eerste generatie moleculaire assays voor opsporen van MRSA waren gebaseerd op de detectie van het *mecA* gen in combinatie met een *Staphylococcus aureus* specifiek gen (*spa*, *nuc*, *fem*). Deze assays konden echter geen onderscheid maken tussen MRSA en de gelijktijdige aanwezigheid van methicilline-sensitieve *Staphylococcus aureus* (MSSA) en methicilline-resistente coagulase-negatieve stafylokokken (MRCoNS) <sup>35</sup>. Bijgevolg kon een dergelijk type van assay moeilijk uitgevoerd worden rechtstreeks op polymicrobiële stalen, zoals bv. een nasale wisser. In tegenstelling tot de eerste generatie moleculaire assays, detecteren de tweede generatie moleculaire assays een MRSA specifieke DNA-sequentie, nl. de *SCCmec-orfX* right extremity junction (MREJ) <sup>35</sup>. De *SCCmec* cassette is geïntegreerd in een specifieke plaats in het genoom van *Staphylococcus aureus* (*attB<sub>SCC</sub>*), die zich bevindt aan het 3' uiteinde van een open reading frame met onbekende functie (*orfX*) <sup>2,4</sup>. De *SCCmec* right extremity junction is één enkele locus die bestaat uit het rechtse uiteinde van *SCCmec* (SRE), de *SCCmec* insertieplaats en een *S. aureus* specifiek gen, nl. *orfX* <sup>2,4</sup>. De Xpert MRSA-assay bevat enerzijds verschillende forward primers die complementair zijn met het rechtse uiteinde van *SCCmec* en anderzijds een reverse primer en probes die specifiek zijn voor een DNA-sequentie in het *orfX*-gen <sup>15,35</sup>. Aangezien het *mecA* gen geïncorporeerd is in de *SCCmec* cassette, wordt de detectie van de *SCCmec-orfX* junctie beschouwd als een surrogaatmarker voor het opsporen van MRSA. Er zijn tot op heden 11 verschillende *SCCmec* types beschreven (I-XI) <sup>2</sup>. Binnen éénzelfde type zijn er echter nog verschillende subtypes mogelijk, zeker voor wat betreft *SCCmec* type II en IV. De Xpert MRSA-assay is een tweede generatie real-time PCR assay gebaseerd op de detectie van de *SCCmec-orfX* junctie en detecteert MRSA-stammen met *SCCmec* types I, II, III, IVa, V en VI <sup>15</sup>. Het toestel automatiseert en integreert extractie, amplificatie en detectie van het MRSA DNA. De staalvoorbereiding is eenvoudig met een minimale hands-on-time en de analyse zelf duurt ongeveer 75 min. De volledige procedure, van staalvoorbereiding tot en met het invoeren van het resultaat, neemt minder dan 90 min in beslag. Dit is dus aanzienlijk sneller in vergelijking met de conventionele cultuurmethode waarbij het resultaat pas na 48u-72u definitief gekend is. Hoewel de Xpert MRSA-assay in principe snel een resultaat kan genereren, wordt de totale TAT echter ook in belangrijke mate beïnvloed door het tijdstip van afname van een MRSA-screening na opname, transporttijd van stalen naar het laboratorium en het al of niet 24/7 uitvoeren van de assay <sup>17</sup>. In de tussentijd kunnen MRSA-dragers potentieel fungeren als een reservoir voor verdere transmissie. Een nadeel van de moleculaire MRSA-assay is de hoge kostprijs van de test in vergelijking met de kostprijs van de conventionele cultuur. Anderzijds resulteren moleculaire assays wel in een reductie van het aantal onnodige preventieve isolatiedagen en bijgevolg worden er op deze manier ook kosten bespaard. Desondanks dit kostenbesparend effect, is de kosteneffectiviteit van moleculaire MRSA-screenings in de literatuur niet overduidelijk bewezen <sup>17,45</sup>.

Tabel 1 toont een overzicht van verschillende studies waarbij de performantiekarakteristieken van verschillende GeneXpert MRSA-assays vergeleken werden met de conventionele cultuurmethode. De moleculaire detectie van MRSA m.b.v. GeneXpert heeft een hoge negatief predictieve waarde, waardoor deze test gebruikt kan worden voor het uitsluiten van MRSA-dragerschap. Een positief resultaat dient echter met de nodige voorzichtigheid geïnterpreteerd te worden, gezien de lage positief predictieve waarde, zeker in een populatie met een lage prevalentie (lage pre-test



<u>Studie (jaar)</u>	<u>Screening</u>	<u>Reference method</u>	<u>Prevalence (%)</u>	<u>Test</u>	<u>Sensitivity (%)</u>	<u>Specificity (%)</u>	<u>PPV (%)</u>	<u>NPV (%)</u>
<b>Jonckheere et al. (2015)</b> <sup>22</sup>	Pooled nasal, throat, perineum swabs. High risk patients	Broth enrichment culture (CHROMagar MRSA II,BD)	15.7	Xpert MRSA Xpert MRSA Gen3	94.4 94.4	97.9 91.8	89.5 68	99 98.9
<b>Laurent et al. (2010)</b> <sup>24</sup>	Nasal swabs. Geriatric patients	Broth enrichment culture (MRSA Select, Bio-Rad)	10.2	Xpert MRSA	69.2	97.7	78.3	96.3
<b>Lepointeur et al. (2015)</b> <sup>37</sup>	Nasal swabs. Patients in high-prevalence wards.	Broth enrichment culture (ChromID MRSA agar, bioMérieux)	31	Xpert MRSA Gen3	95.7	100	100	99
<b>Brenwald et al. (2010)</b> <sup>39</sup>	Nasal swabs	Broth enrichment culture on chromogenic MRSA agar	30.3	Xpert MRSA/SA nasal	84.8	91	80.4	93.2
<b>Roisin et al. (2012)</b> <sup>25</sup>	Nasal swabs. Risk patients	Broth enrichment culture (ChromID MRSA agar, bioMérieux)	3	Xpert MRSA	62.5	97.4	40.8	98.9
<b>Rossney et al. (2008)</b> <sup>19</sup>	Nasal, throat, perineum swabs. All patients	Broth enrichment culture (MRSA Select, Bio-Rad)	15.5	Xpert MRSA	90	97	86	98
<b>Wolk et al. (2009)</b> <sup>18</sup>	Nasal swabs. Risk patients	Broth enrichment culture (CHROMagar MRSA II, BD)	19.6	Xpert MRSA	86.3	94.9	80.5	96.6
<b>Kelley et al. (2009)</b> <sup>38</sup>	Nasal and groin swabs.	Broth enrichment culture (MRSA agar, Oxoid)	26.7	Xpert MRSA	75	94.7	84	91.1
<b>Seungok Lee et al. (2013)</b> <sup>30</sup>	Nasal swabs. ICU patients	Broth enrichment culture (Brilliance agar I, Oxoid; Brilliance agar II, Oxoid; ChromID MRSA agar, bioMérieux)	17	Xpert MRSA	92.6	96.7	85.1	98.5
<b>BILULU study group (2014)</b> <sup>9</sup>	Pooled nasal, throat, perineum swabs. High risk patients	Broth enrichment culture on chromogenic MRSA agar	10.3	Xpert MRSA	85.9	96.8	82.1	98.4
<b>Nulens (2010)</b> <sup>14</sup>	Nasal and throat swabs. Emergency department	Broth enrichment culture (MRSA Select, Bio-Rad)	1.6	Xpert MRSA	62.5	97.7	31.3	99.4

Tabel 1: literatuuroverzicht van de performantiekarakteristieken van verschillende GeneXpert MRSA-assays.

probabiliteit). De positief predictieve waarde is te laag voor een betrouwbare detectie van MRSA-dragers en bijgevolg dient een positief PCR resultaat steeds geverifieerd te worden d.m.v. de conventionele cultuurmethode, aangezien een vals-positief resultaat leidt tot onnodige isolatie, welke gepaard gaat met hoge onnodige kosten en negatieve consequenties voor de patiënt.

De gevoeligheid voor het opsporen van MRSA-dragerschap wordt o.a. beïnvloedt door het aantal anatomische screeningssites dat bemonsterd wordt bij de patiënt<sup>13</sup>. In de literatuur bestaat er een consensus dat het screenen van enkel de neus onvoldoende is voor het opsporen van MRSA-kolonisatie<sup>19,36</sup>. Zo heeft nasale screening slechts een sensitiviteit van 80% in het opsporen van MRSA-dragerschap. Door het bemonsteren van enkel de neus zou dus een significant aantal dragers gemist worden, met potentiële verspreiding van MRSA tot gevolg. Verschillende richtlijnen bevelen daarom, naast screening van beide neusholten, het screenen van keel en perineum aan<sup>5,20</sup>. Door het combineren van deze drie screeningsplaatsen (keel, neus, perineum) zou het overgrote deel van de MRSA-dragers opgespoord worden. Andere lichaamssites zijn aanzienlijk minder frequent gekoloniseerd<sup>36</sup>. De Xpert MRSA-assay is evenwel enkel gevalideerd voor gebruik van nasale wissers (Copan® dual swab)<sup>15</sup>. Een multicenter-studie van Martens et al. (2009) toont echter aan dat het gebruik van gepoold (neus, keel, perineum) eSwab® liquid transport medium (Copan®) een geschikte matrix is voor het inzetten van de Xpert MRA-assay<sup>8</sup>. Het poolen van stalen heeft dus twee belangrijke voordelen, enerzijds leidt dit tot een toename in detectiegevoeligheid van MRSA-dragerschap en anderzijds resulteert het poolen van stalen in een lagere kostprijs van de moleculaire assay. In een studie van Hombach et al. (2010)<sup>36</sup> werden de performantiekarakteristieken van de Xpert MRSA-assay ten opzichte van de cultuurmethode vergeleken voor verschillende anatomische screeningsplaatsen. Screeningsstalen afkomstig van de keel, oksel, vagina en wonden gaven frequenter aanleiding tot discordante resultaten (vals-positief) in vergelijking met screeningsstalen afkomstig van neus en lies. Dit zou onder andere kunnen te wijten zijn aan de lagere graad van MRSA-kolonisatie t.h.v. deze anatomische locaties en de bijgevolg lagere pre-test probabiliteit of aan een complexere staalmatrix wat zou kunnen resulteren in aspecifieke amplificatie. Bovendien resulteerden screeningsstalen van oksel, keel, vagina en wonden frequenter in een inhibitie van de PCR-reactie in vergelijking met screeningsstalen van neus en lies.

De standaardmethode voor een gevoelige opsporing van MRSA-dragerschap maakt gebruik van een niet selectieve aanrijking (TSB) gedurende minimaal overnacht incubatie gevolgd door inoculatie op een selectieve chromogene bodem<sup>5,20</sup>. Op die manier kan de detectiekans significant verhoogd worden. Alle studies in bovenstaande tabel maken gebruik van de broth enrichment culture als gouden standaard methode bij de bepaling van de performantiekarakteristieken van de verschillende GeneXpert assays ter detectie van MRSA. Broth enrichment culture als gouden standaard resulteert echter in een lagere sensitiviteit en een hogere specificiteit van de moleculaire assays in vergelijking met directe cultuur op een chromogene MRSA-bodem.

Een groot probleem in de evaluatie van de moleculaire assays voor het opsporen van MRSA, is de interpretatie van discordante resultaten tussen beide methoden. Dient een positief resultaat met een moleculaire test in combinatie met een negatieve kweek geïnterpreteerd te worden als een vals-positieve moleculaire screening of als een vals-negatieve kweek? Cultuur detecteert immers enkel levensvatbare micro-organismen, daar waar moleculaire assays ook afgestorven materiaal kunnen detecteren. Sommige studies (tabel 1) trachten dit probleem te omzeilen door enerzijds te kijken naar de MRSA-status van de patiënt in het verleden en anderzijds naar de eventuele aanwezigheid

van MRSA kolonisatie op een andere anatomische locatie. Een positieve GeneXpert MRSA-assay in combinatie met een negatieve cultuur wordt daarom in sommige studies (tabel 1) als terecht positief beschouwd, indien de patiënt in het afgelopen jaar reeds MRSA positief was of, indien patiënt gekoloniseerd is met MRSA t.h.v. een andere anatomische locatie dan de locatie van moleculaire screening. Deze vergelijking is echter niet volledig betrouwbaar en kan resulteren in een overschatting van de sensitiviteit en specificiteit van de moleculaire assays en in een onderschatting van de sensitiviteit en specificiteit van de cultuurmethode. Een andere reden voor een positieve GeneXpert MRSA-assay in combinatie met een negatieve kweek is het gebruik van lokale of systemische antibiotica actief tegen MRSA tijdens of in de week voor afname van de screeningsstalen. Het (recente) gebruik van antibiotica actief tegen MRSA is echter een exclusiecriteria in de meeste studies ter evaluatie van de performantie van de moleculaire MRSA-assays.

De Xpert MRSA is een kwalitatieve Taqman<sup>®</sup>-gebaseerde test. De interpretatie is gebaseerd op een Cycle Threshold (Ct) voor het fluorescentiesignaal van de *SCCmec-orfX* junctie amplificatie; bij een Ct  $\leq 36$  wordt als resultaat “positief” weergegeven, bij een Ct  $> 36$  “negatief”<sup>15</sup>. Het gebeurt soms dat de Ct-waarde groter is dan 36 en dat er toch enige evidentie is voor amplificatie, zoals een beginnende amplificatiecurve welke zich uit als een exponentiële toename in het fluorescentiesignaal. Bij een cutoff waarde van 36 kunnen zowel vals-negatieve als vals-positieve MRSA resultaten voorkomen. Zo kunnen sommige MRSA-stammen wel degelijk evidentie voor amplificatie vertonen, maar met een Ct-waarde groter dan 36, wanneer zij bijvoorbeeld in zeer lage concentratie aanwezig zijn in het screeningsstaal. Omgekeerd kunnen sommige MSSA-stammen ook een amplificatiecurve vertonen door mogelijkheid van specifieke amplificatie.

In een BILULU multicenter uit 2010<sup>10</sup> studie werd de invoering van een twijfelachtige interpretatieve categorie geëvalueerd, waarbij het resultaat van de Xpert MRSA-assay als twijfelachtig beschouwd (“grijze zone”) werd, indien de Ct-waarde van de *SCCmec-orfX* junctie amplificatie groter is dan 36. Indien laattijdige amplificatie optrad (Ct  $> 36$ ), werd het negatieve GeneXpert resultaat doorgegeven als “twijfelachtig” en moest het resultaat van de cultuur afgewacht worden. Er werd enkel negatief doorgegeven in het labo-informaticasysteem, indien de Ct-waarde van de *SCCmec-orfX* junctie amplificatie gelijk was aan 0. In dit geval werd er dan ook geen kweek meer ingezet. Bij positieve Xpert MRSA resultaten werd er onmiddellijk gerapporteerd dat het staal verdacht was voor de aanwezigheid van MRSA. Een positief resultaat werd steeds geconfirmeerd door middel van cultuur. Van de 4745 geteste stalen, waren 3945 stalen negatief voor MRSA (Ct = 0). 663 stalen waren Xpert MRSA positief (Ct  $\leq 36$ ). Van deze 663 waren 513 stalen cultuur positief (PPV 77%). 137 (3%) stalen hadden een twijfelachtig resultaat (Ct  $\neq 0$  en  $> 36$ ). Van deze 137 stalen, waren er 29 MRSA positief in kweek. Door het invoeren van deze grijze zone steeg de sensitiviteit van de Xpert MRSA-assay met 5,3%. Het invoeren van een dergelijke grijze zone resulteerde echter wel in een toename met 20% van het aantal GeneXpert stalen waarbij nog een kweek moest ingezet worden ter confirmatie.

Er bestaan verschillende GeneXpert assays voor het opsporen van MRSA. Naast de klassieke Xpert MRSA-assay, die enkel de *SCCmec-orfX* junctie detecteert (*SCCmec* type I-VI), is er ook de Xpert SA Nasal Complete assay, die naast de *SCCmec-orfX* junctie ook het *mecA* gen en het *spa* gen, een *Staphylococcus aureus* specifiek gen, detecteert. Deze assay kan zowel gebruikt worden voor het opsporen van methicilline-resistente als methicilline-gevoelige *Staphylococcus aureus* stammen<sup>15</sup>. In tegenstelling tot de klassieke Xpert MRSA-assay, bevat de Xpert MRSA Gen 3 assay een breder

gamma aan primers voor de detectie van de SCCmec-orfX junctie DNA-sequentie (SCCmec type I-XI)<sup>15,22,37</sup>. Ter verbetering van de specificiteit bezit deze assay ook primers en probes ter opsporing van zowel het mecA als het mecC gen. In een studie van Jonckheere et al. (2015)<sup>22</sup> werd de performantie van de Xpert MRSA Gen 3 assay vergeleken met de klassieke Xpert MRSA-assay voor het opsporen van MRSA in 115 hoog risico patiënten gebruik makende van gepoolde (keel, neus, perineum) eSwab® wissers. Beide assays hadden een sensitiviteit van 94.4 % en een negatief predictieve waarde van 99%. Ondanks de mogelijkheid tot opsporing van een breder gamma aan MRSA SCCmec types resulteert de Xpert MRSA gen 3 assay in deze studie niet in een toename van de sensitiviteit. De specificiteit en de positief predictieve waarde van de Xpert MRSA gen 3 assay waren daartegen significant lager dan deze van de Xpert MRSA-assay. Deze bedroegen respectievelijk 91.8% en 68% voor de Xpert MRSA gen 3 assay tegenover 97.9% en 89.5% voor de Xpert MRSA-assay. Van de in totaal 97 cultuur negatieve stalen waren er slechts 2 positief met de Xpert MRSA-assay tegenover 8 met de Xpert MRSA gen 3 assay. Eén vals-positief resultaat werd veroorzaakt door een mec “drop-out” Staphylococcus aureus mutant. De andere zeven stalen waren vermoedelijk vals-positief omdat i) 6 van deze 7 stalen negatief waren met de Xpert MRSA-assay, ii) de cultuur na aanrijking in een niet selectief medium negatief was en iii) stalen afkomstig waren van patiënten, die niet in een MRSA decontaminatie schema zaten, of die geen antibiotica kregen met activiteit tegen MRSA, waardoor een vals-positief resultaat door detectie van genetisch materiaal van een niet levensvatbare MRSA-stam vermoedelijk kan uitgesloten worden. De meeste vals-positieve resultaten hadden ook een hogere Ct-waarden voor de SCCmec-orfX junctie amplificatie in vergelijking met de terecht positieve GeneXpert stalen. Dit bleek ook uit een studie van Wolk et al. (2009)<sup>29</sup> en van Lee et al. (2013)<sup>30</sup>, waarin vastgesteld werd dat de Ct-waarde van de SCCmec-orfX junctie amplificatie significant lager was voor concordante stalen in vergelijking met deze van discordante stalen. Een breder panel aan primers en probes in combinatie met een meer complexe staalmatrix in het gepoolde eSwab® medium zou kunnen resulteren in meer specifieke amplificaties van de SCCmec-orfX junctie, o.a. bij MSSA-stammen<sup>22</sup>. Zo kon er uit 6 van de 8 vals-positieve stalen een MSSA-stam geïsoleerd worden. Voor twee van deze stammen was er evidentie voor amplificatie van de SCCmec-orfX junctie indien een suspensie van deze stammen rechtstreeks geanalyseerd werd d.m.v. de Xpert MRSA gen 3 assay.

**Conclusie:** *Uit het merendeel van de studies blijkt dat de moleculaire detectie van MRSA m.b.v. GeneXpert een betrouwbare methode is voor het uitsluiten van MRSA-kolonisatie bij risicopatiënten, gezien de hoge negatief predictieve waarde. Een negatief resultaat dient daarom niet noodzakelijk bevestigd te worden d.m.v. de conventionele cultuurmethode. Een positief resultaat dient echter met de nodige voorzichtigheid geïnterpreteerd te worden gezien de lagere positief predictieve waarde, zeker in een populatie met een lage MRSA prevalentie. Daarom wordt aangeraden om een positief screeningsresultaat, bekomen met een moleculaire test, steeds te bevestigen d.m.v. de conventionele cultuurmethode, dit om o.a. onnodige isolatie en daarmee gepaard gaande kosten en lasten te vermijden. De performantie van de GeneXpert MRSA in de literatuur is naast de MRSA-prevalentie, onder meer afhankelijk van de anatomische sites die bemonsterd worden (aantal + locatie), de MRSA-status van de patiënt in het verleden, de ingestelde cutoff voor de Ct-waarde en kan variëren naargelang het type GeneXpert MRSA-assay.*

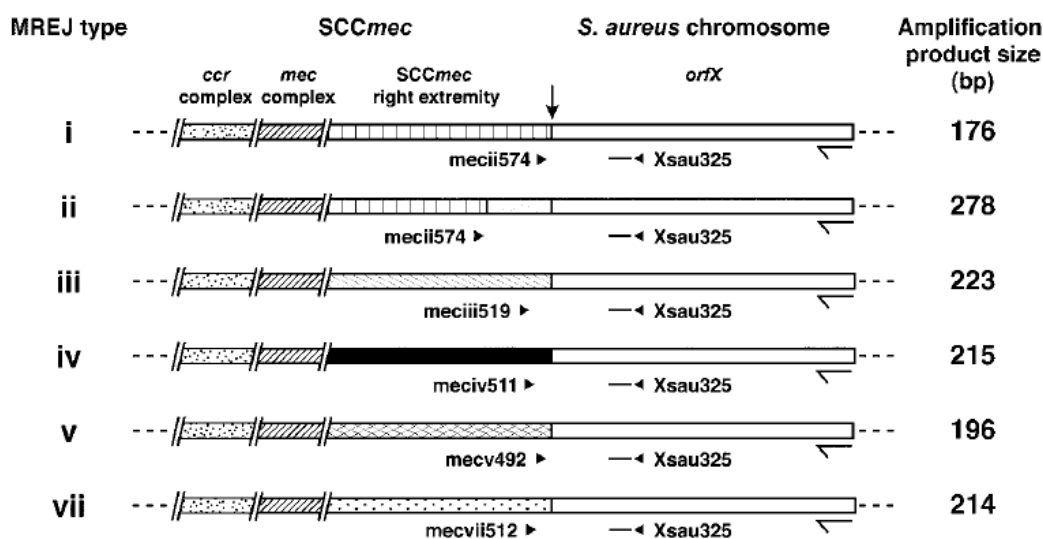
### **Welke mogelijke redenen van discordanties tussen MRSA-screening d.m.v. cultuur vs. GeneXpert zijn beschreven in de literatuur?**

Daar waar in het eerste gedeelte dieper werd ingegaan op de performantiekarakteristieken van de verschillende GeneXpert MRSA-assays, zal het tweede gedeelte handelen over een aantal mogelijke redenen van discordanties tussen de moleculaire MRSA-screening enerzijds en de conventionele screening d.m.v. cultuur anderzijds. Eén van de redenen waarom moleculaire methoden voor het screenen naar MRSA kunnen resulteren in vals-positieve resultaten, is het feit dat zij niet zozeer het *mecA* gen als target hebben, maar wel de *SCCmec-orfX* junctie. Omdat het *mecA* gen geïncorporeerd is in de *SCCmec* cassette, wordt de detectie van de *SCCmec-orfX* junctie beschouwd als een surrogaatmarker voor het opsporen van MRSA<sup>35</sup>. Verder zijn er tot op heden 11 verschillende *SCCmec* types beschreven (I-XI), waarbij er binnen eenzelfde type nog verschillende subtypes mogelijk zijn<sup>2</sup>. Het al of niet kunnen opsporen van bepaalde *SCCmec* types en hun varianten is afhankelijk van de gebruikte primers in de verschillende GeneXpert MRSA-assays, wat kan resulteren in vals-negatieve resultaten in vergelijking met de conventionele cultuurmethode. Zo zijn er verschillende varianten van een *SCCmec* type beschreven die initieel niet konden opgespoord worden door moleculaire methoden en enkel na ontwikkeling van nieuwe primers konden gedetecteerd worden<sup>24,25,34</sup>. Bovendien tonen sommige studies aan dat de LoD (limit of detection) van moleculaire screening groter is dan deze van cultuur na aanrijking, maar kleiner dan deze van rechtstreekse cultuur<sup>19,28</sup>. Naast *mecA* MRSA-stammen bestaan er ook *mecC* MRSA-stammen<sup>43,44</sup>. Deze kunnen enkel opgespoord worden met de Xpert MRSA Gen 3 assay en niet met de klassieke Xpert MRSA-assay, aangezien deze geen primers bevat voor de detectie van zowel het *mecC* gen, als voor detectie van *SCCmec* type XI<sup>15</sup>, welke geassocieerd is met de aanwezigheid van *mecC* MRSA. Verder zijn er ook MRSA-stammen beschreven die *mecA* of *mecC* bezitten (definitie MRSA), maar die fenotypisch gevoelig zijn voor oxacilline en/of cefoxitine volgens de CLSI/EUCAST criteria voor Stafylokokken<sup>40,41,42</sup>. Dergelijke stammen resulteren in een positieve moleculaire screening (genotypisch) zonder groei van verdachte kolonies op een selectieve chromogene bodem na aanrijking (conventionele cultuurmethode). Op al deze aspecten zal hieronder verder ingegaan worden. Hoewel de conventionele cultuurmethode, bestaande uit een niet selectieve aanrijking (TSB) gevolgd door inoculatie op een selectieve chromogene bodem, dikwijls als gouden standaard naar voor geschoven wordt voor een gevoelige opsporing van MRSA-dragerschap, is deze methode ook niet 100% sensitief in de detectie van MRSA-kolonisatie. De performantiekarakteristieken van dergelijke chromogene bodems variëren naargelang de fabrikant, incubatietijd, al of niet voorafgaandelijke aanrijking, ....<sup>49</sup>.

Daar waar de conventionele cultuurmethode enkel levensvatbare micro-organismen kan opsporen, kan een moleculaire assay ook afgestorven materiaal detecteren. Bijgevolg is een andere reden voor een positieve moleculaire screening in combinatie met een negatieve kweek, het gebruik van lokale of systemische antibiotica actief tegen MRSA, tijdens of in een periode voor afname van de screeningsstalen. Of het hier dan gaat om een vals-positieve moleculaire screening of een vals-negatieve kweek is echter moeilijk te evalueren, aangezien het (recente) gebruik van antibiotica actief tegen MRSA meestal een exclusiecriteria is in de meerderheid van de onderzochte studies. Daarom wordt aangeraden om in dergelijke gevallen best gebruik te maken van de conventionele cultuurmethode<sup>50</sup>.

## SCCmec types en varianten

Een SCCmec cassette is opgebouwd uit een unieke combinatie van een *mec* en een *ccr* gen complex <sup>2,3</sup>. Zo bestaan er 4 klassen van *mec* gen complexen en 7 klassen van *ccr* gen complexen (cassette chromosome recombinase). De regio's in de SCCmec cassette die zich naast deze gen complexen bevinden, worden aangeduid als de "J" regio's. Momenteel zijn er 11 verschillende SCCmec types beschreven (I-XI), waarbij er binnen eenzelfde type nog verschillende subtypes mogelijk zijn, zeker wat betreft SCCmec type II en IV. Deze subtypes of varianten bevatten dezelfde combinatie van een *mec* en een *ccr* gen complex, maar verschillen in de "J" regio's. Elk SCCmec type wordt gekenmerkt door een specifieke DNA-sequentie aan het rechter uiteinde van de SCCmec cassette (SRE), welke fungeert als aanhechtingsplaats voor de forward primers in een PCR-reactie (figuur 1) ter detectie van de SCCmec-*orfX* junctie. Daar waar de Xpert MRSA-assay MRSA-stammen met SCCmec types I, II, III, IVa, V en VI kan detecteren, bevat de Xpert MRSA Gen 3 assay extra primers ter detectie van een breder gamma aan SCCmec-*orfX* junctie sequenties (SCCmec type I-XI) <sup>15</sup>. Uit een studie van Huletsky et al. (2004) <sup>35</sup> blijkt echter dat er meer polymorfisme beschreven is in het rechter uiteinde van SCCmec dan aanvankelijk gedacht en het al of niet kunnen opsporen van bepaalde SCCmec types en hun varianten is afhankelijk van het feit of de gebruikte primers in de verschillende GeneXpert MRSA-assays complementair zijn aan een SCCmec type specifieke DNA-sequentie in het rechter uiteinde van de SCCmec cassette.



Figuur 1: Schematische voorstelling van MRSA-stammen met SCCmec types i tot vii. Elk SCCmec types heeft een specifieke DNA-sequentie aan het rechter uiteinde (SRE) <sup>35</sup>.

In een prospectieve studie van Laurent et al. (2010) <sup>24</sup> werd de performantie van de Xpert MRSA-assay voor nasale MRSA-screening bij 246 geriatrische patiënten met minstens één risicofactor voor MRSA vergeleken met de conventionele cultuurmethode. In deze studie waren 25 patiënten nasaal gekoloniseerd met MRSA en de Xpert MRSA-assay was slechts positief bij 17 patiënten. Bij 7 van de 8 vals-negatieve resultaten kon de Xpert MRSA-assay herhaald worden rechtstreeks op een suspensie van de MRSA-stam. In 3 van de 7 gevallen was de Xpert MRSA-assay in dit geval wel positief. Echter de overige 4 stammen konden nog steeds niet gedetecteerd worden indien de assay werd uitgevoerd rechtstreeks op een suspensie van de MRSA-stam. In een gelijkaardige studie van Roisin et al. (2012) <sup>25</sup> waren 61 (3%) patiënten nasaal gekoloniseerd met MRSA en de Xpert MRSA-assay was slechts positief bij 37 patiënten. Bij herhaling van de vals-negatieve resultaten rechtstreeks op een suspensie van de MRSA-stam werden 21 stammen door de GeneXpert correct geïdentificeerd als zijnde MRSA.

Voor de 3 overige MRSA-stammen bleef de assay nog steeds negatief. In een studie van Rossney et al. (2008)<sup>19</sup> waren 18 van 19 cultuur positieve/PCR negatieve MRSA-stammen wel Xpert MRSA positief indien de assay herhaald werd rechtstreeks op een suspensie van de MRSA-stam.

Het wel kunnen detecteren van MRSA-stammen rechtstreeks op een suspensie van een MRSA-stam, na een initieel negatief resultaat rechtstreeks op een polymicrobieel staal, betekent dat de Xpert MRSA-assay wel degelijk in staat is om deze stammen correct te kunnen identificeren en dat het probleem in dit geval niet gelegen is in het feit dat een bepaald *SCCmec* type niet kan gedetecteerd worden. Een mogelijke verklaring hiervoor zou kunnen zijn dat MRSA in zeer lage hoeveelheid aanwezig is in het staal. Een studie van Rossney et al. (2008)<sup>19</sup> toont aan dat de LoD van moleculaire screening groter is dan deze van cultuur na aanrijking, maar kleiner dan deze van rechtstreekse cultuur. In deze studie bedroeg de LoD van de Xpert MRSA-assay 58 CFU/swab en deze was lager dan de LoD van de rechtstreekse cultuur (171 CFU/swab), maar echter wel beduidend hoger dan de LoD van cultuur na aanrijking (9 CFU/swab). In een externe kwaliteitscontrole van te Witt et al. (2010)<sup>27</sup> voor commerciële real-time PCR assays voor de detectie van MRSA rapporteerde slechts 49% en 13% van de deelnemers de aanwezigheid van MRSA bij een concentratie van respectievelijk 2500 CFU/ml en 250 CFU/ml. Een andere mogelijke verklaring zou kunnen zijn dat in tegenstelling tot extractie van het genetisch materiaal uit polymicrobiële wisser, het bacterieel DNA efficiënter kan geëxtraheerd worden uitgaande van een suspensie van een MRSA kolonie<sup>28</sup>.

De 3 isolaten uit de studie van Laurent et al. (2010)<sup>24</sup> en de 4 isolaten uit de studie van Roisin et al. (2012)<sup>25</sup> die nog steeds niet konden gedetecteerd worden indien de Xpert MRSA-assay werd uitgevoerd rechtstreeks op een suspensie van een MRSA kolonie waren wel degelijk *mecA* positief en behoorden allemaal tot dezelfde MRSA kloon, nl. A20-ST8-*SCCmec* IV<sub>var</sub>. Deze 7 isolaten bevatten allemaal dezelfde variant van het *SCCmec* type IV, welke niet kon gedetecteerd worden door de Xpert MRSA-assay, aangezien geen enkele van de forward primers aanwezig in de assay complementair was met een DNA-sequentie in het rechtse uiteinde van de *SCCmec* cassette. In een evaluatie van de BD GeneOhm MRSA-assay door Bartels et al. (2009)<sup>34</sup> werd vastgesteld dat deze assay niet in staat was om een variant van het *SCCmec* type IVa te detecteren. Van de 349 geanalyseerde MRSA-isolaten gaven er 44 een negatief resultaat met de BD GeneOhm MRSA-assay, waarbij 42 isolaten dezelfde variant van het *SCCmec* type IVa bezaten. De meest voorkomende MRSA kloon in Kopenhagen, nl. *spa* t024-ST8-IVa, bevat bovendien het *SCCmec* type IVa. Na ontwikkeling van nieuwe primers kon deze specifieke variant van het *SCCmec* type IVa wel gedetecteerd worden, waardoor de sensitiviteit van de assay aanzienlijk verhoogd kon worden. Deze gegevens onderstrepen het belang van een nauwgezette opsporing, door moleculaire surveillance, van *SCCmec* varianten die niet gedetecteerd kunnen worden met de huidige moleculaire assays met als uiteindelijke bedoeling een verdere optimalisatie van de sensitiviteit van dergelijke assays. Enkel door middel van sequencing van de volledige *SCCmec* cassette kan achterhaald worden waarom bepaalde *SCCmec* varianten niet gedetecteerd kunnen worden door moleculaire assays. Op die manier kunnen er dan nieuwe primers ontwikkeld worden, wat resulteert in een verdere aanpassing van dergelijke assays aan de genetische evolutie van MRSA-stammen en uiteindelijk in een verhoging van de sensitiviteit. De prevalentie van *SCCmec* varianten in MRSA-stammen die niet gedetecteerd kunnen worden door moleculaire assays blijft echter onzeker, aangezien er in weinig studies verder onderzoek gebeurt naar de reden van discordantie in geval van positieve kweek met negatieve PCR. Gezien de hoge negatief predictieve waarde van de GeneXpert MRSA-assay, wordt een negatief resultaat vaak niet meer bevestigd d.m.v. een klassieke cultuur. Dit kan echter tot gevolg hebben dat bepaalde MRSA-stammen met een specifieke *SCCmec* variant, die niet kan opgespoord worden met

een moleculaire assay, verder kunnen blijven circuleren en op die manier een verdoken bron kunnen zijn voor nosocomiale transmissie. Daarom is het belangrijk om lokaal de performantie van een moleculaire assay te blijven evalueren. Dit kan bijvoorbeeld door jaarlijks gedurende één maand alle MRSA-screenings die geanalyseerd worden met een moleculaire MRSA-assay parallel te testen met de conventionele cultuurmethode <sup>9</sup>.

### **Staphylococcus aureus “drop-out” mutanten**

De klassieke Xpert MRSA-assay detecteert de *SCCmec-orfX* junctie en niet het *mecA* of *mecC* gen. Omdat het *mecA* en het *mecC* gen geïncorporeerd zijn in de *SCCmec* cassette, wordt de detectie van de *SCCmec-orfX* junctie beschouwd als een surrogaatmarker voor het opsporen van MRSA. Er zijn in de literatuur echter *Staphylococcus aureus* “drop-out” stammen beschreven die een vals-positief resultaat genereren indien zij geanalyseerd worden met een moleculaire assay die enkel de *SCCmec-orfX* junctie opspoort <sup>26</sup>. Dergelijke “drop-out” mutanten, ook wel “empty-cassette” varianten genoemd, zijn *Staphylococcus aureus* stammen die kleinere of grotere fragmenten van de *SCCmec* cassette bevatten zonder dat zij drager zijn van het *mecA* of *mecC* gen. Deze fragmenten kunnen dan fungeren als aanhechtingsplaats voor de amplificatie-primers in een PCR-reactie, wat resulteert in amplificatie van de *SCCmec-orfX* junctie in afwezigheid van het *mec* gen. Een externe kwaliteitscontrole van te Witt et al (2010) <sup>27</sup> voor commerciële real-time PCR assays voor het opsporen van MRSA bevatte twee “drop-out” *Staphylococcus aureus* stammen. 90% van de deelnemende labo’s identificeerde beide stammen ten onrechte als MRSA positief.

De Xpert SA Nasal Complete assay, die naast de *SCCmec-orfX* junctie ook het *mecA* gen detecteert en de Xpert MRSA Gen 3 assay, die bijkomend ook nog het *mecC* gen kan detecteren, hebben theoretisch het voordeel dat zij geen vals-positief resultaat genereren in aanwezigheid van “drop-out” mutanten. Dit geldt voornamelijk indien deze assays uitgevoerd worden rechtstreeks op een suspensie van de “drop-out” stam. In dit geval zal de *SCCmec-orfX* junctie positief zijn, maar het *mec* gen zal negatief zijn, wat resulteert in een negatieve MRSA-screening. Indien beide assays uitgevoerd worden vertrekkende van (polymicrobiële) screeningsstalen, wordt er wel een positief resultaat bekomen in geval van aanwezigheid van een “drop-out” stam in combinatie met een methicilline-resistente coagulase-negatieve stafylokok (MRCoNS) (= vals-positief resultaat). Het *mecA* gen is immers niet specifiek voor MRSA-stammen, maar komt ook voor bij MRCoNS. Uit een recente evaluatie van de Xpert MRSA Gen 3 assay door Jonckheere et al. (2015) <sup>22</sup> voor het opsporen van MRSA in gepoolde screeningsstalen (keel, neus, perineum; eSwab® medium) bij 115 risicopatiënten (16% MRSA positief), bleek dat het *mecA* of *mecC* gen positief was voor 91% (105/115) van de gepoolde screeningsstalen. Dit is vermoedelijk te wijten aan de hoge prevalentie van coagulase-negatieve stafylokokken die drager zijn van het *mec* gen (MRCoNS). In deze studie bleek de meerwaarde van een assay met het *mecA/C* gen als bijkomend target, in het opsporen van MRSA uitgaande van screeningsstalen, vrij beperkt ten opzichte van een assay met enkel de *SCCmec-orfX* junctie als target.

De prevalentie van dergelijke “drop-out” mutanten is echter moeilijk in te schatten, maar er zouden geografische verschillen zijn. In een recente studie van Mendes et al. (2016) <sup>23</sup> werd de prevalentie van “drop-out” stammen onderzocht bij de evaluatie van de performantie van de BD Max StaphSR assay. Hierbij dient wel vermeld te worden dat de evaluatie uitgevoerd werd vertrekkende van een suspensie van de te onderzoeken *Staphylococcus aureus* isolaten en niet rechtstreeks op screeningsstalen. Van de 900 geteste MSSA-isolaten met een brede geografische distributie waren 64

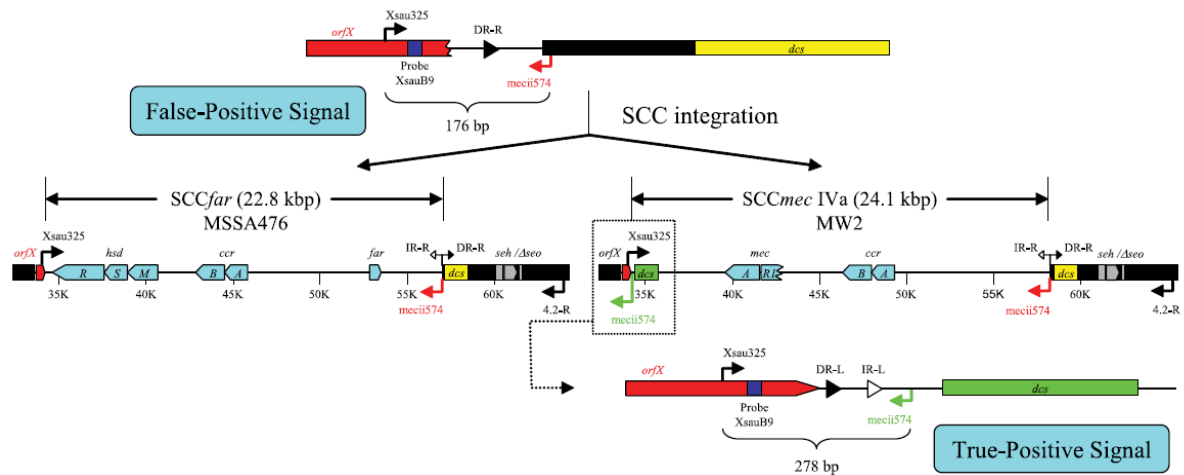


(7.1%) *Staphylococcus aureus* stammen compatibel met een “drop-out” genotype. Deze stammen waren dus enerzijds *mecA/C* negatief en anderzijds *SCCmec-orfX* junctie positief. Bovendien was er een duidelijke geografische variatie in de prevalentie van “drop-out” stammen. In sommige regio’s van de V.S. bedroeg deze slechts 2% , daar waar deze in andere regio’s opliep tot 13%. In een recente Belgisch-Duitse multicenter studie van Becker et al. (2016) <sup>21</sup> ter evaluatie van de performantie van de Xpert MRSA Gen 3 assay bleken 27 van de 98 geteste MSSA-isolaten compatibel met een “drop-out” genotype.

In een prospectieve studie van Roisin et al. (2012) <sup>25</sup> werd de performantie van de Xpert MRSA-assay in een groep van 1891 patiënten met risicofactoren voor MRSA vergeleken met de conventionele cultuurmethode voor nasale MRSA-screening. Van de 98 positieve Xpert MRSA resultaten waren er 61 vals-positief. In slechts 3 gevallen was de patiënt gekoloniseerd met MRSA t.h.v. een andere anatomische locatie en werd het resultaat als terecht positief beschouwd ondanks negatieve nasale MRSA kweek m.b.v. de conventionele cultuurmethode. In de grote meerderheid van de gevallen (67%) kon echter geen verklaring gevonden worden voor de discordantie tussen kweek en PCR. Voor ongeveer 25% van de vals-positieve Xpert MRSA resultaten kon er wel een eenduidige verklaring gevonden worden. Bij 27 van de 61 vals-positieve resultaten kon de aanwezigheid van een MSSA-stam aangetoond worden (*mecA* negatief). De Xpert MRSA-assay was positief voor 15 van deze MSSA-stammen bij rechtstreekse analyse van een koloniesuspensie. In drie gevallen was dit te wijten aan de aanwezigheid van een “drop-out” mutant. Voor acht andere MSSA-stammen (CC1) was dit positieve signaal te wijten aan de aanwezigheid van een DNA-sequentie in het genoom van deze MSSA-stammen, die analoog was aan een DNA-sequentie in het rechter uiteinde van de *SCCmec* cassette (SRE) welke fungeert als aanhechtingsplaats voor de forward primers ter detectie van de *SCCmec-orfX* junctie in een moleculaire MRSA-assay. Dit is in overeenstemming met de bevindingen van Wong et al. (2010) <sup>32</sup> die een MSSA-kloon (CC1) beschrijven met een DNA-sequentie in de nabijheid van het 3’ uiteinde van *orfX* welke identiek is aan een DNA-sequentie in het rechter uiteinde van de *SCCmec* cassette (SRE) van een MRSA-kloon. Deze sequentie is complementair met één van de amplificatie-primers (*mecii574*) gebruikt in de Xpert MRSA-assay ter detectie van de *SCCmec-orfX* junctie. In afwezigheid van een *SCCmec* cassette in deze MSSA-kloon (CC1) kan er zo een 176 basenpaar groot amplicon gegenereerd worden, wat resulteert in een specifiek vals-positief signaal (zie figuur 2). In België bedraagt de prevalentie van multilocus sequence type Clonal Complex 1 (MLST CC1) MSSA-stammen bij gehospitaliseerde patiënten ongeveer 3% <sup>25</sup>.

Een lage prevalentie van MRSA in combinatie met een relatief hoge prevalentie van MSSA-stammen die kunnen leiden tot aspecifieke amplificatie (“drop-out” mutanten; MSSA CC1 stammen) resulteren in een verdere verlaging van de positief predictieve waarde van de moleculaire MRSA-assays, wat zal resulteren in een toename van het aantal onnodige isolaties met een nodeloze kost als gevolg. Een positieve moleculaire MRSA-screening dient daarom best steeds bevestigd te worden d.m.v. cultuur.

PCR positieve, cultuur negatieve MRSA resultaten zijn dus eerder toe te schrijven aan een lagere specificiteit van de moleculaire assays (aspecifieke amplificatie) dan aan een hypothetisch lagere gevoeligheid van conventionele cultuur. Dit is in overeenstemming met een studie van Herdmann et al. (2009) <sup>33</sup> waarin men het risico op een toekomstige terecht positieve MRSA-screening en het risico op een infectie met MRSA is gaan vergelijken tussen patiënten met een PCR positieve, cultuur positieve MRSA-screening en patiënten met een PCR positieve, cultuur negatieve MRSA-screening. Als hypothese stelde men dat, indien patiënten met een PCR positieve, cultuur negatieve MRSA-



**Figuur 2:** De target sequentie van de SCCmec specifieke primer *mecii574* is gelokaliseerd in de *dcs* regio van SCCmec IVa in MW2 (groene pijl) en in aanwezigheid van een SCCmec cassette resulteert de PCR-reactie in een 278 basenpaar groot amplicon (onderaan; True-Positive Signal). In afwezigheid van een SCCmec cassette bevindt de analoge DNA-sequentie (ook complementair met *mecii574*) (rode pijl) in het genoom van deze MSSA-stammen (MSSA476 en MW2) zich echter in de nabijheid van de aanhechtingplaats voor de *orfX* primer waardoor er op die manier een 176 basenpaar groot amplicon kan gegenereerd worden (bovenaan; False-Positive Signal). (*Xsau325 orfX* specifieke primer)<sup>32</sup>.

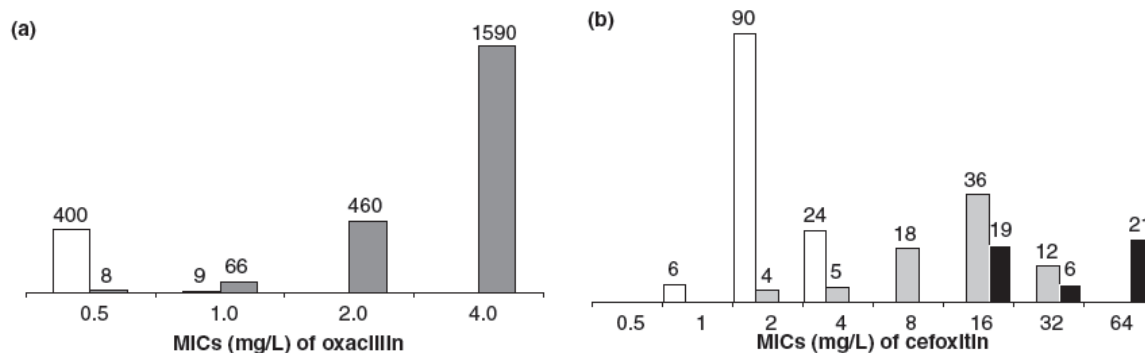
screening daadwerkelijk MRSA-drager zijn, deze patiënten dan een vergelijkbaar risico moeten hebben op een MRSA infectie of terecht positieve MRSA-screening binnen de drie maanden, in vergelijking met patiënten met een PCR positieve, cultuur positieve MRSA-screening. Het risico op een toekomstige terecht positieve MRSA-screening of MRSA infectie in de volgende drie maanden was significant verschillend tussen beide groepen, waarbij de groep met een PCR positieve, cultuur negatieve MRSA-screening een risico heeft op een toekomstige terecht positieve MRSA-screening of MRSA infectie in de volgende drie maanden dat vergelijkbaar is met patiënten met een PCR negatieve, cultuur negatieve MRSA-screening.

### “Cryptic MRSA”

Verder zijn er ook MRSA-stammen beschreven die het *mecA* of *mecC* gen bezitten (definitie MRSA), maar die fenotypisch gevoelig zijn voor oxacilline en/of cefoxitine volgens de CLSI/EUCAST criteria voor Stafylokokken, de zogenaamde “cryptic MRSA”. Dergelijke stammen geven aanleiding tot een positieve moleculaire screening (genotypisch), meestal zonder groei van verdachte kolonies op selectieve chromogene bodem na aanrijking (conventionele cultuurmethode). MRSA wordt echter gedefinieerd als de aanwezigheid van het *mecA* of *mecC* gen in *Staphylococcus aureus* ongeacht de MIC-waarde voor oxacilline of cefoxitine. Fenotypische resistentie tegen deze twee antibiotica wordt gedefinieerd als een MIC-waarde van respectievelijk  $\geq 4$  mg/L en  $\geq 8$  mg/L. Het *mecA/C* gen komt echter meestal heterogeen tot expressie hetgeen kan resulteren in zeer hoge MIC-waarden voor oxacilline of cefoxitine, maar ook in MIC-waarden die rondom en zelfs onder het breekpunt voor gevoeligheid liggen. Bovendien is er een toename gerapporteerd in het aantal *Staphylococcus aureus* isolaten die fenotypisch gevoelig zijn voor oxacilline, maar daarentegen wel *mecA* positief zijn (low-level oxacilline resistentie). Low-level oxacilline resistentie enerzijds en heterogene expressie van methicilline-resistentie anderzijds, maken dat de detectie van methicilline-resistentie met behulp van de standaard gevoeligheidsbepalingen niet altijd eenvoudig is.

Figuur 3(a) geeft de distributie in MIC-waarden weer voor oxacilline in 2533 *Staphylococcus aureus* isolaten opgestuurd naar Duits Nationaal referentiecentrum voor Stafylokokken<sup>42</sup>. Ongeveer 25% van de MRSA-isolaten in deze populatie is volgens de huidige CLSI-criteria gevoelig voor oxacilline ( $\leq$

2 mg/L). De cefoxitine MIC-waarde voor 74 low-level oxacilline resistente (MIC ≤ 1mg/L) *mecA*-positieve *Staphylococcus aureus* isolaten is weergegeven in figuur 3(b). Slechts 9 van deze 74 isolaten hebben een cefoxitine MIC-waarde die kleiner dan of gelijk is aan het gevoeligheidsbreekpunt van 4 mg/L. Cefoxitine resulteert dus duidelijk in een sterkere inductie van de *mecA* genexpressie in vergelijking met oxacilline, zeker in oxacilline gevoelige *mecA* positieve *Staphylococcus aureus* isolaten.



**Figuur 3:** (a) Oxacilline MIC-distributie voor 2533 *Staphylococcus aureus* isolaten opgestuurd naar Duits Nationaal referentiecentrum voor Stafylokokken. (witte balkjes: MSSA (*mecA* negatief)) (grijze balkjes: MRSA (*mecA* positief)). (b) Cefoxitine MIC-distributie voor MSSA-isolaten (*mecA* negatief; witte balkjes), low-level oxacilline resistente (MIC ≤ 1 mg/L) *mecA*-positieve *Staphylococcus aureus* isolaten (grijze balkjes) en MRSA-isolaten (*mecA* positief; zwarte balkjes) <sup>42</sup>.

De detectie van het *mecA/C* gen of zijn uiteindelijk product, nl. PBP2a, wordt beschouwd als de gouden standaard voor het opsporen van methicilline-resistentie. Genotypische methoden voor opsporen van *mecA/C* zijn snel, gevoelig en specifiek, maar deze zijn echter kostelijk en kunnen enkel uitgevoerd worden in een moleculair labo. In een studie van Nonhoff et al. (2012) <sup>41</sup> werd de performantie van een immunochromatografische test, nl. Clearview<sup>®</sup> Exact PBP2a, geëvalueerd voor het opsporen van methicilline-resistentie in een populatie van low-level MRSA-isolaten (LL-MRSA) en vergeleken met de resultaten bekomen m.b.v. andere fenotypische methoden. De resultaten zijn weergegeven in figuur 4. In deze studie wordt low-level resistentie voor methicilline gedefinieerd als *mecA* positieve *Staphylococcus aureus* isolaten met een MIC-waarde voor oxacilline gelegen tussen 0.06 en 16 mg/L.

Assay	No. of isolates tested (n = 58)	True positive <sup>a</sup>		False negative <sup>b</sup>	
		No.	%	No.	%
Oxacillin agar dilution	58	28	48.3	30	51.7
Cefoxitin disk diffusion (30 µg)	58	49	84.5	9	15.5
<b>Vitek 2</b>					
Oxacillin MIC	56	29	51.8	27	48.2
FOX screen	56	36	64.3	20	35.7
AES	56	39	69.6	17	30.4
Slidex MRSA LAT	58	56	96.6	2	3.4
Clearview Exact PBP2a ICA	58	56	96.6	2	3.4

<sup>a</sup> True positive, MRSA accurately classified as MRSA.

<sup>b</sup> False negative, MRSA misclassified as MSSA.

**Figuur 4:** Performantie van verschillende methodes voor het opsporen van LL-MRSA-isolaten <sup>41</sup>.

De gevoeligheid van de agar dilutie-methode voor het opsporen van LL-MRSA in deze studie was zeer laag en bedroeg slechts 48.3 % (figuur 4), waarbij 30 LL-MRSA-isolaten verkeerdelijk geclassificeerd werden als MSSA volgens de huidige CLSI guidelines (MIC oxacilline ≤ 2mg/L). Ook voor het Vitek 2<sup>®</sup> systeem (bioMérieux) was de gevoeligheid van de oxacilline MIC-waarde voor detectie van LL-MRSA

zeer laag (51.8%). Slechts 29 LL-MRSA-isolaten werden correct als MRSA gerapporteerd. De cefoxitin (FOX) screen, die geïntegreerd zit in de Vitek AST (antibiotic susceptibility testing) card, zorgde voor een verhoging van de gevoeligheid (64.3 %) voor het opsporen van LL-MRSA-isolaten. Cefoxitine is dus duidelijk een sterkere inductor van de *mecA* genexpressie in vergelijking met oxacilline, zeker voor wat betreft fenotypische oxacilline gevoelige *mecA* positieve *Staphylococcus aureus* isolaten en in geval van heterogene expressie van methicilline-resistentie. Ondanks de combinatie van de oxacilline MIC-waarde en de FOX screen in het Vitek 2 Advanced Expert System (AES) bleef de performantie van het Vitek 2 systeem in de detectie van LL-MRSA laag (69.6%). Een hogere sensitiviteit (84.5%) werd bekomen d.m.v. disk diffusie met een cefoxitine schijfje van 30 µg. Slechts 9 van 58 LL-MRSA-isolaten, allen met een oxacilline MIC  $\leq$  0.5 mg/L, werden verkeerdelijk geclassificeerd als MSSA. De beste gevoeligheid (96.6%) werd echter bekomen met de immunochromatografische testen, waarbij 56 van 58 LL-MRSA-isolaten correct werden geclassificeerd als MRSA. De specificiteit van alle methoden in deze studie, geëvalueerd in een panel van 50 MSSA-isolaten (*mecA* negatief), bedroeg 100%. Deze immunochromatografische testen voor de detectie van PBP2a zijn een nuttige, snelle en efficiënte aanvulling op de fenotypische gevoeligheidsbepaling d.m.v. cefoxitine disk diffusie voor accurate identificatie van methicilline-resistentie in *Staphylococcus aureus*. Bovendien zijn deze immunochromatografische assays een betrouwbaar alternatief voor de detectie van *mecA* d.m.v. PCR.

### *mecC* MRSA

Een andere reden voor discordanties tussen conventionele cultuur en moleculaire assays voor het opsporen van MRSA, is het feit dat er naast *mecA* MRSA-stammen ook *mecC* MRSA-stammen beschreven zijn. De DNA-sequentie van het *mecA* gen is slechts voor 70% homogeen aan de DNA-sequentie van het *mecC* gen<sup>44</sup>. Sommige moleculaire assays kunnen zowel *mecA* als *mecC* MRSA-stammen detecteren, terwijl andere enkel *mecA* MRSA-stammen kunnen opsporen<sup>15</sup>. Dit is echter afhankelijk van het panel primers dat gebruikt wordt in de verschillende moleculaire assays voor het opsporen van MRSA. Zo kunnen *mecC* MRSA-stammen bijvoorbeeld niet opgespoord worden met de klassieke Xpert MRSA-assay, aangezien deze assay geen primers bevat voor zowel de detectie van het *mecC* gen als voor detectie van het SCC*mec* type XI, wat geassocieerd is met de aanwezigheid van het *mecC* gen in MRSA-isolaten. *mecC* MRSA-stammen kunnen echter wel opgespoord worden met de Xpert MRSA Gen 3 assay aangezien deze zowel primers bevat die complementair zijn met het *mecC* gen als primers die specifiek zijn voor een DNA-sequentie in het rechter uiteinde van SCC*mec* type XI. De meeste *mecC* MRSA-isolaten zijn fenotypisch resistent tegen oxacilline en cefoxitine, alhoewel er ook *mecC* MRSA-stammen beschreven zijn met laaggradige resistentie die fenotypisch nog gevoelig zijn aan deze antibiotica en dan vnl. aan oxacilline<sup>44</sup>. Ook commercieel beschikbare chromogene bodems voor opsporen van MRSA zijn, afhankelijk van de samenstelling, niet altijd betrouwbaar voor de detectie van *mecC* MRSA-stammen<sup>46</sup>. Bovendien kunnen *mecC* *Staphylococcus aureus* stammen ook niet gedetecteerd worden met een *in house* PCR-assay voor het opsporen van *mecA*. De aminozuursamenstelling van het PBP2a eiwit dat gecodeerd wordt door het *mecC* gen is slechts voor 62% identiek aan deze van het PBP2a eiwit dat gecodeerd wordt door het *mecA* gen<sup>44</sup>. Dit maakt dat *mecC* MRSA-isolaten dikwijls niet kunnen opgespoord worden m.b.v. van de klassieke immunochromatografische assays voor het opsporen van PBP2a, die meestal enkel het *mecA* PBP2a kunnen opsporen. In een studie van Deplano et al. (2014)<sup>43</sup> waren 9 *mecC* MRSA-isolaten PBP2a negatief (Clearview® Exact PBP2a; Alere Belgium). Na cefoxitine inductie kon het PBP2a eiwit voor

deze 9 stammen echter wel aangetoond worden. De detectie van *mecC* MRSA-isolaten is dus niet altijd betrouwbaar met de huidige generatie van testen. MRSA-stammen die fenotypisch resistent zijn voor oxacilline en/of cefoxitine en die *mecA* en/of PBP2a negatief zijn, zijn verdacht voor aanwezigheid van het *mecC* gen en dit dient dan ook verder onderzocht te worden.

Het *mecC* gen is, naast het *mecA* gen, voornamelijk aanwezig in MRSA-isolaten die circuleren in de veestapel of die aangetroffen worden bij huisdieren of wilde dieren. Bijgevolg hebben personen die frequent in contact komen met dieren een hoger risico op kolonisatie met *mecC* MRSA<sup>3,4</sup>. De prevalentie van *mecC* in humane MRSA-isolaten varieert van 0.08% tot 5.9%. Van de 4869 *Staphylococcus aureus* isolaten, inclusief 3749 MRSA-stammen, die verzameld werden door het Belgisch nationaal referentiecentrum voor *Staphylococcus aureus*, in de periode 2003-2012, bleken er slechts 9 MRSA-stammen (0.27%) drager te zijn van het *mecC* gen<sup>43</sup>.

**Conclusie:** *De hierboven besproken diverse mogelijke oorzaken voor discordanties tussen de moleculaire MRSA-assays en de conventionele screening d.m.v. cultuur onderstrepen het belang van een meer nauwgezette (lokale) evaluatie van dergelijke moleculaire assays, zeker gezien de hoge kostprijs van dergelijke assays en hun niet onomstotelijk bewezen effect op de verdere reductie van nosocomiale MRSA-transmissie.*

### **Evaluatie discordanties MRSA screening cultuur en GeneXpert in ZOL Genk.**

In het ziekenhuis Oost-Limburg wordt voor moleculaire MRSA-screening gebruik gemaakt van de Xpert SA Nasal Complete assay, die naast de *SCCmec-orfX* junctie ook het *mecA* gen en het *spa* gen, een *Staphylococcus aureus* specifiek gen, detecteert. Deze assay wordt echter slechts uitgevoerd in volgende indicaties: (1) (her)opname van gekende MRSA-drager, (2) patiënten afkomstig uit rust- en verzorgingstehuis, (3) kamergenoten van MRSA patiënten, (4) pre-operatieve screening in geval van (semi)-urgente cardiale chirurgie. De schematische workflow voor het inzetten van een MRSA-screening (Xpert en conventionele kweek) is terug te vinden in bijlage 2. De afgenomen eSwab<sup>®</sup>-wissers (neus, keel, perineum) worden gepoold, waarbij er in principe uit elke wisser 400 µl eSwab<sup>®</sup>-medium gebuikt wordt. Vervolgens wordt 150 µl van het gepoolde staal overgebracht in het elutiëreagens en dit mengsel wordt na vortexen overgebracht in de cartridge, waarna de test kan uitgevoerd worden. De Xpert SA Nasal Complete assay geeft vervolgens een positief, negatief of 'invalid' resultaat gebaseerd op een Cycle Threshold (Ct-waarde) van 36 voor elk van de drie targets. Het resultaat van de MRSA-screening is positief indien alle targets een Ct-waarde hebben < 36. Een positief GeneXpert resultaat wordt geantwoord als "verdacht voor MRSA, bevestiging volgt" en dient steeds geconfirmeerd te worden door middel van cultuur na niet selectieve aanrijking. Hiertoe wordt 500 µl van het gepoolde staal in 5 ml Tryptic Soy Broth (TSB) gebracht. Deze aanrijking wordt vervolgens overnacht geïncubeerd bij ± 35°C. Daarna wordt 10 µl hiervan overgeënt op een selectieve chromogene bodem (CHROMagar<sup>®</sup> MRSA II; BD). Vervolgens worden de chromogene media minstens 24 uur geïncubeerd bij ± 35°C. De platen worden slechts éénmaal afgelezen. Het resultaat van de moleculaire MRSA-screening wordt als negatief gerapporteerd indien de Ct-waarde van minstens 1 van de drie targets gelijk is aan 0 of > 36 en dit ongeacht de Ct-waarde voor amplificatie van het *mecA* of het *spa* gen<sup>15</sup>. Aangezien het *mecA* gen geen MRSA specifieke parameter is, kan dit bijgevolg ook positief zijn in afwezigheid van MRSA, door bijvoorbeeld aanwezigheid van MRCoNS. Het *spa* gen is daarentegen wel specifiek voor het opsporen van *Staphylococcus aureus*, maar niet voor de detectie van methicilline resistentie. Zo zal het *spa* gen dus ook gedetecteerd worden in aanwezigheid van een MSA-stam. Gebaseerd op een BILULU multicenter studie<sup>10</sup>, werd er in het laboratorium echter ook een 'grijze zone' ingevoerd bij de interpretatie van de GeneXpert resultaten. Indien laattijdige amplificatie optreedt (Ct-waarde *SCCmec-orfX* junctie amplificatie > 36), wordt het negatieve GeneXpert resultaat doorgegeven als "resultaat niet interpreteerbaar" en moet het resultaat van de conventionele cultuur na niet selectieve aanrijking afgewacht worden. Op basis van deze studie is het resultaat van de GeneXpert enkel negatief te beschouwen indien de Ct-waarde van de *SCCmec-orfX* junctie amplificatie gelijk is aan 0.

Daar waar een positieve GeneXpert MRSA-screening in het laboratorium nog steeds geconfirmeerd wordt door middel van cultuur, wordt een negatief resultaat definitief gerapporteerd zonder bevestiging door middel van cultuur. Gedurende 1 maand per jaar worden echter alle moleculaire MRSA-screenings, dus ook de negatieve, vergeleken met de conventionele cultuur. Dit enerzijds om de betrouwbaarheid van de huidige MRSA GeneXpert procedure te evalueren (performantiekarakteristieken) en anderzijds om na te gaan of er MRSA-stammen circuleren die niet gedetecteerd kunnen worden met de gebruikte moleculaire assay. In tabel 2 zijn de resultaten van de voorbije 4 controlemaanden weergegeven (2012-2015). De Xpert SA Nasal Complete assay heeft een hoge negatief predictieve waarde (98.2%) waardoor deze gebruikt kan worden ter uitsluiting van

MRSA-kolonisatie in een risicopopulatie. Een negatief resultaat dient bijgevolg niet geconfirmeerd te worden door middel van cultuur. Drie cultuur MRSA positieve/GeneXpert negatieve stalen (12.5% van het aantal kweek positieve MRSA stalen) hadden een Ct-waarde voor de *SCCmec-orfX* junctie amplificatie die groter was dan 36. Door invoering van een 'grijze zone' (Ct *SCCmec-orfX* junctie > 36) voor negatieve GeneXpert resultaten kan de sensitiviteit van de Xpert SA Nasal Complete assay voor het opsporen van MRSA dus met meer dan 10% verhoogd worden. Zonder invoering van een derde interpretatieve categorie ('grijze zone') zouden deze drie stalen verkeerdelijk als MRSA negatief gerapporteerd worden en bijgevolg zouden deze patiënten kunnen fungeren als reservoir voor verdere transmissie, aangezien deze resultaten, volgens de huidige MRSA procedure, niet zouden geconfirmeerd worden door middel van cultuur. Daarenboven resulteerde de Xpert SA Nasal Complete assay echter wel in 5 vals-negatieve resultaten (GeneXpert negatief, kweek positief). De Xpert SA Nasal Complete assay was voor deze 5 vals-negatieve stalen echter wel positief indien de assay herhaald werd op de aanrijking (TSB) of op een suspensie van de MRSA-stam in moleculair water. Dit betekent dat de moleculaire assay wel degelijk in staat is om deze stammen correct te kunnen identificeren en dat het probleem in dit geval niet gelegen is in het feit dat deze MRSA-stammen een *SCCmec* type of variant bezitten dat niet kan opgespoord worden met de gebruikte moleculaire assay. Mogelijke verklaringen voor deze initieel vals-negatieve resultaten zouden kunnen zijn dat MRSA ofwel in zeer lage hoeveelheid aanwezig is in het staal ofwel dat er een probleem was met de extractie van het genetisch materiaal vanuit het originele staal.

ZOL Genk		kweek		prevalentie MRSA	Sens	Spec	PPV (incl TW)	PPV (POS)	PPV TW	NPV	%TW POS / POS
		POS	NEG								
<i>Xpert SA Nasal Complete</i> met 'grijze zone' (TW)	POS	16,0	4,0	7,9	79,2	98,2	79,2	80,0	75,0	98,2	12,5
	TW	3,0	1,0								
	NEG	5,0	274,0								
<i>Xpert SA Nasal Complete</i> zonder 'grijze zone'	POS	16,0	4,0	7,9	66,7	98,6	/	80,0	/	97,2	/
	NEG	8,0	275,0								

**Tabel 2: preformantiekarakteristieken Xpert® SA Nasal Complete assay. (TW: 'grijze zone')**

Deze 'grijze zone' resulteert echter wel in toename met 20% van het aantal GeneXpert stalen waarbij nog een kweek moest ingezet worden ter confirmatie. Bovendien resulteert de stijging in de sensitiviteit van de assay door invoering van een 'grijze zone' niet in een significante reductie in de positief predictieve waarde van de Xpert SA Nasal Complete assay, wat zou kunnen resulteren in een toename van het aantal onnodige isolaties met een hoge overbodige kostprijs tot gevolg. De positief predictieve waarde met en zonder invoering van een 'grijze zone' bedraagt respectievelijk 79.2% en 80%. Van de 4 negatieve GeneXpert stalen met een Ct-waarde voor de *SCCmec-orfX* junctie amplificatie > 36, zijn er 3 wel degelijk MRSA positief (PPV 75%). Voor 4 stalen werd er een vals-positief resultaat bekomen met de Xpert SA Nasal Complete assay. In drie van de vier vals-positieve resultaten kon de aanwezigheid van een *Staphylococcus aureus* "drop-out" stam aangetoond worden (*mecA* negatief, *spa* positief en *SCCmec-orfX* junctie positief). In combinatie met de aanwezigheid van MRCoNS (*mecA* positief) resulteert dit in een vals positief resultaat. Voor het andere vals-positieve staal kon geen verklaring gevonden worden.

Verder worden in het laboratorium alle GeneXpert positieve/cultuur negatieve MRSA-screenings verder onderzocht volgens een bestaande procedure (bijlage 3). Sedert in gebruik name van de Xpert SA Nasal Complete assay (2012) zijn er in totaal 22 GeneXpert positieve/cultuur negatieve MRSA-screenings geregistreerd. In 12 gevallen ging het vermoedelijk om een *Staphylococcus aureus* "drop-out" mutant (*mecA* negatief, *spa* positief en *SCCmec-orfX* junctie positief) in combinatie met

aanwezigheid van MRCoNS (*mecA* positief). Twee andere discordanties tussen GeneXpert en kweek waren toe te schrijven aan de aanwezigheid van LL-MRSA-stammen. Deze stammen waren *mecA* positief, maar echter fenotypisch gevoelig voor cefoxitine, waardoor er geen groei van deze stammen waarneembaar was op de gebruikte chromogene MRSA-bodems. Voor de 8 overige discordanties kon geen duidelijke verklaring gevonden worden. Hierbij dient opgemerkt te worden dat 4 van deze patiënten met een onverklaarbare discordantie reeds MRSA positief waren in het verleden en dat 1 andere patiënt één maand later voor de eerste maal MRSA positief was. Deze 5 discordanties zijn bijgevolg vermoedelijk niet te beschouwen als echte vals-positieve resultaten. Een mogelijke verklaring hiervoor zou kunnen zijn dat deze patiënten behandeld werden met lokale of systemische antibiotica actief tegen MRSA tijdens of in de week voor afname van de screeningsstalen. Bij de 3 overige patiënten kon geen voorgeschiedenis van MRSA-kolonisatie aangetoond worden.



## To do/ACTIONS

---

1. Verdere evaluatie van de performantie van de GeneXpert SA Nasal complete assay.
2. Verdere uitwerking van de procedure voor analyseren van discordanties GeneXpert vs. Cultuur (bijlage 4).
3. Opstellen van een kosteneffectiviteitsanalyse-model voor verschillende MRSA-screening algoritmes.

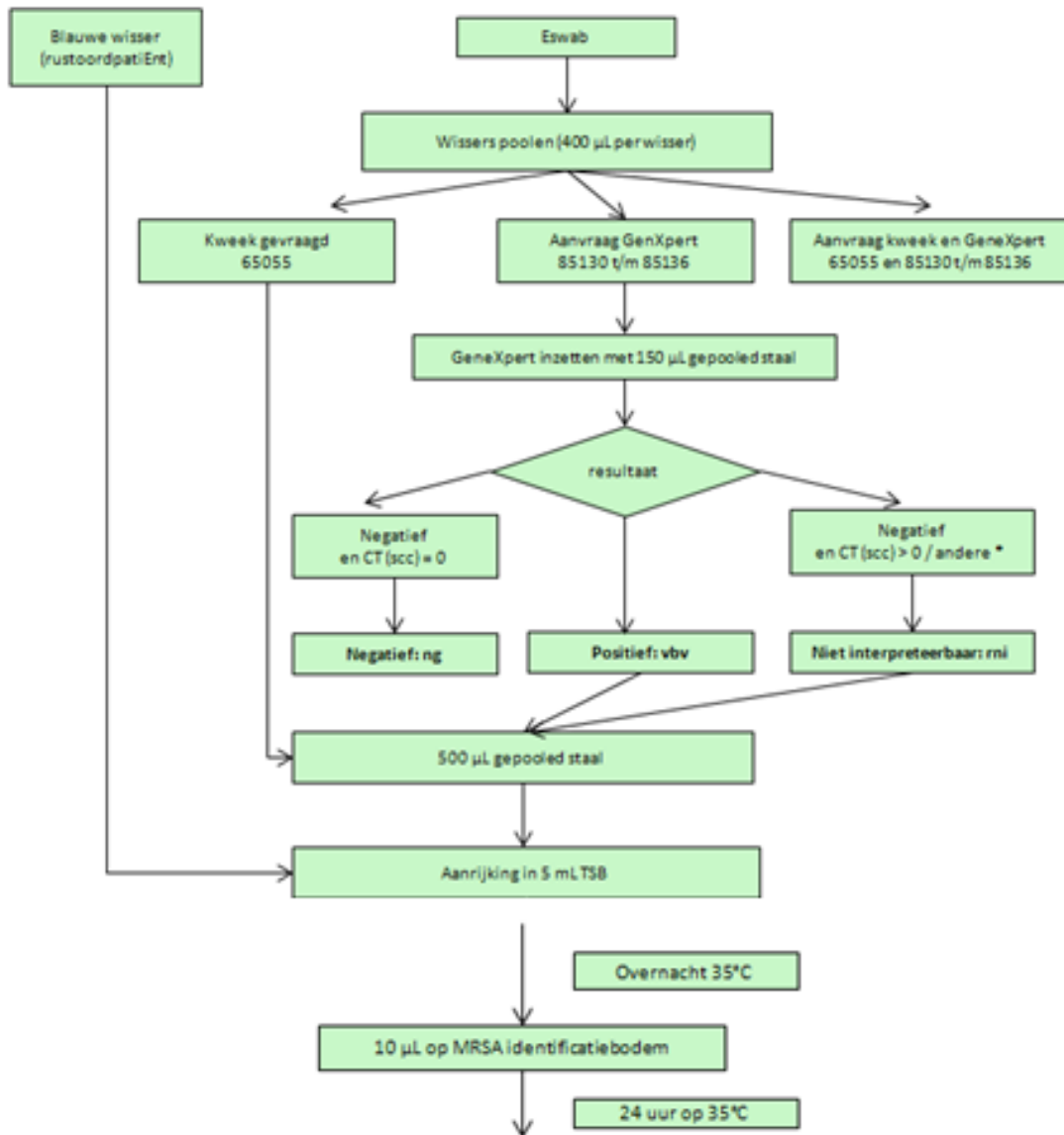
## ATTACHMENTS

---

### Bijlage 1

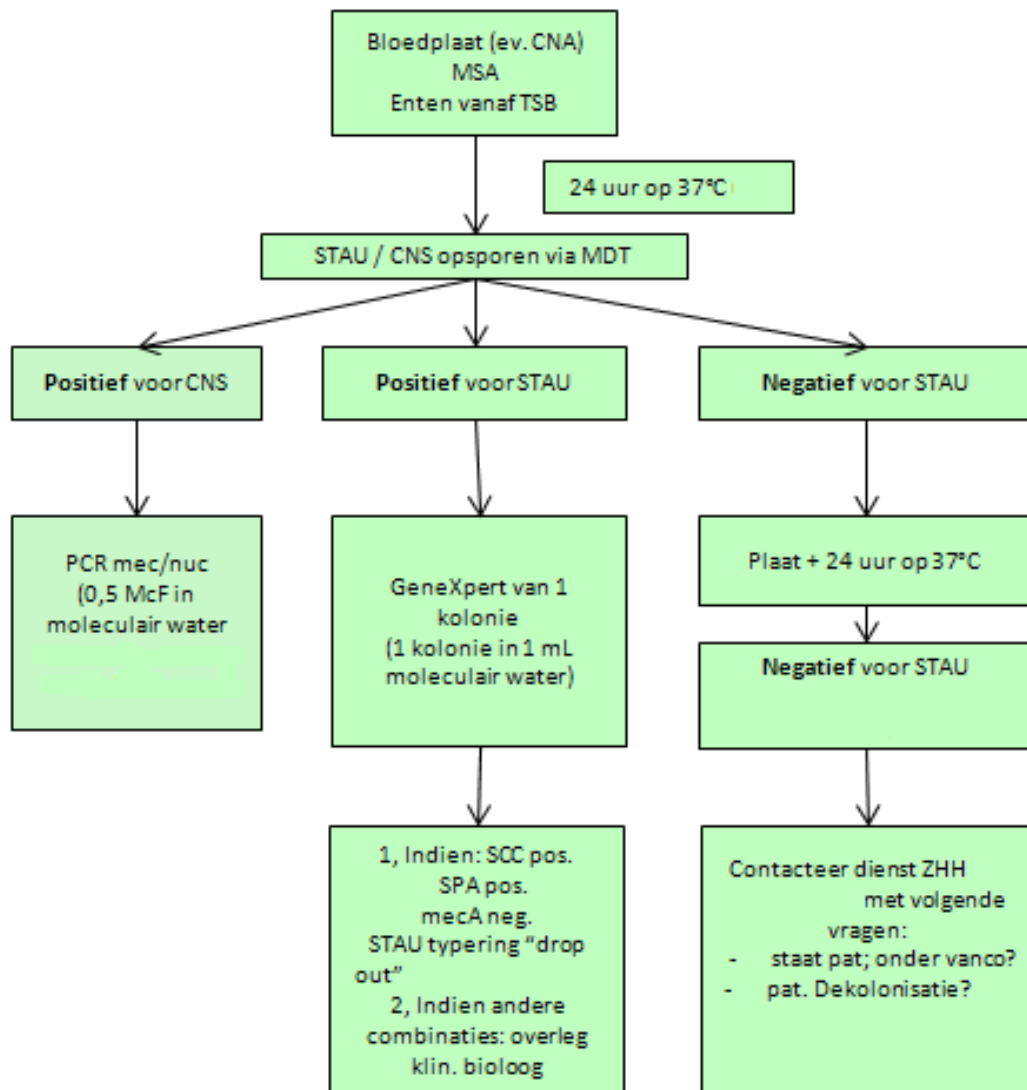
<b>GeneXpert® MRSA-assays</b>				
<u>Voordelen</u>	Aanzienlijk kortere TAT i.v.m. conventionele cultuur			
	Eenvoudige procedure, geen moleculair labo vereist			
	Hoge negatief predictieve waarde, waardoor gericht isolatiebeleid met beperking van het aantal onnodige preventieve isolatiedagen. (opm.: hogere detectielimiet (LoD) i.v.m. conventionele cultuur na aanrijking			
	Betere detectie van "cryptic" MRSA-stammen i.v.m. conventionele cultuur			
<u>Nadelen</u>	Kostprijs			
	Lagere positief predictieve waarde			
	Niet bewezen kosteneffectief			
	Beperkt additioneel effect op verdere reductie van nosocomiale MRSA transmissie i.v.m. conventionele cultuur			
	Hogere detectielimiet (LoD) i.v.m. conventionele cultuur na aanrijking			
<b>Xpert® MRSA</b>		<b>Xpert® SA Nasal Complete</b>		<b>Xpert® MRSA Gen 3</b>
<u>Nadelen</u>	<u>Voordelen</u>	<u>Nadelen</u>	<u>Voordelen</u>	<u>Nadelen</u>
Geen detectie van <i>mecC</i> MRSA	Detectie van zowel MRSA als MSSA	Geen detectie van <i>mecC</i> MRSA	Detectie van <i>mecC</i> MRSA	Lagere positief predictieve waarde t.o.v. Xpert MRSA
Enkel detectie van SCC <i>mec</i> types I-VI	Theoretisch minder kans op vals positief resultaat bij <i>Staphylococcus aureus</i> "drop-out" mutanten	Enkel detectie van SCC <i>mec</i> types I-VI	Extra primers ter detectie van SCC <i>mec</i> types I-XI	
Vals positief resultaat bij <i>Staphylococcus aureus</i> "drop-out" mutanten			Theoretisch minder kans op vals positief resultaat bij <i>Staphylococcus aureus</i> "drop-out" mutanten	

**Bijlage 2**



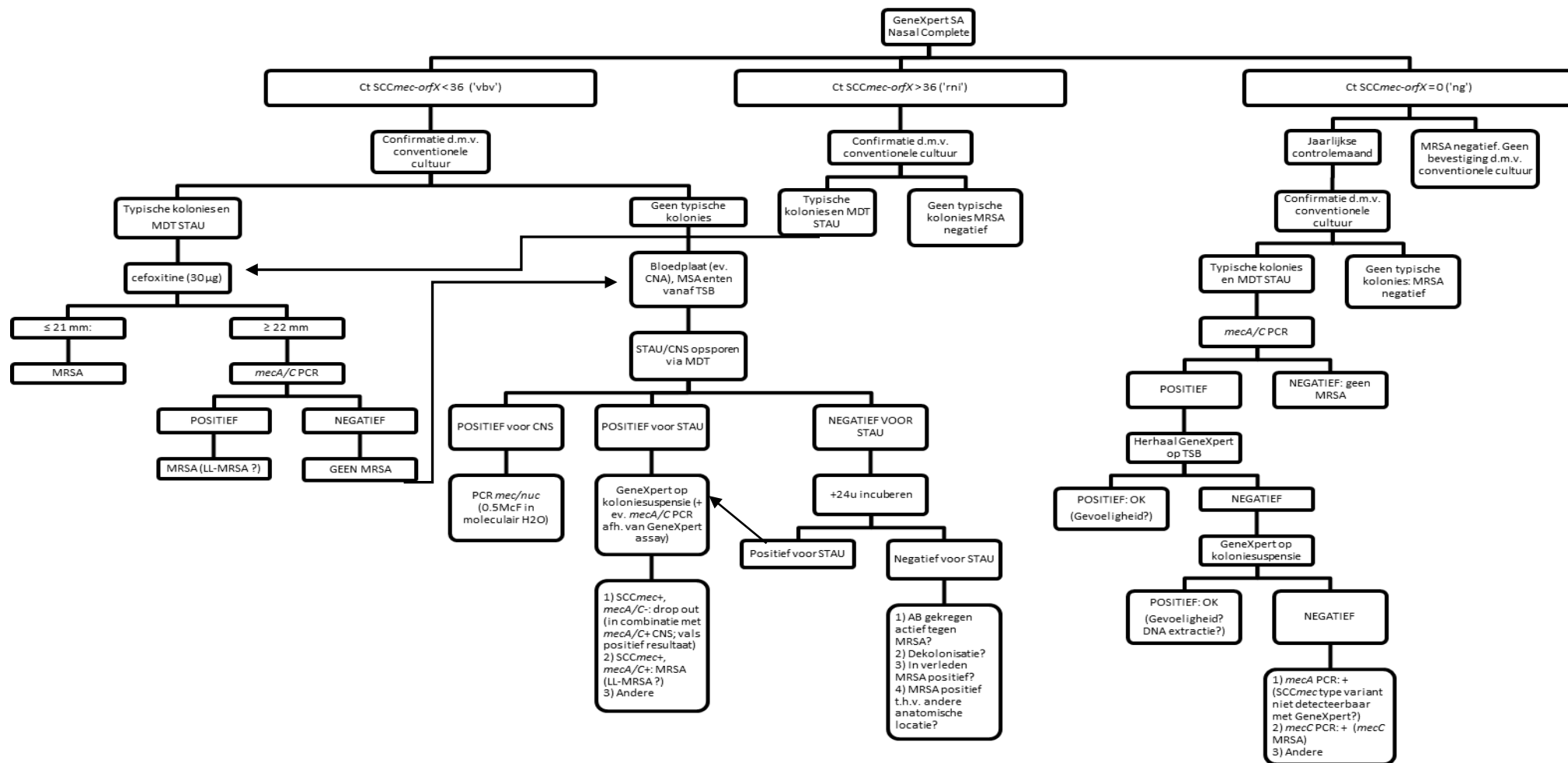
De schematische workflow voor het inzetten van een MRSA-screening (Xpert en conventionele kweek). (Procedure ZOL Genk)

**Bijlage 3**



De schematische workflow GeneXpert positieve/cultuur negatieve MRSA-screenings.(Procedure ZOL Genk)

**Bijlage 4**



Stroomschema interpretatie GeneXpert vs. Cultuur.