

Strategimøte nr 14, 2000:

STAFYLOKOKKER

EKSTERNE KVALITETSVURDERINGER I BAKTERIOLOGI, MYKOLOGI OG
PARASITTOLOGI

Rapport fra strategimøte

Hovedredaktører: Jørgen Lassen og Per Sandven

Strategimøte nr 14, 2000:

Stafylokokker

Redaktører:

Kåre Berg, Arnfinn Sundsfjord, Yngvar Tveten

ISSN: 0804-8444

Rapport fra strategimøte nr 14, 2000

INNHALDSFORTEGNELSE

Forord	5
Program for møtet	6
Deltakeroversikt	7
DEL 1 OPPSUMMERING OG ANBEFALINGER	8
1. Identifikasjon av stafylokokker	8
2. Koagulase negative stafylokokker	8
3. Resistensbestemmelse	9
3.1. Generelle momenter	9
3.2. Metoder for påvisning av meticillinresistens	10
Påvisning av MRSA i rutinediagnostikken:	10
Påvisning av meticillinresistens hos koagulase negative stafylokokker (KNS)	11
Agglutinasjonstester for påvisning av PBP 2a	11
3.3. BORSA	11
3.4. VISA/GISA	12
4. Diagnostikk ved fremmedlegemeinfeksjoner	13
5. Kateterassosierte infeksjoner	13
6. Molekylær epidemiologi – fagtyping/genotyping	15
DEL 2 SAMMENDRAG AV INNLEGGENE	16
1. Identifikasjon av stafylokokker	16
2. Koagulase-negative stafylokokker	21
3. Resistensbestemmelse - Generelle momenter	26
4. Metoder for påvisning av methicillinresistens hos <i>Staphylococcus aureus</i>	30

5. Metoder for påvisning av oxacillin (methicillin) resistens hos koagulase-negative stafylokokker	36
6. Bruk av agglutinationstester för påvisning av meticillinresistens hos stafylokokker	38
7. Borderline resistant <i>Staphylococcus aureus</i> (BORSA)	41
8. Nedsatt følsomhet for glykopeptid-antibiotika hos stafylokokker	45
9. Diagnostikk ved fremmedlegeme infeksjoner (spesielt proteser)	48
10. Kateterassosierte infeksjoner	49
11. Typing av bakteriestammer (molekylær epidemiologi)	53
DEL 3 ENDRINGER	58

FORORD

Referansegruppen for eksterne kvalitetsvurderinger i bakteriologi og mykologi arrangerte 03.11.2000 på Folkehelse det trettende strategimøte for deltagerne i "ringtestprogrammet". Årets tema var "Stafylokokker". Programansvarlig for møtet var avdelingsoverlege Yngvar Tveten, Skien, overlege, professor Kåre Berg, Trondheim og avdelingsoverlege Arnfinn Sundsfjord, Tromsø. Disse har også fungert som redaktører av nærværende rapport.

Som vanlig er rapporten inndelt i en innledende, oppsummerende del som er ført i pennen av de programansvarlige og en del som omfatter sammendrag av hvert enkelt innlegg. Ansvar for sammendragene er overlatt til de enkelte innledeerne.

Vi takker for et livlig og nyttig møte og håper at rapportens oppsummeringer av konklusjoner og anbefalinger vil komme deltagerne til nytte.

Vi takker programkomiteen for godt utført arbeid!

Oslo, august 2001

For Referansegruppen

Jørgen Lassen

Per Sandven

PROGRAM FOR MØTET

- | | |
|---|---------------------------|
| 1. Identifikasjon av stafylokokker | <i>Yngvar Tveten</i> |
| 2. Koagulase negative stafylokokker | <i>Asbjørn Digranes</i> |
| 3. Resistens, innledning | <i>Martin Steinbakk</i> |
| 4. Metoder for påvisning av MRSA. | <i>Lars Bevanger</i> |
| 5. Bruk av agglutinasjonstester for påvisning av PBP 2a | <i>Roland Jurén</i> |
| 6. BORSA | <i>Gaute Syvertsen</i> |
| 7. VISA/GISA | <i>Arnfinn Sundsfjord</i> |
| 8. Diagnostikk ved fremmedlegeme infeksjoner (spes. proteser). | <i>Eyvind Witsø</i> |
| 9. Kateterassosierte infeksjoner – håndtering i laboratoriet. | <i>Tore Lier</i> |
| 10. Molekylær epidemiologi – fagtyping/genotyping | <i>Kåre Berg</i> |
| 11. Avslutning | |

DELTAKEROVERSIKT

Kåre Bergh
Avdeling for mikrobiologi
Regionsykehuset i Trondheim
7006 TRONDHEIM

Lars Bevanger
Avdeling for mikrobiologi
Regionsykehuset i Trondheim
7006 TRONDHEIM

Asbjørn Digranes
Avdeling for mikrobiologi
Gades Institutt
5021 BERGEN

Peter Gaustad
Mikrobiologisk institutt
Rikshospitalet
0027 OSLO

Nils Grude
Telelab A/S
Postboks 1868 Gulset
3701 SKIEN

Elisebet Haarr
Mikrobiologisk laboratorium
Sentralsykehuset i Rogaland
Armauer Hansensv. 30
4011 STAVANGER

Hanne Husom Haukland
Mikrobiologisk avdeling
9038 REGIONSYKEHUSET I
TROMSØ

Nils Olav Hermansen
Mikrobiologisk laboratorium
Ullevål sykehus
0407 OSLO

Reidar Hjetland
Mikrobiologisk laboratorium
Sentralsykehuset i
Sogn og Fjordane
6800 FØRDE

Hjørdis Iveland
Mikrobiologisk avdeling
Buskerud Sentralsykehus
3004 DRAMMEN

Roland Jureen
Avdeling for mikrobiologi
Gades Institutt
5021 BERGEN

Jørgen Lassen
Avdeling for bakteriologi
Statens inst. for folkehelse
Postboks 4404 Torshov
0403 OSLO

Tore Lier
Mikrobiologisk avdeling
9038 REGIONSYKEHUSET I
TROMSØ

Liisa Mortensen
Mikrobiologisk avdeling
Nordland sentralsykehus
8017 BODØ

Fredrik Müller
Mikrobiologisk seksjon
Sentrallaboratoriet
Bærum sykehus
Sognepr. Munthe Kaas v. 100
1346 Gjøttum

Eivind Ragnhildstveit
Mikrobiologisk laboratorium
Østfold Sentralsykehus
Postboks 1020
1601 FREDRIKSTAD

Rolf-Arne Sandnes
LIMIK
Bakteriologisk avdeling
2600 LILLEHAMMER

Per Sandven
Avdeling for bakteriologi
Statens inst. for folkehelse
Postboks 4404 Torshov
0403 OSLO

Rolf Schøyen
Mikrobiologisk laboratorium
Vestfold sentralsykehus
3100 TØNSBERG

Tone Skarpaas
Mikrobiologisk avdeling
Vest-Agder Sentralsykehus
4604 KRISTIANSAND

Martin Steinbakk
Mikrobiologisk avdeling
Sentralsykehuset i Akershus
1474 NORDBYHAGEN

Arnfinn Sundsfjord
Mikrobiologisk avdeling
9038 REGIONSYKEHUSET I
TROMSØ

Gaute Syversen
Mikrobiologisk laboratorium
Ullevål sykehus
0407 OSLO

Yngvar Tveten
Telelab A/S
Postboks 1868 Gulset
3701 SKIEN

Einar Vik
Mikrobiologisk laboratorium
Fylkessykehuset i Molde
6400 MOLDE

Eyvind Witsø
Seksjon for ortopediske infeksjoner
og amputasjoner
Ortopedisk avdeling
Regionsykehuset i Trondheim
7006 TRONDHEIM

DEL 1 OPPSUMMERING OG ANBEFALINGER

1. IDENTIFIKASJON AV STAFYLOKOKKER

Definisjon: Gram positive kokker i par, kjeder, tetrader og klaser. Ikke bevegelige eller sporedannende. Katalase positive. Fakultativt anaerobe.

Slekt: Det finnes 32 species i stafylokokkfamilien og 15-20 subspecies (se tabell i hovedinnlegget)

Identifikasjon: Identifikasjon skjer primært vha. kolonimorfologi, vekst på selektive medier eller ved seleksjon ved utsed, og katalase. Det primære mål er å skille *S.aureus* fra koagulase negative stafylokokker. Aktuelle metoder som kan benyttes er agglutinasjon, DNase, koagulase, TNase og evt. andre biokjemiske tetssystemer (API, Crystal el.). Genetisk identifikasjon vha. PCR påvisning av *nuc* eller *koag* gener er også tilgjengelig.

Anbefalinger:

Dyrkning: Selektiv skål i tillegg til generelle medier, evt. utsed med aztreonam lapp/tablett. Anbefales spesielt benyttet ved utsed av forventet kontaminerte prøver fra abdominale inngrep og leggsår.

Identifikasjon: Til rutinebruk anbefales agglutinasjon eller DNase. Type agglutinasjonstest må vurderes i henhold til aktuelle MRSA epidemiologi. Ved tvil om riktig identifikasjon eller ved diskrepans mellom agglutinasjon og DNase, anbefales rørkoagulase eller TNase, evt. API Staph/API ID 32 Staph eller andre kommersielle kits. Hvis identifikasjon fortsatt er usikker anbefales bruk av genetiske tester.

Systemiske isolater og meticillinresistente *S. aureus* (MRSA): Alltid to diagnostiske tester hvis agglutinasjon eller DNase benyttes som primærttest. Hvis det i rutinen benyttes rørkoagulase eller TNase anses dette tilstrekkelig for korrekt identifikasjon.

2. KOAGULASE NEGATIVE STAFYLOKOKKER

Innledning: Humanpatogene koagulase negative stafylokokkarer (KNS) er først og fremst *S.epidermidis* og *S.saprophyticus*, men også andre arter kan være årsak til infeksjoner hos mennesket som *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S.lugdunensis*, *S.warneri*, *S.schleiferi* og *S.intermedius*. *S.lugdunensis* synes å være mere virulent enn de andre og er viet en del oppmerksomhet de siste år. *S. intermedius* er spesielt assosiert med infeksjoner etter dyrebitt.

Identifikasjon etter prøvematerialer

Urin:

Koagulase negative stafylokokker undersøkes mhp. novobiocinresistens (*S.saprophyticus*). Nærmere identifikasjon av novobiocinfølsomme stammer er sjelden aktuelt.

Postoperative sårinfeksjoner:

Artsidentifikasjon av koagulase negative stafylokokker fra ordinære postoperative sårinfeksjoner er vanligvis ikke nødvendig.

Fremmedlegemeassosierte infeksjoner, postoperative infeksjoner:

Det anbefales å gjøre identifikasjon ved funn av KNS ved overnevnte infeksjoner. Det anses spesielt viktig å skille *S.epidermidis* fra andre KNS. Dette kan gjøres med relativt enkle tester (tabell 2 i hovedinnlegget). Et annet alternativ er bruk av trehalose-mannitol-fosfatase agar (TMFA). Hvis man velger kommersielle testsystemer vil også andre KNS arter identifiseres.

Infeksjoner etter dyrebitt:

S. intermedius er viktig å kunne identifisere. Siden stammen er rørkoagulase positiv, må den kunne skilles fra *S.aureus* (tabell 4 i hovedinnlegget)

Isolater fra blodkultur og andre sterile kroppsvæsker:

Det anbefales å kunne identifisere flere arter enn bare *S.epidermidis* og *S.saprophyticus*. Dette kan gjøres med enkle tester (tabell 2 i hovedinnlegget), evt. kan det benyttes ulike kommersielle kits.

Kommersielle testsystemer til identifikasjon av stafylokokker:

Det finnes tre leverandører av kommersielle testsystemer til identifikasjon av stafylokokker; API Staph/API ID 32 Staph fra bioMerieux, BBL Crystal GP ID fra Becton Dickinson og STAPH ZYM fra Roscoe. Det er ikke gitt noen spesiell anbefaling om hvilket testsystem som fungerer best bortsett fra at evalueringer for STAPH ZYM først og fremst er utført på isolater fra dyr.

3. RESISTENSBESTEMMELSE

3.1. Generelle momenter

Målet med en resistensbestemmelser er to-delt. (i) Det enkelte resultat skal kunne forutsi klinisk respons på behandling. (ii) Samleresultater regionalt og nasjonalt vil være veiledende for empirisk antibiotikavalg ved ulike kliniske problemstillinger. Dette er selvfølgelig svært viktige beslutningsgrunnlag for klinikere og bør være sterkt motiverende for de enkelte laboratorier i arbeide med å kvalitetssikre utførelse og tolkning av resistensbestemmelser.

Brytningspunktene som skiller bakteriene i kategoriene følsom og resistent, er basert på populasjonsundersøkelser, antibiotikas virkningsmekanisme, farmakokinetikk/-dynamikk, resistensmekanismer og kliniske studier. Mellom åpenbart følsomme og resistente mikrober

har vi kategorien intermediær, som betyr at mikroben er påvirkelig dersom midlet kan gis i større doser enn vanlig og at midlet dermed oppnår en høyere konsentrasjon i infeksjonsfokus.

I innlegget er det også gitt anbefalinger for hvilke antimikrobielle midler som bør inngå ved resistensbestemmelse av stafylokokker:

- Standard resistensbestemmelse av stafylokokker bør inkludere følgende antibiotika: Penicillin G (beta-laktamasetest), oxacillin (med spesifikk metode), makrolid (erytromycin), linkosamin (klindamycin) og fucidin.
- Utvidet resistensbestemmelse er bare aktuelt ved multiresistens eller ved spesielle kliniske problemstillinger og bør omfatte følgende antibiotika: aminoglykosid (gentamicin), vankomycin (ev. også teikoplanin), trimetoprim-sulfamethoxazol og ved noen kliniske tilstander også rifampicin.

3.2. METODER FOR PÅVISNING AV METICILLINRESISTENS

Med dagens ”behagelige” norske epidemiologiske MRSA-situasjon er det særlig viktig at norske mikrobiologiske laboratorier kvalitetsikrer sine metoder for å kunne påvise meticillinresistens. Det er god forebyggende medisin. Denne problemstillingen er også blitt særlig aktualisert i forbindelse med det utvidede kjøp av helsetjenester ved helseinstitusjoner i land med en høyere MRSA forekomst og økt risiko for import.

I innlegget er det grundig redegjort for aktuelle fenotypiske og genotypiske metoder for rutinemessig påvisning og påfølgende verifisering av meticillinresistens hos stafylokokker. Bruk av selektive skåler for MRSA screeningsundersøkelser er særskilt omtalt, herunder også problemet med påvisning av heteroresistente MRSA hvor det forekommer subpopulasjoner i ulike mengder med ulike MIC-verdier. Populasjonen med lavest MIC kan være nærmest total dominerende og dermed kamuflere for en resistent minoritet som kan være vanskelig å påvise, men som lett selekteres fram under mangelfull antibiotikaterapi. Det er viktig å understreke at påvist meticillinresistens (resistens mot isoxazolyl-penicilliner: oxacillin, kloxacillin) hos stafylokokker betyr at mikroben er resistent mot alle tilgjengelige betalaktamantibiotika (penicilliner, kefalosporiner, monobaktamer, karbapenemer).

Påvisning av MRSA i rutinediagnostikken:

Det anbefales at alle kliniske *S. aureus* isolater rutinemessig undersøkes for meticillinresistens:

- **Undersøkelse mhp MRSA¹**: Mueller Hinton (MH) agar med 4% NaCl og oxacillin 4 mg/l. Inokulum fra kolonier oppslemmet i fysiologisk saltvann til 2.0 McFarland, som 10 µl spot (~ 1x10⁷ cfu) på skåla. Inkuberes ved 35°C i 24 timer.
- **”Overveiende sannsynlig MRSA”**: BBL Crystal, Velogene, Evigene
- **Verifikasjon av MRSA**: *mecA* påvisning ved PCR

¹ Endret 05.02.2002. Se Del 3 - endringer

Selektive medier ved MRSA screeningundersøkelser:

Undersøkelser med sikte på optimalisering av medier for MRSA screening bør foretas for å øke sensitivitet og redusere tid for påvisning. Foreløpig anbefales følgende metoder:

- For å redusere tid for påvisning:
Mannitolsaltagar med 2,5% NaCl, aztreonam 8 mg/l og oxacillin 4-6 mg/l. Inkubere i 24 (eventuelt 48) timer ved 35°C.
- For å øke sensitivitet:
I tillegg til agar benytte mannitolsaltbuljong (6-7.5% NaCl) i 24 timer med subkultur til selektivt agarmedium.

Påvisning av meticillinresistens hos koagulase negative stafylokokker (KNS)

Alle kliniske KNS-isolater fra sykehuspasienter som resistensbetømmes bør også rutinemessig undersøkes for meticillinresistens. Her er det fremkommet nye undersøkelser som klart dokumenterer behovet for å endre eksisterende brytningspunkter og skille mellom metoder for påvisning av meticillinresistens hos *S. aureus* og KNS.

Rutine-screening av KNS-isolater

MH agar med 4% NaCl og 0.5 mg/l oxacillin. Spot inokulum 10 µl fra oppslemning av kolonier i fysiologisk saltvann til 0,5 McFarland (~ 1x10⁶ CFU). Inkubere ved 35°C i 24 timer. Det ansees ikke nødvendig å verifisere en positivt test rutinemessig med genotypiske metoder.

Agglutinasjonstester for påvisning av PBP 2a

Meticillinresistens hos stafylokokker er betinget av et nytt ervervet penicillinbindende protein (PBP2a) med lav affinitet for betalaktamantibiotika. PBP2a kodes av et kromosomalt lokalisert gen *mecA* som er ervervet ved horisontal genoverføring. Siden 1999 har det vært tilgjengelig en rask kommersiell latex-agglutinasjonstest for påvisning av PBP2a. Testen er basert på monoklonale antistoffer mot PBP2a, tar 20 min. og utføres på kolonier fra blodskål. Norske og internasjonale undersøkelser har vist en høy sensitivitet og spesifisitet for påvisning av MRSA. Den anbefales ikke for påvisning av meticillinresistens hos KNS. På mikrobiologiske laboratorier hvor man ikke har tilgang på genotypiske metoder bør denne metoden kunne anvendes på mistenkte MRSA-stammer i påvente av en slik undersøkelse.

3.3. BORSA

Borderline resistente *S. aureus* (BORSA) er fortsatt dårlig definert som gruppe, både med tanke på biologisk likhet, diagnostiske kriterier og klinisk betydning. Forvirringen gjenspeiles i de ulike begrepene som brukes om gruppen i litteraturen: “borderline susceptible”, “borderline resistant”, “low-level resistant”, “intermediate susceptible”, “extrinsically resistant” og betalaktamase hyperprodusenter.

Borderline fenotype *S. aureus* har felles at de fremviser redusert MIC verdi mot penicillinastabile penicilliner. BORSA defineres her som *mecA*-negative *S. aureus* med MIC oxacillin > 1,0 mg/l.

Det er ikke dokumentert terapivikt med penicillinase stabile penicilliner ved behandling av infeksjoner med *mecA* negative *S. aureus* BORSA-stammer.

Det ble antydnet at usikkerheten om den kliniske betydningen av BORSA kanskje bør holdes innad på laboratoriet, og at stammene rapporteres som følsomme under forutsetning at stammen er undersøkt for *mecA*, følsomhet for amoxicillin med og uten clavulansyre og PBP2a agglutinasjon. Eventuelt kan man ta forbehold ved MIC oxacillin >1mg/l ved å gi ut stammen som intermediært følsom samt kommentere at isolatet har nedsatt *in vitro* følsomhet for penicillinase-stabile penicilliner og at klinisk effekt av penicilliner og kefalosporiner er usikker.

3.4. VISA/GISA

Glykopeptidantibiotika (teikoplanin og vankomycin) regnes fortsatt for å være den siste effektive skansen, alene eller i kombinasjon med aminoglykosider, i behandlingen av alvorlige infeksjoner med multiresistente Gram-positive bakterier. Representanter for de nye lovende oxazolidinonene er kun bakteriostatisk overfor stafylokokker. Den økende internasjonale forekomsten av nedsatt glykopeptidfølsomhet hos stafylokokker er derfor urovekkende. Det er så langt ikke etablert en allment akseptert molekylær forståelse av den nedsatte følsomheten. Så langt er det bare påvist intermediær nedsatt følsomhet for glykopeptidantibiotika hos kliniske *S. aureus* isolater. I Norge har dette ikke vært påvist.

Eksisterende norske brytningspunkter for følsomhet for både vankomycin og teikoplanin hos stafylokokker ($S \leq 4 \mu\text{g/ml}$; $R > 16 \mu\text{g/ml}$; intermediær følsomhet mellom S og R) er i overensstemmelse med andre lands brytningspunkter. *S. aureus* stammer med intermediær følsomhet for glykopeptidantibiotika defineres som GISA/VISA. Stammer med vankomycin MIC > 16 $\mu\text{g/ml}$ anses for å være resistente og benevnes GRSA/VRSA. Stammer kan også være heteroresistente (h-GRSA/VRSA). H-GRSA/VRSA kan sammenlignes med heteroresistente MRSA. Metodene for å påvise h-GRSA er mangelfullt utviklet. Det er også kontroversielt om slike isolater har noen klinisk betydning. Man kan likevel ikke utelukke at slike stammer kan gi opphav til homogent glykopeptidresistente *S. aureus*. H-GRSA-fenotypen er så langt bare påvist hos MRSA-isolater.

I innlegget gis det en oversikt over situasjoner og observasjoner som tilsier at man bør få mistanke om nedsatt følsomhet for glykopeptidantibiotika. Agardiffusjon ansees ikke egnet til påvisning av nedsatt følsomhet for vankomycin og teikoplanin. Ved mistanke om nedsatt følsomhet anbefales en agarfortynningsmetode som er nærmere beskrevet i innlegget.

4. DIAGNOSTIKK VED FREMMEDLEGEMEINFEKSJONER

Proteseinfeksjoner inndeles i tre typer (Mayo):

Type I:

Akutt/subakutt infeksjon som oppstår inntil 4 uker postoperativt. Generelle og lokale infeksjonstegn. Vanligst etiologi er *S.aureus*.

Behandling: Radikal bløtvevsrevisjon med skifte av løse protesekomponenter.

Diagnostikk: Vevsbiopsier (+ blodkulturer + evt.sårsekret).

Type III:

Hematogen spredning, når som helst etter innsetting. Oftest akutt debut.

Diagnostikk: Dyrkning etter leddpunksjon, evt. etter bløtdelsrevisjon (+ blodkulturer).

Type II:

Lavvirulente mikrober (spesielt koagulase-negative stafylokker og *P. acnes*), snikende forløp med debut vanligvis mellom 3 mndr til 2 år etter operasjonen. Innen ortopedisk miljø regnes at lavgradig infeksjon er årsak til langt flere proteseløsninger enn hva som kan påvises ved "rutinemessig bakteriologisk undersøkelse". Afebrilitet, normal SR og CRP utelukker ikke diagnosen. Røntgenologisk kan av og til sees tegn på osteomyelitt, men det er ofte bare løsningstegn som gir mistanke om lavgradig infeksjon. Smerter er et viktig symptom. Behandling er utskiftningsrevisjon (1-trinns eller vanligst 2-trinns hvor det er et intervall på 4-6 uker fra fjerning av protesen til innsetting av ny).

Diagnostikk: All antibiotikabehandling seponeres minst 7 dager før leddpunksjon og proteserevisjon.

Leddpunksjon: Viktig, men falske negative svar i ca 30-40 % må påregnes.

Peroperative biopsier: Minst 5 vevsbiopsier tas fra bløtvev rundt protesen og prosesseres separat. Spesielt viktig å ta biopsier før protesen fjernes hvis det tidligere er brukt antibiotikaholdig sement (pga antibiotikafrigjøring når sement brykkes).

Forbedret bakteriologisk diagnostikk er nødvendig. Det er rapportert om hyppigere funn av bakterier hvis den fjernede protesen utsettes for mild sonikering for å løsne bakterier fra biofilm, alternativt at det skrapes fra overflaten av protesen til prosessering. PCR baserte teknikker har klart et potensiale for forbedret bakteriologisk diagnostikk av proteseinfeksjoner. Slik diagnostikk er ikke rutine i Norge idag.

5. KATETERASSOSIERTE INFEKSJONER

Insidens: Tallene for kateterrelaterte infeksjoner varierer svært i litteraturen, avhengig av blant annet katetertype og hvordan man definerer infeksjonene. National Nosocomial Infection Surveillance System i USA rapporterte i perioden 1986-90 fra intensivavdelinger rater på kateterrelaterte bakteriemi som varierte mellom 2,1 (respiratorpasienter) til 30,2 (brannskadde) per 1000 døgn med sentrale katetre.

Etiologi: Vanligste etiologiske agens er koagulase negative stafylokokker, fulgt av *S.aureus* og Gram-negative staver.

Patogenese: Ikke entydig avklart. For KNS er det enighet om at bakteriene i hovedsak stammer fra pasientens egen hudflora eller fra hendene til helsepersonell. Kateteret koloniseres enten fra innstikksted og bakterier migrerer på utsiden av kateteret, eller kateteret koloniseres via den utvendige kobling med migrasjon av bakterier langs innsiden. Ved elektron-mikroskopi av non-tunnellerte katetre er det vist at biofilmdannelse og kolonisering er universell, både hos dyrkning negative og dyrkning positive. Koloniseringen var dominerende på yttersiden hos kortids-CVK (<10 d.), men dominerende på innsiden hos langtids-CVK (>30 d.).

Diagnostikk:

Ved infeksjon omkring innstikksted blir diagnostikk som ved en sårinfeksjon.

Ved mistanke om sepsis med utgangspunkt i kateter, kreves vanligvis minst to positive blodkulturer og ingen andre påviste primære foci. Betydning av å finne et høyere ratio av CFU i blod tatt gjennom kateteret i sammenligning med blod tatt perifert er omdiskutert

Dyrkning av kateterspisser: Optimale metode er ikke avklart, heller ikke hva som er de riktige tolkningskriterier. Litteraturen spriker pga mange heterogene faktorer (studiepopulasjoner, insidens, ulike teknikker og ikke minst ulike definisjoner og usikkerhet om "gullstandard").

I prinsippet to metoder for dyrkning: a) rulle teknikk, b) utsæd fra buljong (evt kvantitativt) etter ulike teknikker for å løsne bakterier fra spissen: gjennomspyling, bruk av vortex eller mild sonikering.

a) Rulleteknikk: Kateterspissen (5 cm) rulles frem og tilbake (4 ganger) over en agarskål. Etter inkubasjon er tradisjonelle kriterier for positiv test 15 CFU. Enkelte har foreslått lavere grense på 5 CFU for å få noe bedre sensitivitet i diagnostikken av kateter-relaterte bakteremier.

Fordel: enkel å utføre. Ulempe: kun utsiden av kateteret dyrkes.

b) Utsæd fra buljong. Sannsynlig noe mer sensitiv, men samtidig lavere positiv prediktiv verdi enn rulleteknikk. Ved gjennomspylingsteknikk med 5 ml buljong eller mild sonikering er det i begge tilfeller anbefalt en cut-off på 100 CFU/ml. Sonikering har ikke vist bedre resultat enn gjennomspyling.

Fordel: Kolonisering av innsiden av kateteret detekteres. Ulempe: Mer tidkrevende med kvantitativ utsåing.

Konklusjon: Optimal metode uavklart. Begge teknikker dårlige mht å avgjøre om infeksjonstilstand er kateterrelatert. Man må være klar over spesielt lav positiv prediktiv verdi.

6. MOLEKYLÆR EPIDEMIOLOGI – FAGTYPING/GENOTYPING

Uavhengig av metodevalg må følgende momenter vurderes for de aktuelle metoder:

- Typbarhet
- Reproduserbarhet
- Diskriminerende styrke
- Teknisk utførelse (vanskelighetsgrad, tid før svar)
- Tolkning: problemer, kriterier.
- Kostnader
- Behov for stor-skala analyser
- Behov for å generere referanse-samling / database

Det vises til innlegget for en oversikt over de mest benyttede metoder for typing av bakterier generelt og *S.aureus* spesielt. Utviklingshastigheten innen feltet er høy og nye metoder forventes å bli tatt i bruk relativt raskt.

Fenotypiske metoder vil generelt være for lite diskriminerende og med for lav reproduserbarhet til å avgjøre om det er klonal tilhørighet mellom ulike stammer.

Antibiogram vil generelt være lite egnet. Dog vil det finnes situasjoner med spesielle resistensforhold (enkeltresultatet eller konstallasjoner) hvor en kan mistenke klonal opphopning, men dette bør bekreftes ved bruk av bedre metoder.

Fagtyping har tidligere vært betraktet som referansemetoden for typing av *S.aureus*.

Hovedproblemet er at relativt mange stammer ikke er typbare og at metoden er krevende.

Dette har ledet til at fagtyping definitivt har tapt sin posisjon som referansemetode for karakterisering av stafylokokkstammer og erstattes i økende grad av genotypiske metoder.

Multilokus enzymelektroforese (MLEE) har sannsynligvis et potensiale også for *S.aureus*, men vil neppe finne utstrakt bruk pga kompleksiteten i teknisk utførelse.

Av de genotypiske metodene vil flere PCR-baserte metoder være enkle og raske å utføre. Av de genotypiske metoder har hittil makrorestriksjonsfragment analyse ved pulsfelt gel elektroforese (PFGE) funnet størst anvendelse pga høy grad av diskriminerende styrke og reproduserbarhet. AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) er en potensiell kandidat til å utfordre PFGE's plass, men det er foreløpig sparsomt med publikasjoner om stafylokokker og AFLP.

PFGE er hittil mest benyttet og betraktes av mange i dag som referansemetoden. PFGE (også AFLP) tillater opprettet databaser basert på fragmentstørrelser av de ulike stammer. Dette vil være svært fordelaktig for å kunne overvåke spredningen av epidemiske kloner.

Konklusjon:

Fenotypiske metoder har i dag liten plass ved utredning av utbrudd forårsaket av stafylokokker. Valg av metode vil være avhengig av en rekke forhold, bl.a hvilket utstyr man har tilgjengelig, hvor raskt ønskes svar, behov for sammenligning med andre isolater fra andre institusjoner og tidligere isolater etc. Noen enkle, raske PCR baserte metoder er egnet for screening, men det forventes betydelig utvikling i PCR-baserte metodikker med forbedret diskriminerende styrke. Pr idag synes PFGE eller AFLP være best egnet. Disse metodene muliggjør opprettelse av databaser for sammenligning mellom stafylokokk-isolater.

DEL 2 SAMMENDRAG AV INNLEGGENE

1. IDENTIFIKASJON AV STAFYLOKOKKER

Yngvar Tveten, A/S Telelab, Skien

Definisjon:

Gram positive kokker, opptrer i par, kjeder, tetraeder og klaser. Ikke bevegelige eller sporedannende. Katalase positive. Fakultativt anaerobe.

Vokser i nærvær av 10% NaCl og ved et bredt temperaturintervall; 18-40°C.

Følsomme for furazolidon og resistente for bacitracin (0,04 IE). Lyses av lysostaphin, relativt resistente mot lysering med lysozyme.

Slekt:

Det er for tiden 32 species i stafylokokkfamilien og 15-20 subspecies (tabell 27.1 fra Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections; Volume 2 Systematic Bacteriology). Antall og typer subspecies varierer mellom ulike lærebøker.

Table 27.1 Currently recognized *Staphylococcus* species

Species	Reference
<i>S. epidermidis</i>	Winslow and Winslow 1908, Evans 1916, Schleifer and Kloos 1975
<i>S. capitis</i>	Kloos and Schleifer 1975a
<i>S. caprae</i>	Devriese et al. 1983
<i>S. saccharolyticus</i>	Foubert and Douglas 1948, Kilpper-Bälz and Schleifer 1981
<i>S. hominis</i>	Kloos and Schleifer 1975a
<i>S. haemolyticus</i>	Schleifer and Kloos 1975
<i>S. warneri</i>	Kloos and Schleifer 1975a
<i>S. pasteurii</i>	Chesneau et al. 1993
<i>S. lugdunensis</i>	Frenay et al. 1988
<i>S. auricularis</i>	Kloos and Schleifer 1983
<i>S. aureus</i>	Rosenbach 1884
<i>S. saprophyticus</i>	Shaw, Stitt and Cowan 1951, Schleifer and Kloos 1975
<i>S. cohnii</i>	Schleifer and Kloos 1975
<i>S. xylosum</i>	Schleifer and Kloos 1975
<i>S. kloosii</i>	Schleifer, Kilpper-Bälz and Devriese 1984
<i>S. equorum</i>	Schleifer, Kilpper-Bälz and Devriese 1984
<i>S. arlettae</i>	Schleifer, Kilpper-Bälz and Devriese 1984
<i>S. gallinarum</i>	Devriese et al. 1983
<i>S. simulans</i>	Kloos and Schleifer 1975a
<i>S. carnosus</i>	Schleifer and Fischer 1982
<i>S. piscifermentans</i>	Tanasupawat et al. 1992
<i>S. felis</i>	Igimi et al. 1989
<i>S. intermedius</i>	Hájek 1976
<i>S. schleiferi</i>	Frenay et al. 1988
<i>S. delphini</i>	Varaldo et al. 1988
<i>S. hyicus</i>	Devriese et al. 1978
<i>S. chromogenes</i>	Devriese et al. 1978, Hájek et al. 1986
<i>S. muscae</i>	Hájek et al. 1992
<i>S. sciuri</i>	Kloos, Schleifer and Smith 1976
<i>S. lentus</i>	Kloos, Schleifer and Smith 1976, Schleifer et al. 1983
<i>S. vitulus</i>	Webster et al. 1994
<i>S. caseolyticus</i>	Schleifer et al. 1982

“Normalflora”:

Ulike stafylokokker domierer normalfloraen på hud og slimhinner.

Hodebunnen domineres av *S.epidermidis*, *S.hominis* og *S.haemolyticus* i pre-puberteten, etter puberteten overtar *S.capitis*. I ansiktet forøvrig dominerer *S.epidermidis*. I ytre øreåpning finnes *S.auricularis* og *S.capitis*. Ytre neseåpning koloniseres med *S.aureus* og *S.epidermidis*, lokalisasjonen oppfattes som “hovedkvarteret” til *S.aureus* hos mennesket. Bærerskap med *S.aureus* finnes hos 10-40%, hyppigere hos barn enn hos voksne. Det er også vanligere å finne *S.aureus* ellers på huden hos barn enn hos voksne. I aksille og lyske dominerer *S.epidermidis* og *S.hominis*, i noen grad også *S.haemolyticus*. I lysken og perianalt kan man også finne *S.aureus* og *S.saprophyticus*. På huden forøvrig dominerer *S.epidermidis* med *S.hominis* som nummer to.

Mange andre arter av stafylokokker koloniserer huden for kortere perioder. *S.xylosus* og *S.simulans* overføres vanligvis fra kjæledyr.

Dyrkning:

Vokser villig på en rekke ikke-selektive og selektive medier. Tilgjengelige selektive medier er mannitol-salt agar, lipase-salt-mannitol agar, phenylethyl alkohol agar, Colombia colistin-nalidixin (CNA) agar og Baird-Parker agar tilsatt “egg yolke tellurite”. Vanligst benyttet i Norge er mannitol-salt agar.

Identifikasjon:

Stafylokokker identifiseres primært vha. kolonimorfologi, vekst på selektive medier eller ved seleksjon ved utsed med aztreonam-lapp, og katalase.

Det primære mål forøvrig er å skille *S.aureus* fra de koagulase negative stafylokokker (KNS). For stafylokker isolert fra pussprøver kan man benytte agglutinasjonstester, DNase, TNase eller koagulase. Alle tester utføres på kolonier fra blodskål og det benyttes alltid positiv og negativ kontroll. Selektive medier og næringsfattige medier kan gi flask negative resultater.

Viktige stafylokokkegenskaper:

- Protein A (PA): Finnes hos 90-99% av humanpatogene stafylokokker. PA har mange viktige funksjoner; komplement aktivering, induksjon av hypersensitivitets reaksjoner, mitogen stimulering av lymfocytter, hemning av opsonisering og virker cytotoxisk.
- “Clumping factor”: Fibrinogen bindende sete i celleveggen. Aktiverer koagulasjon ved å binde både fibrinogen og protrombin.
- Staphycoagulase (koagulase): Ekstracellulært (fritt) protein som binder protrombin og aktiverer koagulasjon.
- DNase: Produksjon av ekstracellulær nuclease hos stafylokokker har vært kjent fra 1956. Varmelabil nuclease kan påvises ved bruk av DNase skål. Også inntil 20% av koagulase negative stafylokokker kan vise DNase aktivitet.

- TNase: En varmemestabil nuklease som kan kløyve både DNA og RNA produseres av de fleste stammer av *S.aureus*, *S.schleiferi*, *S.intermedius* og *S.hyicus*. Noen stammer av *S.epidermidis*, *S.simulans* og *S.carnosus* kan vise svak TNase aktivitet.

Diagnostiske tester:

- Agglutinasjon: Benyttes for å skille mellom *S.aureus* og KNS. Det finnes en rekke tester på markedet. Partiklene i testene er dekket med fibrinogen og antistoff mot protein A. Sensitivitet og spesifisitet for MSSA er 98-100%.

Innvending mot agglutinasjonstestene har vært dårlig sensitivitet mhp. korrekt identifikasjon av MRSA. Sensitivitet i ulike studier har ligget på 70-80%. Funnene er avhengig av populasjon MRSA; MRSA med kapsel polysakkarid type 5 har gitt dårligst sensitivitet.

Nyere tester har partikler med tillegg av monoklonale antistoffer rettet mot kapsel polysakkarid type 5 og 8 noe som har medført bedring i sensitivitet for MRSA til 97-98%.

Falsk positive resultater kan sees for *S.lugdunensis* og *S.schleiferi* som inneholder "clumping factor" og for *S.haemolyticus* som produserer kapsel polysakkarid type 8.

- Koagulase: Påvisning av koagulase kan utføres på 2 måter:

– *Rørkoagulase påviser staphycoagulase (fri koagulase)*:

Kaninplasma rekonstitueres med destillert vann etter produsentens anvisning.

1-2 kolonier fra blodskål inokuleres med 0,5 ml rekonstituert kaninplasma i et glassrør. Inkuberes 4 timer ved 37⁰C og observeres for koagulering ved å velte røret 90⁰. Enhver koagulering anses som positiv test. Negative prøver etter 4 timer inkuberes over natt fordi noen få *S.aureus* stammer krever mere enn 4 timer på å danne koagel. Testen må avleses etter 4 timer da videre inkubering kan medføre at koagelet løses opp (stafylokinase). Sensitivitet og spesifisitet 99-100%. *S.schleiferi* kan gi falsk positivt resultat. Unngås ved å benytte kaninplasma i stedet for humant plasma.

– *Slide testen påviser cellebundet koagulase eller "clumping factor"*:

Det lages en tett suspensjon av kolonier i destillert vann. Tilsettes 1 dråpe rekonstituert kaninplasma og observeres på koagulering innen 10 sek.

10-15 % av stafylokokkene er falsk negative (mangler "clumping factor) og falsk positive resultater kan sees hos *S.lugdunensis* og *S.schleiferi*.

- DNase: Benyttes på samme måte som agglutinasjonstester for å skille mellom *S.aureus* og KNS. Etter inkubasjon over natt med staf strek på DNase skål tilsettes 1M HCl i 1 min. Syre vil precipitere intakt DNA. Oppklaring rundt staf strek > 10 mm indikerer *S.aureus*.

Sensitivitet og spesifisitet tilsvarer agglutinasjonstestene, men problemet med MRSA unngås. Opp til 20% av KNS er angitt å kunne vise DNase aktivitet.

- TNase: *S.aureus* kan skilles fra KNS ved påvisning av termostabil nuklease. Nedbrytning av DNA forårsaket av nuklease fører til at toluidine blå endrer farge til rosa eller rødt.
 1. Tilsett flere kolonier i BHI-buljong.
 2. Inkuber i 2 timer ved 35⁰C.
 3. Kok i 15 min. i vannbad.
 4. Avkjøl til romtemp.
 5. Lag en brønn i DNase agar med Pasteur pipette eller sugerør.
 6. Tilsett 50 µl av den avkjølede bakteriesuspensjonen i brønnen.
 7. Inkuber i 2-4 timer ved 35⁰C.
 8. Rosa eller rød halo omkring brønnen indikerer *S.aureus*.

Som materiale kan også benyttes 2 ml blodkultur buljong (prosedyre fra p.3). Falsk positive resultater kan sees ved *S.schleiferi*. Kan skilles fra *S.aureus* med PYR-test (*S.aureus* negativ, *S.schleiferi* positiv)

Ut fra egen erfaring med problemstammer mottatt i forbindelse med utprøving av nye diagnostiske reagenser er dette metoden med høyest sensitivitet og spesifisitet.

Genetisk identifikasjon

I tvilstilfeller ved funn av problemstammer, kan genetisk påvisning av spesifikke gener vha. av PCR benyttes.

PCR påvisning av *nuc* og *koag* kan utføres rutinemessig i Norge.

Nuc – nuklease genet påvises ofte i multiplex PCR sammen med *mecA* og kan utføres ved Haukeland, Rikshospitalet, SiA, Telelab, Trondheim, Tromsø og Ullevål.

Koag – påvisning av koagulase genet kan utføres på Telelab.

Kortfattede anbefalinger

Dyrkning:

Selektiv skål i tillegg til generelle medier, evt. utsed med aztreonam lapp/tablett. Anbefales spesielt benyttet ved forventet kontaminerte prøver fra abdominale inngrep og leggsår.

Identifikasjon:

Rutine: Agglutinasjon eller DNase. Det anbefales benyttet agglutinasjonstest med høy sensitivitet og spesifisitet for påvisning av MRSA. Ved tvil om riktig identifikasjon eller ved diskrepans mellom agglutinasjon og DNase, anbefales rørkoagulase, evt. API Staph/API ID 32 Staph eller andre kommersielle kits.

Systemiske isolater og MRSA:

Alltid to diagnostiske tester. Hvis det i rutinen benyttes rørkoagulase eller TNase, er dette tilstrekkelig.

Referanser

Kloos WE. 1998. Staphylococcus, p. 577-633. *In* Topley and Wilson, Microbiology and microbial infections, Volume 2; Systematic bacteriology.

Kloos WE and Bannermann T L. 1999. Staphylococcus and Micrococcus. p. 264-83. *In* Manual of Clinical microbiology. AMS, Washington, D.C.

Oeding P. 1983. Taxonomy and classification, p. 1-7. *In* Easmon CSF and Adlam D (ed.), Staphylococci and staphylococcal infections, Volum 1; Clinical and epidemiological aspects. Academic Press, London.

Predari SC, Ligozzi M, Fontana R. Genotypic identification of methicillin-resistant coagulase negative staphylococci by polymerase chain reaction. *Antimicrob Agents Chemother* 1991;35:2568-73.

2. KOAGULASE-NEGATIVE STAFYLOKOKKER

Asbjørn Digranes, Avdeling for mikrobiologi og immunologi, Gades institutt, Haukeland sykehus, Bergen

Det er til nå beskrevet 32 ulike species av stafylokokker. Dessuten finnes flere subspecies. Vel halvparten av disse artene kan forekomme normalt på hud eller slimhinner hos mennesker.

De koagulase-negative stafylokokkene som har størst betydning som årsak til infeksjoner hos mennesker er *Staphylococcus epidermidis* og *Staphylococcus saprophyticus*, men også andre species kan være humanpatogene, bl.a. *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus hominis*, *Staphylococcus lugdunensis*, *Staphylococcus warneri*, *Staphylococcus schleiferi* og *Staphylococcus intermedius*. *S. lugdunensis* har vært gjenstand for en viss oppmerksomhet de senere årene. Den synes å være mer virulent enn andre koagulase-negative stafylokokker. *S.intermedius* som forekommer hos hunder, til dels også hos andre dyr, kan forårsake sårinfeksjon etter hundebitt.

Differensiering fra mikrokokker

Stafylokokker kan adskilles fra mikrokokker ved relativt enkle metoder (Tabell 1). Noen av disse foreligger som kommersielle tester, bl.a. som tabletter fra A/S Rosco.

Identifikasjon

Urinisolater

Det er vanligvis tilstrekkelig å undersøke isolater av koagulase-negative stafylokokker fra urinprøver med henblikk på novobiocinresistens. Andre species enn *S.saprophyticus* som kan være resistente mot novobiocin (*Staphylococcus cohnii*, *Staphylococcus xylois*, *Staphylococcus pulveri*), er lite aktuelle som årsak til urinveisinfeksjon. En nærmere identifikasjon av novobiocinfølsomme stammer er sjeldent aktuelt.

Postoperative sårinfeksjoner

Artsidentifikasjon av koagulase-negative stafylokokker fra postoperative sårinfeksjoner er vanligvis ikke nødvendig.

Isolater fra fremmedlegemeassosierte infeksjoner, postoperative infeksjoner

Ved infeksjoner relatert til et fremmedlegeme (proteser, shunter, intravasale katetre, dialysekatetre) er det viktig å identifisere *S.epidermidis*. Dette kan gjøres med noen få tester (Tabell 2). Imidlertid produserer 5-10% av *S.epidermidis*-stammene ikke alkalisk fosfatase. Slike stammer kan adskilles fra *S.hominis* ved å undersøke følsomheten for polymyxin B (NB! med lapp som inneholder 300 IE). (*S.epidermidis* er resistent).

Et alternativ er trehalose-mannitol-fosfatase agar (TMFA). *S.epidermidis* produserer ikke syre fra trehalose eller mannitol og er vanligvis fosfatase positiv. Ved bruk av lapper som inneholder henholdsvis bacitracin (0,04 IE) og novobiocin oppnås differensiering fra mikrokokker og identifikasjon av *S.saprophyticus*.

Infeksjon etter hundebitt

S.intermedius som kan forårsake infeksjon etter hundebitt, er koagulase-positiv ("rørkoagulase"). Den kan imidlertid skilles fra *S.aureus* ved noen få tester (Tabell 4).

Isolater fra blodkulturer, sterile væsker

Når det gjelder isolater fra blodkulturer og sterile væsker kan identifikasjon av flere arter enn *S.epidermidis* og *S.saprophyticus* være aktuelt. De testene som er vist i tabell 2 kan være tilstrekkelig. Ulike kommersielle "kits" kan også benyttes. De mest aktuelle er API Staph, API ID 32 Staph, BBL Crystal GP ID og STAPH ZYM.

Kommersielle "kits" til identifikasjon av stafylokokker

API Staph (bioMerieux sa):

Består av 19 tester. Er beregnet for identifikasjon av stafylokokker, mikrokokker og *Stomatococcus mucilaginosus*, til sammen 25 species. *S.epidermidis* synes å bli identifisert med stor sikkerhet. Identifikasjonen av andre species virker mer usikker.

API ID 32 Staph (bioMerieux sa):

Inneholder 26 tester og skal muliggjøre identifikasjon av 24 species (stafylokokker, mikrokokker, *S.mucilaginosus* og *Aerococcus viridans*). En større undersøkelse viste at 83% av isolatene ble korrekt identifisert, og at ytterligere 12% kunne identifiseres med supplerende tester.

BBL Crystal GP ID (Becton Dickinson):

Omfatter 29 tester og skal kunne identifisere det store flertallet av aerobe, Gram-positive bakterier, inkludert 25 stafylokokk-arter. Dokumentasjonen virker tynn, men de studiene som foreligger tyder på at stafylokokker gjennomgående blir korrekt identifisert.

STAPH ZYM (Rosco A/S):

STAPH ZYM består av 10 enzymatiske tester. Dessuten inngår undersøkelse av følsomhet for novobiocin og polymyxin B. Systemet er beregnet til identifikasjon av praktisk talt alle stafylokokk-species, men publiserte undersøkelser omfatter hovedsakelig isolater fra dyr.

Referanser

Bevanger, L. Bakteriologisk diagnostikk ved stafylokokkinfeksjoner. I: Digranes A, Harthug S, Solberg CO, red. Stafylokokkinfeksjoner. Oslo: Eli Lilly Norge AS 1996; 47-55.

Brun Y, Bes M, Boeufgras JM, Monget D, Fleurette J, Auckenthaler R, et al. International collaborative evaluation of the ATB 32 Staph gallery for identification of the staphylococcus species. Zbl Bakt 1990; 273: 319-26.

Kloos WE, Bannerman TL. Update on clinical significance of coagulase negative staphylococci. Clin Microbiol Rev 1994; 7: 114-40.

Kloos WE, Bannermann TL. Staphylococcus and micrococcus. I: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC, Yolken RH, red. Manual of clinical microbiology. 7. utg. Washington DC 1999; 264-82.

Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn Jr, WC. Color atlas and textbook of diagnostic microbiology. Philadelphia, New York 1997; 539-76.

Pfaller MA, Herwaldt LA. Laboratory, clinical, and epidemiological aspects of coagulase-negative staphylococci. Clin Microbiol Rev 1988; 1: 281-99.

Rupp ME, Archer GL. Coagulase-negative staphylococci: pathogens associated with medical progress. Clin Infect Dis 1994; 19: 231-45.

Stevens DL, Jones C. Use of trehalose-mannitol-phosphatase agar to differentiate Staphylococcus epidermidis and Staphylococcus saprophyticus from other coagulase-negative staphylococci. J Clin Microbiol 1984; 20: 977-80.

Tabell 1. Metoder til å differensiere mellom mikrokokker og stafylokokker

Metode	Mikrokokker	Stafylokokker
Produksjon av syre fra glukose anaerobt	-	+
Produksjon av syre fra glukose aerobt i nærvær av 0,4 mg/1 erytromycin	-	+
Modifisert oksydaseresaksjon	+	-
Følsomhet for lysostafin	-	+
” ” furazolidon	-	+
” ” bacitracin (0.04 IE lapp)	+	-

Tabell 2. Karakteristika for en del koagulase-negative stafylokokker

Species/ subspecies	Alkalisk fosfatase	Pyrr-test	ODA	Trehalose	Novobiocin-resistens
<i>S. epidermidis</i>	+	-	(v)	-	-
<i>S. saprophyticus</i>	-	-	-	+	+
<i>S. haemolyticus</i>	-	+	-	+	-
<i>S. hominis</i>	-	-	-	v	-
<i>S. lugdunensis</i>	-	+	+	+	-
<i>S. warneri</i>	-	-	-	+	-
<i>S. schleiferi subsp. schleiferi</i>	+	+	-	v	-

Pyrr = pyrrolidonyl arylamidase, ODA = ornitin dekarboksylase aktivitet,
 + = $\geq 90\%$ av stammene gir positiv reaksjon, - = $\geq 90\%$ av stammene gir negativ reaksjon,
 V = 11-89% av stammene gir positiv reaksjon, () = langsom (forsinket) reaksjon

Tabell 3. Identifikasjon av koagulase-negative stafyokokker med trehalose-mannitol-fosfatase agar (TMFA)

Mikroorganisme	Syreproduksjon fra trehalose/mannitol	Novobiocin	Bacitracin
<i>S.epidermidis</i>	-	Følsom	Resistent
<i>S.saprophyticus</i>	+	Resistent	Resistent
Andre KNS	+*	Følsom	Resistent
Mikrokokker	+	Følsom	Følsom

*Enkelte stammer av *S.hominis* og *S.schleiferi* kan gi negativ reaksjon

Tabell 4. Karakteristika som skiller *S.intermedius* fra *S.aureus*

	<i>S.intermedius</i>	<i>S.aureus</i>
Pigmentdannelse	-	+
ONPG	+	-
Voges-Proskauer	-	+
Syreproduksjon fra mannitol	-/+*	+

*Enkelte stammer kan gi positiv reaksjon etter flere døgn

3. RESISTENSBESTEMMELSE - GENERELLE MOMENTER

Martin Steinbakk, Mikrobiologisk avdeling, Sentralsykehuset i Akershus

Innledning

Klinikere betrakter ofte resultatet av resistensbestemmelse som viktigere eller minst like viktig som identifikasjon av mikrober. På bakgrunn av tiltagende resistensproblemer kommer vel neppe denne oppfatning til å endre seg med det første. Resistensbestemmelse av mikrober er blant annet av denne grunn en av de viktigste undersøkelser som utføres i mikrobiologiske laboratorier.

Laboratoriet må prioritere analysen slik at mest mulig korrekte resultater rapporteres i en forståelig form til klinikere. Det er derfor merkelig at laboratoriene har vært så tilbakeholdne med å kvalitetssikre resistensbestemmelse som analyse. Fra mange hold er det korrekt hevdet at analysen er vanskelig eller lite nøyaktig. Nettopp fordi analysen er vanskelig er det ekstra viktig å gjøre undersøkelsene korrekt med en optimal og kvalitetssikret metode.

Målet med resistensbestemmelse er å forutsi klinisk respons på behandling. Resultatet følsom ("S") er ment å bety at en gitt infeksjon med en stor grad av sannsynlighet vil svare på behandling med det testede antibiotikum, mens resultatet resistent ("R") er ment å bety at det er stor sannsynlighet for at behandlingen med aktuelle middel ikke vil virke.

Et annet viktig aspekt ved resistensbestemmelse er å veilede kliniker i empirisk valg av antibiotikum ved en gitt klinisk problemstilling. Dette gjøres ved rapportering av resultater for enkeltundersøkelser og ved oversikter av resistensforhold hos de vanligst forekommende bakterier fra utvalgte prøvetyper.

Etablering av brytningspunkter

Ved hjelp av kunnskap om antibiotikas virkningsmekanisme, farmakokinetikk/farmakodynamikk og mikrobenes resistensmekanismer, har man forsøkt å etablere brytningspunkt som skiller mikrobenes i kategoriene følsom og resistent. I tillegg er det etablert en kategori, intermediær ("I") mellom åpenbart følsomme og resistente mikrober. Kategorien "I" er ment å bety at mikroben er påvirkelig om midlet kan gis i større doser enn vanlig eller om midlet konsentreres i infeksjonsfokus. Noen ganger vil kategorien "I" bety at resultatet av resistensbestemmelsen er vanskelig å tolke (indeterminate).

I Norge har vi to ulike måter å angi følsomhetskategori på; SIR og 1-4 systemet. Forskjellen mellom disse to måtene å angi følsomhet på er først og fremst knyttet til egne brytningspunkt for midler som konsentreres i urinen.

Etablering av gode brytningspunkt er viktig og kan være vanskelig. Det er 4 ulike modeller for å etablere slike brytningspunkt. De vektlegges noe ulikt i de forskjellige land og sammen med ulike terapitradisjoner har det ført til noe forskjellig valg av brytningspunkt i de forskjellige landene.

Tabell 1. Metoder for å etablere brytningspunkt ved resistensbestemmelse

1. Populasjonsbasert (histogram-analyser over MIC og mm hemningszone)
2. Resistensmekanismer (fenotypisk eller genotypisk påvist)
3. Farmakokinetikk/-dynamikk
4. Bakteriologisk eller klinisk respons

Ad 1. *Populasjonsbasert analyse* over mikrobers følsomhet er særlig egnet om det er bimodal fordeling av følsomhet og hvor følsom og resistent populasjon skilles godt. Metoden krever i tillegg en god diskriminering mellom følsomme og resistente mikrober. Metoden er mindre godt egnet om det er en unimodal fordeling av mikrobenes følsomhet.

Populasjonsbaserte studier vil også være nyttig for å justere brytningspunkt slik at feil-kategorisering minimaliseres. Slik minimalisering av feil gjøres gjennom såkalt ”error rate bound method” og det viktigste her er å redusere forekomsten av svært alvorlige feil (Very Major Errors) hvor en mikrobe klassifiseres som følsom når den er resistent mot midlet. Alvorlige feil (Major Errors) hvor mikroben klassifiseres som resistent når den egentlig er følsom ønsker en også å unngå, men den praktiske konsekvens for pasienten er mindre alvorlig. Små feil (Minor Errors) betyr at en mikrobe klassifiseres som følsom eller resistent når den er intermediært følsom eller som intermediært følsom når den er følsom eller resistent.

Ad 2. *Resistensmekanismer* er godt egnet til å skille populasjonen når forekomst av en slik mekanisme samsvarer med sviktende bakteriologisk eller klinisk respons. Dette er tilfellet for stafylokokker med beta-laktamaseproduksjon og manglende klinisk effekt av penicillin. Tilsvarende gjelder for MRSA og effekten av penicillinase-stabile penicilliner. Sammenhengen mellom resistens og klinisk effekt er ikke like klar når det gjelder induserbar beta-laktamase hos enkelte Gram-negative stavbakterier og 3. generasjons cefalosporiner.

Ad 3. Brytningspunkt kan i tillegg være basert på kunnskap om midlers *farmakokinetikk/-dynamikk* (PK/PD). Her kan man enten ved matematiske modeller beregne brytningspunkt eller ved eksperimentelt å studere mikrobenes og antibiotikas skjebne i vevet bestemme brytningspunkt ut fra dette. PK/PD er det nærmeste vi kommer til direkte studier av klinisk effekt. Slike studier har dog en tendens til å overestimere antibiotikas effekt og plassere brytningspunkt for følsomme og resistente mikrober svært nær hverandre. Dersom brytningspunktet ligger nær opp til en populasjonstopp vil man av metodologiske årsaker lett feil-klassifisere mikrobens følsomhet og slike feil vil da enten være av typen Very Major Errors eller Major errors.

Ad 4. *Kliniske studier* er ofte betraktet som ”proof of the pudding”, og slike data blir viktigere i fremtiden. Dog er det mange faktorer i tillegg til antibiotika som påvirker utfallet av en behandling for en infeksjonssykdom. I noen tilfeller vil bakteriologisk eradikering være et bedre estimat.

Brytningspunkt må etableres på bakgrunn av kunnskap både om mikrobene, antibiotika og om pasienten. Brytningspunkt må derfor baseres på en kombinasjon av alle de 4 forannevnte metoder.

Resistensbestemmelse av stafylokokker.

For pålitelig resistensbestemmelse av *S. aureus* anbefaler Arbeidsgruppen for antibiotikaspørsmål (AFA) at det brukes flere metoder. Metodene er pt. under revidering og AFA vil komme med oppdaterte anbefalinger høsten 2001.

- Følsomhet for penicillin bestemmes med test for beta-laktamase (kløverblad, acidometrisk agar eller nitrocefin).
- Følsomhet for penicillinastabile penicilliner bestemmes ved særskilt metode (Mueller Hinton agar med 4% NaCl og høyt inokulum som inkuberes i 24 t; agardiffusjon og 1 µg oxacillin, agar-screen med 0 og 4 mg oxacillin/l, evt. også 1 mg, eller oxacillin E-test). Se egen omtale av slike metoder. Eventuelle funn av resistens må verifiseres ved påvisning av *mecA*-genet.
- Følsomhet for andre midler som makrolider, klindamycin, fucidin og gentamicin kan undersøkes med vanlig agardiffusjon. Merk at agardiffusjon ikke er egnet til påvisning av følsomhet for glykopeptidantibiotika (vankomycin og teikoplanin).
- Standard resistensbestemmelse av stafylokokker bør inkludere følgende antibiotika: Penicillin G (beta-laktamasetest), oxacillin (med spesifikk metode), makrolid (erytromycin), linkosamin (klindamycin) og muligens fucidin (dog er tolkning av resultatet vanskelig ved lokal applikasjon).
- Utvidet resistensbestemmelse er bare aktuelt ved multiresistens eller ved spesielle kliniske problemstillinger og bør omfatte følgende antibiotika: aminoglykosid (gentamicin), vankomycin (ev. også teikoplanin), trimetoprim-sulfamethoxazol og ved noen kliniske tilstander også rifampicin (f. eks. endocarditt, intracerebral infeksjon).

Kvalitetskontroll av resistensbestemmelse

Metoden for resistensbestemmelse må være standardisert og kvalitetskontrollert. Som ved alle andre analyser er det viktig å kontrollere at ens metode virkelig holder mål. Dette medfører at:

- Mediene må kontrolleres før de tas i bruk (pH, agar-tykkelse, mengde divalente kationer samt forekomst av tymidin) gjennom fysikalsk kjemiske og biologiske undersøkelser.
- Metoden må kontrolleres under bruk slik at en kan dokumentere at en har god nøyaktighet og presisjon ved gjentatte analyser av referansestammer.
- Man må også kontrollere at ens metode påviser bestemte resistensmekanismer for et utvalg mikrober (beta-laktamase, MRSA).
- Sist, men ikke minst må en også vise at metoden holder mål når en undersøker kliniske isolat ved å gjøre populasjonsbaserte studier.

AFA har derfor utarbeidet en metode for *Kvalitetskontroll av resistensbestemmelser for aerobe, hurtigvoksende bakterier med agardiffusjon*. Dette dokumentet er snart ferdig og vil bli sendt til alle laboratorier.

Tabell 2. Resistensbestemmelse av *Staphylococcus aureus* - Hva sier AFA?

Antibiotika	Test	Kommentar
Penicillin	Beta-laktamase	Positivt resultat betyr resistens mot alle penicillinasefølsomme penicilliner uavhengig av MIC eller sonestørrelse
Oxacillin	MRSA-screening	Brytningspunkt 4 mg/l Diffusjon 1 µg lapp E-test Verifiser med genteknologisk test
Vankomycin	Agarscreen? E-test?	Diffusjonsmetode upålitelig
Andre antibiotika	Agardiffusjon	Makrolider, linkosaminer, fucidin, gentamicin
Kvalitetskontroll		AFA's dokument.

Referanse: AFA-rapport 1994. Scand J Infect Dis 1997, Supplementum 103 med senere oppdateringer

Merk: AFA har metoden for påvisning av meticillinresistens under revisjon og håper å ha ferdig revidert metode i løpet av høsten 2001. Se eget innlegg kap.4.

Tabell 3. Valg av grupperepresentant ved resistensbestemmelse

Test drug	Mikrobe	Resultat representativ for andre midler
Oxacillin (resistens)	Stafylokokker	Alle penicilliner inklusive antistafylokokkpenicilliner, alle cefalosporiner, alle kombinasjoner av beta-laktam/betalaktamaseinhibitor, alle karbapenemer
Tetracyklin	Alle (unntatt stafylokokker og Acinetobacter)	Doxycyklin, minocyklin, klortetracyklin, demeclocyklin, oxytetracyklin, metacyklin
Erytromycin	Gram-positive kokker	Roxitromycin, Klaritromycin, Azitromycin, Diritromycin
Klindamycin	Alle	Linkomycin
Ampicillin	Enterokokker	Penicillin
Penicillin G	Stafylokokker, gonokokker	PenicillinV, ampicillin, amoxicillin, carbenicillin, mezlocillin, azlocillin, ticarcillin, piperacillin
Cefalotin	Enterobakterier	Cafpirin, cefradin, cefalexin, cefaklor og cefadroxil, men ikke andre cefalosporiner
Ampicillin	Alle	Amoxicillin
Sulfisoxazol	Alle	Alle sulfonamider
Nalidixansyre (følsomme isolater)	Enterobakterier	Alle kinoloner inklusive fluorokinoloner
Cefalotin eller cefazolin (følsomme isolater)	Enterobakterier	Alle cefalosporiner
Vankomycin (følsomme isolater)	Alle	Teikoplanin

4. METODER FOR PÅVISNING AV METHICILLIN-RESISTENS HOS *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

Lars Bevanger, Avdeling for mikrobiologi, Regionsykehuset i Trondheim, 7006 Trondheim

I. Fenotypiske metoder:

Agardiffusjon (AFA-rapport 1994).

Inokulum McFarland 0,5 i 0,9% NaCl eller Mueller Hinton buljong

1. Mueller-Hinton agar (MHA) eller PDM med 4% NaCl
2. Oxacillin lapp/tablett 1 µg
3. Inkuberes 24 timer ved 35 °C
4. Enkeltkolonier eller svak teppevekst inne i hemningszone indikerer methicillinresistens

Resultatet må verifiseres med annen metodikk

Oxacillin screen skål. (AFA-rapport 1994).

Inokulum McFarland 0,5 i 0,9% NaCl eller Mueller Hinton buljong

1. MHA med 4 % NaCl med hhv 1 og 4 mg/l oxacillin
2. "Spot" inokulum eller rikelig utsæd med øse eller pensel.
3. Inkuberes 24 timer ved 35 °C
4. Vekst på skål med 4 mg/l indikerer methicillinresistens
5. Vekst kun på skål med 1 mg/l indikerer intermediær følsomhet.

NCCLS (1) anbefaler MHA med 6 mg/l oxacillin eller 10 mg/l methicillin, for øvrig identisk. Vekst indikerer resistens. Spesifisiteten i NCCLS varianten av screen skål var 100%, mens sensitiviteten var 93,6%, 17 av 267 *mecA* positive stammer vokste ikke (2). Forutsetning er ≤ 1 uke gamle skåler.

E-test. (AFA-rapport 1994).

Inokulum McFarland 0,5 i 0,9% NaCl eller Mueller Hinton buljong

1. MHA med 4 % NaCl
2. Tett utsæd med pensel
3. Inkuberes 24 timer ved 35 °C
4. MIC ≥ 4 mg/l rapporteres som resistent.
5. MIC mellom 1 og 4 mg/l rapporteres som intermediær følsom

Produsentens anbefaling: Inokulum 0,5-1 McFarland, MHA med 2 % NaCl.

Andre:

Påvisning av endret PBP2a (PBP2') ved hjelp av latex agglutinasjonstester (Denka Seiken; Oxoid). Test for MRSA fra isolerte *S. aureus* kolonier. (Se eget innlegg).

BBL Crystal MRSA ID.

Påvisning av MRSA fra renkultur av *S. aureus*.

Prinsipp: 3 plastbrønner med fluorescerende indikator (tris 4,7-diphenyl-1,10-phenanthroline-ruthenium chloride pentahydrate) som er oksygen sensitiv. Ved bakterievekst (aktiv metabolisme) forbrukes oksygen slik at indikatoren fluorescerer (positiv kontroll).

Manglende metabolisme, dvs ingen vekst, gir ingen fluorescens (negativ kontroll). Brønn 1 (pos. kontroll) inneholder kun indikator. Brønn 2 (test brønn) inneholder i tillegg oxacillin 4 µg/ml. Brønn 3 (negativ kontroll) inneholder vancomycin 16 µg/ml.

S. aureus kolonier fra trypticase soy agar med 5% saueblod slemmes opp i buljong til 0,5 McFarland. Brønnene inokuleres, inkuberes i 4 timer og avleses i UV-lys (365 nm). MRSA vil vokse i testbrønn med oxacillin og gi fluorescens.

I en europeisk multisenter undersøkelse viste testen en sensitivitet på 93% (158 av 170 *mecA* gen-positive korrekt identifisert) og en spesifisitet på over 99% (3).

Ved å reinkubere isolater som er negative etter 4 timer i ytterligere 2 timer kan sensitiviteten økes noe (4)

Fordelene ved testen er hurtighet (4-6 timer), ulemper er spesialagar for dyrkning og en del falske negative der stammene har lav MIC verdi (4-12 mg/l) samt falske positive borderline resistente stammer (BORSA) (5).

II. Genotypiske metoder

PCR

Referansemetode for å klassifisere *S. aureus* som methicillinresistent.

Bruk av multiplex PCR for samtidig deteksjon av gener for methicillinresistens (*mecA*) og termostabil nuklease (*nuc*) er gunstig (6) Skiller mellom *S. aureus* og termonuklease negative stafylokokker. Testen er rask, svar i underkant av 3 timer etter at stammen foreligger som renkultur på skål ved konvensjonell PCR, eller én time ved real-time PCR (17).

Evigene MRSA detection kit (Statens seruminstitut, København).

Test for MRSA fra renkultur av *S. aureus*.

Prinsipp: Hybridiseringstest for påvisning av *mecA* gen og *nuc* gen. Fire plastbrønner er coatet med relevante capture prober. Brønn 1 er en positiv kontroll som viser at bakterien er lysert slik at DNA er tilstede i prøvematerialet. Brønnen er coated med capture probe for et stafylokokk 16S rRNA gen. Brønn 2 er negativ kontroll. Brønn 3 og 4 er coatet med capture prober for hhv *mecA* og *nuc* gen. Renkultur av stafylokokk stammen dyrkes på Colombia agar med 5% hesteblood. Etter lysing av bakteriene (ca 1 time) tilsettes en mikstur av biotinylerede DNA deteksjonsprober (16S rRNA, *mecA* og *nuc*) og løsningen overføres til brønnene.

Capture probe-target DNA- deteksjons probe komplekser dannes og detekteres med enzymmerket anti-biotin og tilhørende substrat (7).

Fordeler: Rask- 3,5 timer. Skiller mellom *S. aureus* (*mec* positiv) og termostabil nuclease negative stafylokokker.

Ulemper: Spesialagar for dyrkning. Pris?

Velogene rapid MRSA identification assay (ID Biomedical Corp., Vancouver)

Basert på ”cycling probe technology” for deteksjon av *mecA* gen. Finnes som en EIA utgave (brønner) med resultat etter 2 timer, og som Strip test etter 1,5 timer. Prinsipp: Etter lysing av en renkultur av stafylokokker i buffer (54°C /20 min) og denaturering (96°C/5 min), tilsettes prøven ”cycling reagent” og settes i varmeblokk ved 54°C i 25 min. ”Cycling reagent” består av en fluorescein-DNA-RNA-DNA-biotin probe og RNase H som kan spalte proben når denne er bundet til target DNA (*mecA* gen). De spaltete, små probefragmentene (fluorescein-DNA og DNA-biotin) dissosierer vekk fra target DNA og frigjør således target for videre ”cycling”. I motsetning til spaltet probe, vil intakt probe bindes til streptavidin som er coatet i plastbrønningen samt anti-fluorescein-enzym-kompleks (EIA), eller til immobilisert linje av streptavidin samt anti-fluorescein-gullpartikler (Strip test). I EIA testen vil fargereaksjon med substrat-, i Strip testen positiv test-linje indikere intakt probe, dvs negativ test mht *mecA*.

Testen er funnet å ha en god sensitivitet ($\geq 98\%$) og spesifisitet (97,5-100%) sammenlignet med *mecA* PCR (5,8,9,18).

Hva kan anbefales brukt som rutinemetode?

Det er vist at man ved å bruke NCCLS oxacillin screen agar (1) ikke vil påvise alle MRSA, men testen er likevel en av de mest pålitelige fenotypiske screeningtester for MRSA. I en undersøkelse var sensitiviteten 93,6%, (17 av 267 stammer vokste ikke) (2), andre tilsvarende store undersøkelser som bekrefter denne har jeg ikke funnet. Det er rimelig å anta at det er klasse 1 heteroresistente stammer som ikke ble fanget opp, men populasjonsanalyser (10) av de aktuelle stammene ble ikke utført. Den følgende anbefalte modifikasjon av oxacillin screen agar er ikke endelig evaluert, men modifikasjonen bør være mer sensitiv enn NCCLS. Dette kan gå utover spesifisiteten, men vi har ikke registrert det som noe problem når holdbarheten på skålene settes til 7 dager. Modifikasjonen består i lavere oxacillinkonsentrasjon og et mer standardisert inokulum, tilsvarende 10 mikroliter fra en bakterie-opslemming med tetthet 2.0 McFarland. Anbefalingen må likevel sees på som midlertidig inntil flere data foreligger.

Anbefaling:

- **Rutine-screening av *S. aureus* isolater:**

Oxacillin-screen skål med 4% NaCl og oxacillin 4 mg/l. Inokulum fra kolonier oppslemmet i fysiologisk saltvann til 2.0 McFarland, som 10 µl spot ($\sim 1 \times 10^7$ cfu) på skåla. Inkuberes ved 35°C i 24 timer.

- **”Overveiende sannsynlig MRSA”:** BBL Crystal, Velogene, Evigene

- **Verifikasjon av MRSA:** *mecA* påvisning ved PCR

Selektive skåler for screeningundersøkelser

MRSA har vært forsøkt inndelt i fire klasser med henblikk på fenotypisk ekspresjon av methicillinresistens ut fra populasjonsanalyser. Slike analyser har vært utført ved å dyrke den opprinnelige stammen i buljong for deretter å gjøre kvantitative subkulturer på agarskåler med ulikt innhold av methicillin (f.eks. fra 0,5 til 800 mg/l) (10)

Klasse 4 stammer er slike som er relativt homogent høygradig resistente og der MIC for methicillin er ≥ 800 . De er vanligvis enkle å detektere både i kliniske prøver og som bærerstammer.

Klasse 1, 2 og 3 stammer er heteroresistente og består av to eller flere subpopulasjoner som forekommer i ulike mengder med ulik MIC verdier. Populasjon med lavest MIC er vanligvis dominerende og utgjør 99-99,99%.

Klasse 1 stammer domineres av en populasjon med MIC 1,5-3,0 mg/l og der kun en minoritet, $10^{-8} - 10^{-7}$, har en MIC på 50-100 mg/l. I klasse 2 stammer dominerer en populasjon med MIC 6-12 mg/l mens en mindre del, $10^{-5} - 10^{-4}$, har MIC verdier på 50- 200 mg/l. Klasse 3 stammer har MIC på 50-200 mg/l med en annen populasjon, 10^{-3} - 10^{-2} , med MIC 300-400 mg/l. Det har vist seg at disse egenskapene er stabile undersøkt ved gjentatte subkulturer av stammene.

Klasse 1 heteroresistente stammer med en MIC som kun ligger marginalt høyere enn methicillin-sensitive *S. aureus* representerer en utfordring for laboratoriene. For å detektere flest mulige og på kortest mulig tid kreves en optimalisert metodikk.

Det er en almen oppfatning at ved kliniske *S. aureus* infeksjoner er det relativt enkelt å detektere MRSA. En viktig årsak er at pasientene får betalactam-antibiotika slik at den høygradige resistente populasjonen blir selektert. Ved bærertilstand i nese og på hud foreligger vanligvis ikke noe seleksjonstrykk og hos klasse 1 og 2 bakterier vil den høygradig resistente populasjonen kunne være særdeles vanskelig å påvise.

Mannitolsaltagar (MSA)

Ved screeningundersøkelser er det vanlig å bruke en MSA gjort selektiv med oxacillin/methicillin. Kommersiell MSA inneholder 7,5% NaCl og ble opprinnelig utviklet for bruk i næringsmiddelkontroll. Med tilsetning av 4-6 mg/l oxacillin eller methicillin er den blitt tatt i bruk til screening med henblikk på MRSA, som eneste skål eller supplert med et ikke-selektivt agarmedium f.eks. blodagar.

Ulemper: Selv om stafylokker er salt-torerante vokser de langsomt på denne skålen og inntil 3 døgns inkubering ved 35°C anbefales. *S. aureus* identifiseres på grunnlag av mannitolspalting (presumptivt) og koagulasereaksjon (4-18 timer).

På ikke-selektiv skål vokser stafylokkene raskere og hurtigtester kan benyttes i stedet for konvensjonell koagulasetest. Det foreligger imidlertid en risiko for å overse heteroresistene MRSA kloner pga manglende selektivt press på populasjonen som ”drukner” i den sensitive populasjonen (13, 16).

Høy saltkonsentrasjonen i MSA hindrer vekst av bl.a. Gram-negative tarmbakterier, men kan også hindre vekst av MRSA. NaCl konsentrasjoner $\geq 5\%$ kan virke inhibitorisk på enkelte MRSA stammer (11). Ved lavere saltkonsentrasjoner oppstår problemer med vekst av andre uønskete bakterier, særlig Gram-negative staver. Økt selektivitet kan oppnås med tilsetning av f. eks Polymyxin (12, 13) eller Aztreonam (14).

Ved bruk av et rikt basismedium, senkning av NaCl konsentrasjonen til 2,5%, Aztreonam 8mg/l og Methicillin 4 mg/l var kolonier synlige allerede etter 20 timer for videre testing (14).

Mannitolsaltbuljong

Dyrkning i $\geq 6\%$ NaCl buljong i 24 timer med subkultur til selektive agarmedier har vært anbefalt for å øke sensitiviteten for MRSA påvisning. Signifikant flere isolater ble funnet ved subkultur til selektive agarmedier fra buljong enn ved direkte utsæd til selektive agarmedier (15). Bruk av andre antibiotika enn oxacillin/methicillin som selektivt prinsipp (f. eks. ciprofloxacin) har også vist seg å fungere svært godt i epidemiske situasjoner med kjent stamme og resistensmønster (15).

Anbefaling:

Undersøkelser med sikte på optimalisering av medier for MRSA screening – økt sensitivitet/reduksjon av tid for påvisning bør foretas.

Tidsaspekt og sensitivitet er viktige i denne sammenheng.

Som primære isolasjonsmedier for screeningundersøkelser, anbefales inntil flere undersøkelser forligger, følgende:

Redusere tid for påvisning:

Mannitolsaltagar med 2,5% NaCl konsentrasjon, aztreonam 8 mg/l (event. Polymyxin) og oxacillin eller methicillin 4-6 mg/l. Inkubere i 24 (eventuelt 48) timer ved 35°C.

Øke sensitivitet:

I tillegg Mannitolsaltbuljong (6-7,5% NaCl) i 24 timer med subkultur til selektivt agarmedium.

Referanser

1. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Ninth Informational Supplement, M100-S9, NCCLS 1999; Vol. 19 No. 1
2. van Griethuysen A, Pouw M, van Leeuwen N, Heck M, Willemse P, Buiting A, Kluytmans J. Rapid slide latex agglutination test for detection of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol, 1999; 37: 2789-2792.
3. Zambardi G, Fleurette J, Schito GC, Auckenthaler R, Bergogne-Berezin E, Hone R et al. European multicenter evaluation of a commercial system for identification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1996; 15: 747-749.
4. Knapp CC, Ludwig MD, Washington JA. Evaluation of BBL Crystal MRSA ID system. J Clin Microbiol 1994; 32:2588-2589.
5. Louie L, Matsumura SO, Choi E, Louie M, Simor AE. Evaluation of three rapid methods for detection of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol 2000; 38: 2170-2173.
6. Brakstad OG, Mæland JA, Tveten Y. Multiplex polymerase chain reaction for detection of genes for *Staphylococcus aureus* termonuclease and methicillin resistance and correlation with oxacillin resistance APMIS 1993; 101:681-688.
7. Skov RL, Pallesen RV, Poulsen RL, Espersen F. Evaluation of a new 3-h hybridization method for detecting the *mecA* gene in *Staphylococcus aureus* and comparison with existing genotypic and phenotypic susceptibility testing methods. J Antimicrob Chemotherapy 1999; 43: 467-475.
8. Hall GS, Tuohy M, Wilson D, Lankford R, Procop GW. Use of Velogene rapid MRSA identification assay with one-step detection to determine the presence of the *mecA* gene in *Staphylococcus aureus*. Poster C-324 ASM 100th general meeting, Los Angeles, May 2000.
9. Arbique J, Forward K, Haldane D, Hatchette T, Davidson RJ. Comparison of the Velogene rapid MRSA identification assay, Denka MRSA-screen assay, BBL crystal MRSA ID system, and PCR for rapid identification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Poster C-323 ASM 100th general meeting, Los Angeles, May 2000.
10. Tomasz A, Nachman S, Leaf, H. Stable classes of phenotypic expression in methicillin-resistant clinical isolates of staphylococci. Antimicrob Agents Chemother 1991; 35:124-129
11. Jones EM, Bowker KE, Cooke R, Marshall RJ, Reeves, DS, MacGowan AP. Salt tolerance of EMRSA-16 and its effect on sensitivity of screening cultures. J Hosp Infect 1997; 35: 59-62.
12. Ferguson TH. Evaluation of a screening medium for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Br. J Biomed Sci 1998; 55: 207-208.
13. Van Enk RA, Thompson, KD. Use of a primary medium for recovery of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol 1992; 30: 504-505.
14. Perry PL, Coombs, GW, Boehm JD, Pearman, JW. A rapid (20h) solid screening medium for detecting methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J Hosp Infect 1998; 40: 67-72.
15. Davies S, Zadik, PM. Comparison of methods for the isolation of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. J Clin Pathol 1997; 50: 257-258.
16. Falcão MHL, Texeira LA, Ferreira-Carvalho BT, Borges-Neto AA, Figueiredo, AMS. Occurrence of methicillin-resistant and –susceptible *Staphylococcus aureus* within a single colony contributing to MRSA mis-identification. J Med Microbiol 1999; 48: 515-521.
17. Reischl U, Linde H-J, Metz M, Leppmeier B, Lehn N. Rapid identification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and simultaneous species confirmation using real-time fluorescence PCR. J Clin Microbiol 2000; 38: 2429-2433.
18. Fong WK, Modrusan Z, McNevin JP, Marostenmaki J, Zin, B, Bekkaoui F. Rapid solid-phase immunoassay for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* using cycling probe technology. J Clin Microbiol 2000; 38: 2525-2529.

5. METODER FOR PÅVISNING AV OXACILLIN (METHICILLIN) RESISTENS HOS KOAGULASE-NEGATIVE STAFYLOKOKKER

Lars Bevanger, Avdeling for mikrobiologi, Regionsykehuset i Trondheim, 7006 Trondheim

NCCLS har nylig fastlagt nye brytningspunkter for oxacillin for koagulase-negative stafylokokker (KNS). Bakterier med MIC $\geq 0,5$ mg/l er definert som resistente (tidligere ≥ 4 mg/l), bakterier med MIC $\leq 0,25$ mg/l er følsomme (tidligere ≤ 2 mg/l) (1). Standard agar screen skål (MH agar, 4% NaCl, 6 mg/l oxacillin) anbefales nå kun brukt for *S. aureus* (2). Korrelasjonen mellom *mecA* PCR og standard 4mg/l oxacillin screen skål har variert i ulike undersøkelser. Tenover et al (2) fant en sensitivitet på 62- og 81% for *MecA* positive *S. epidermidis* isolater (n=198) etter hhv 24- og 48 timer med største inokulum (våt pensel, spot inokulum, McFarland 0,5) og gunstigste kommersielle agar-medium. Resultatet for andre species var dårligere. York et al (3) fant derimot at 31 og 44 av totalt 44 *MecA* positive KNS vokste på standard screen skål etter hhv 24- og 48 timer.

De nye brytningspunktene har vært evaluert med agar fortynningsmetodikk som anbefalt av NCCLS: MH-oxacillin skål med 2% NaCl, oxacillin 0,5 mg/l, spot-inokulert med ca 10^4 cfu og avlest etter 24 timer (4). Alle *mecA* positive *S. epidermidis* stammene (n=164) vokste, men ingen av de *mecA* negative (n=101). Enkelte andre species uten *mecA* gen vokste på skål med 0,5 mg/l oxacillin. Dette var tilfelle for bl.a. *S. sarophyticus*, *S. warneri* og *S. lugdunensis*. Disse ble således registrert som "falskt resistente" ut fra de nye brytningspunktene. Andre har brukt MH agar med 4% NaCl, 0,6 mg/l oxacillin og inokulering med pensel fra 0,5 McFarland og avlesning etter 48 timer (5). Testing av et begrenset antall *mecA* positive stammer (n=30) viste 100% sensitivitet.

Bruk av lapp-diffusjonstest med 1 μ g oxacillin har også vært evaluert (2). Det er foreslått følgende grenseverdier: ≤ 17 mm for resistens og ≥ 18 mm for følsomhet. Disse grenseverdiene vil klassifisere nesten 100% av *mecA* positive KNS korrekt, men mange isolater, spesielt *S. saprophyticus* og *S. lugdunensis* vil klassifiseres som resistente uten å ha *mecA* genet (2).

Flere variable influerer på utfallet av oxacillin screen skål. En av de viktigste er inokulumstørrelse. Færre enn 1 av 10^5 bakterier kan være resistente i en populasjon. Det bør derfor appliseres minst 5×10^5 cfu på agaren. Det er foreløpig svært få undersøkelser som har et dokumentert stort nok inokulum. I arbeidet til Hussain et al (4) ble MIC bestemt med anbefalt agarfortynningsmetodikk med et inokulum på ca 10^4 cfu og avlesning etter 24 timer. Av 164 *mecA* positive *S. epidermidis* hadde 36 (22%) MIC ≤ 4 mg/l.

Ved bruk av Standard agarscreen skål (4% NaCl, 4 mg/l oxacillin) og spot inokulum (ca 10^6 cfu) fra 0,5 McFarland og inkubering i 48 timer, vil således trolig inntil 1 av 5 isolater bli rapportert falskt følsom. Dette er neppe akseptabelt.

Anbefaling.

Agarscreen skål- MH agar, 4% NaCl, 0,5 mg/l oxacillin. Spot inokulum (ca 10^6 cfu) fra oppslemning av kolonier i fysiologisk saltvann til 0,5 McFarland. Inkubere ved 35°C i 24 timer.

Referanser

1. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Ninth Informational Supplement, M100-S9, NCCLS 1999; Vol. 19 No. 1.
2. Tenover FC, Jones RN, Swenson JM, Zimmer B, McAllister S and Jorgensen JH for the NCCLS staphylococcus working group. Methods for improved detection of oxacillin resistance in coagulase-negative staphylococci: results of a multicenter study. J Clin Microbiol 1999; 37: 4051- 4058.
3. York MK, Gibbs L, Chehab F, Brooks GF. Comparison of PCR detection of *mecA* with standard susceptibility testing methods to determine methicillin resistance in coagulase-negative staphylococci. J Clin Microbiol 1996; 34: 249-253.
4. Hussain Z, Stoakes L, Massey V, Diagre D, Fitzgerald V, El Sayed S, Lannigan R. Correlation of oxacillin MIC with *mecA* gene carriage in coagulase-negative staphylococci. J Clin Microbiol 2000; 38: 752-754.
5. Kohner P, Uhl J, Kolbert C, Persing D, Cockerill III F. Comparison of susceptibility testing methods with *mecA* gene analysis for determining oxacillin (methicillin) resistance in clinical isolates of *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative *Staphylococcus* spp. J Clin Microbiol 1999; 37: 2952-2961.

6. BRUK AV AGGLUTINATIONSTESTER FÖR PÅVISNING AV METICILLINRESISTENS HOS STAFYLOKOKKER

Roland Jureen, Avd. for Mikrobiologi og Immunologi, Haukeland Sykehus

Inledning

Meticillin resistens hos stafylokocker betingas huvudsakligen av expression av ett låg affinitets penicillin bindande protein PBP2a, som kodas av den kromosomala genen *mecA*. Meticillin känsliga stafylokocker saknar denna gen och därför också detta penicillin bindande protein. Trots genetisk homogenitet i en bakteriepopulation kan fenotypiskt uttryck av meticillin resistens vara heterogent och svår att påvisa med traditionella metoder.

Genotypiska metoder som påvisar *mecA* är därför "guldstandard". Det är ofta önskligt med en snabbare och enklare påvisning av meticillin resistens. Sedan 1999 finnes en kommersiellt tillgängligt latex agglutinationstest för påvisning av PBP2a. Denna tillverkas av en japansk producent och distribueras av 2 leverandörer i Norge. Testen innehåller monoklonala antikroppar mot PBP2a. Den utföres på bakterie kolonier från blodskål.

En agglutinationstest som påvisar PBP2a ger inte samma diagnostiska säkerhet som metoder som direkt påvisar *mecA* genen. En orsak till detta är förkomsten av falska positiva och falska negativa resultat då närvaro av *mecA* genen används som "guldstandard" för att definiera MRSA.

Undersökelse utförd på Haukeland sykehus

I tiden från 1992 har vi uppbevarat 52 meticillin resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolat från pasienter fra Haukeland sykehus upptagningsområde och från Sogn og Fjordane. Dessa och 57 meticillin sensitive *Staphylococcus aureus* (MSSA) fra Haukeland sykehus från blododlingar under samma period blev analyserade med latex agglutinationstesten. Samtliga isolat ble också undersökt med PCR på *mecA*. Av 52 *mecA* positiva MRSA var 51 positiva i latex agglutinationstesten. Av 57 *mecA* negativa MSSA var 56 negativa i latex agglutinationstesten. Sensitivitet var 98% och spesifisitet var 98% jämfört med *mecA* PCR.

Publiserade studier med den i Norge tillgängliga latex agglutinationstesten.

Van Griethuysen *et al.* publicerade en undersökelse av 563 *S.aureus* isolat i 1999 (1). Materialet bestod av 296 MSSA och 267 MRSA (248 olika fagtyper). Av 267 *mecA* positiva MRSA var 263 positiva i latex agglutinationstesten. Alla MSSA var negativa i latex agglutinationstesten. Resultaten ger en sensitivitet på 98.5% och spesifisitet på 100%.

Van Leeuwen *et al.* publicerade sin undersökelse i 1999 (2). I denna ingick 90 MRSA isolat och 106 MSSA isolat. Av 90 *mecA* positiva MRSA var 87 positiva i latex agglutinationstesten. De tre isolat som var negativa såddes ut på nytt och man la på en 5µg methicillin lapp. När man efter inkubation tog kolonier från inhiberings zonen eller i randområdet blev dessa positiva i latex agglutinationstesten. Alla MSSA var negativa i latex agglutinationstesten.

Cavassini *et al.* publicerade en undersökelse i 1999 (3). Man inkluderade 80 MRSA (med 60 olika PFGE mönster) och 120 MSSA isolat. Undersökelsen utfördes blint. Latex agglutinationstesten hade en sensitivitet på 99% och en spesifisitet på 99.2% vilket var bättre

än oxacillin disk diffusions test och oxacillin salt agar screening test som utfördes parallellt enligt NCCLS rekommendationer.

Louie *et al.* publicerade en undersökelse i 2000 (5) där agglutinationstesten jämfördes med en cyklisk probe teknik baserad test och BBLcrystal . Agglutinationstesten var likvärdig med cyklisk probe tekniken och hade högre specificitet än BBLcrystal. Alla BORSA stammar som ingick (37 isolat) var negativa och testen uppvisade en sensitivitet på 97% och specificitet på 100%.

Hussain *et al.* publicerade en undersökelse på koagulas negativa stafylokocker 2000 (6). Totalt 251 *mecA* positiva och 212 *mecA* negativa isolat testades. Med induktion av PBP2a (blodskål med 1 mg oxacillin disk, bakterier togs från randzonen) fick man en sensitivitet på 99.5% och en specificitet på 99.5%. Utan induktion fick man en sensitivitet på 57.6% på 125 testade *mecA* positiva isolat.

Fördelar med latex agglutinationstest för påvisning av PBP2a.

Testen kan utföras snabbt och är klar på ca. 20 min. Detta är klart snabbare än traditionella metoder. Testen är enkel och kräver ingen speciell utbildning av laboratoriepersonal. Det behövs inget specialutstyr.

Nackdelar med latex agglutinationstest för påvisning av PBP2a.

Testen är inte 100% sensitiv eller specifik då den inte påvisar det genetiska fundamentet till meticillinresistens.

Sammanfattning

Den på den norska marknaden tillgängliga latex agglutinationstesten är sensitiv och specifik vid bruk på *S.aureus* isolat. Studier tyder på att den kan vara mer sensitiv och specifik än de konventionella metoder vi brukar i dag för att diagnostisera MRSA. På laboratorier där man inte har tillgång till genotypiska metoder bör denna test kunna användas i avvaktan på en sådan undersökelse. På dessa laboratorier bör man vid positiv reaktion sända isolatet till genotypisk undersökelse liksom vid negativ reaktion om man har stark misstanke om MRSA. De studier som foreligger har använt kolonier från blodinnehållande media utan tillsatt antibiotika och metodens prestanda på kolonier från andra medier är inte tillräckligt studerat. Testen bör således tillsvidare bara användas på kolonier från blodskål. Producenten rekommenderar inte testen för påvisning av meticillin resistens hos koagulas negativa stafylokocker och rapporter visar sensitivitetens och specificitetens problem (4). En intressant undersökelse visar dock på god prestanda på koagulase negativa stafylokocker om dessa först induceras med oxacillin. Flere studier på detta må dock utföras.

Referanser:

1. van Griethuysen A, Pouw M, vanLeeuwen N, Heck M, Willemsse P, Buiting A, Kluytmans J. Rapid slide latex agglutination test for detection of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol 1999; 37: 2789-92.
2. van Leeuwen W, vanPelt C, Luijendijk A, Verbrugh HA, Goessens WH. Rapid detection of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* isolates by the MRSA-screen latex agglutination test. J Clin Microbiol 1999; 37: 3029-30
3. Cavassini M, Wenger A, Jaton K, Blanc DS, Bille J. Evaluation of MRSA-screen, a simple anti-PBP 2a slide latex agglutination kit, for rapid detection of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol 1999; 37: 1591-94
4. Marriott DJE, Karagiannis T, Harkness JL, Kearney P. Further evaluation of the MRSA-screen kit for rapid detection of methicillin resistance. J Clin Microbiol 1999; 37: 3783-84
5. Louie L, Matsumura SO, Choi E, Louie M, Simor AE. Evaluation of three rapid methods for detection of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol 2000; 38:2170-73
6. Hussain Z, Stoakes L, Garrow S, Longo S, Fitzgerald V, Lannigan R. Rapid detection of *mecA*-positive and *mecA*-negative coagulase-negative staphylococci by an anti-penicillin binding protein 2a slide latex agglutination test. J Clin Microbiol 2000; 38: 2051-54

7. BORDERLINE RESISTANT *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* (BORSA)

Gaute Syversen, Mikrobiologisk avdeling, Ullevål sykehus, Oslo

Definisjon:

BORSA -stammer er fortsatt dårlig definert som gruppe, både med tanke på biologisk likhet, diagnostiske kriterier og klinisk betydning. Forvirringen gjenspeiles i de ulike begrepene som brukes om gruppen i litteraturen: “borderline susceptible”, “borderline resistant”, “low-level resistant”, “intermediate susceptible”, “acquired resistant”, “occult resistant”, “extrinsically resistant” og betalaktamase hyperprodusenter.

Borderline fenotype *Staphylococcus aureus* har felles at de fremviser redusert MIC verdi mot penicillinaseresistente penicilliner.

Flere studier knytter BORSA-stammer som viser hyperproduksjon av betalaktamase til faggruppe 5, 94/96 komplekset.

BORSA defineres som *mecA*-negative *S. aureus* med MIC oxacillin > 1,0 mg/l.

Bakgrunn:

Meticillin resistente *S. aureus* (MRSA), ble rapportert fra Storbritannia kort tid etter at medikamentet var blitt introdusert til klinisk bruk (Jevons, 1961). Det heterogene uttrykket av slik resistens ble også beskrevet kort tid etterpå (Rolinson, 1961; Chabbert *et al.*, 1965). Gruppen antistafylokokkmidler som meticillin og de seinere semisyntetiske isoxazolyl penicillinene, ble generelt kalt penicillinase-resistente penicilliner, i tradisjon med vanlig oppfatning at *S. aureus*- resistens mot denne gruppen er intrinsic, og at selv om de fleste MRSA stammer også produserer betalaktamase, så er dette ikke primært ansvarlig for deres resistens (Dyke, Jevons, Parker, 1966; Seligman, 1966). Først seinere påviste Thornsburry *et al* at resistensen kan være betalaktamasemediert (extrinsic) hos *S. aureus* stammer med nedsatt følsomhet overfor penicillinaseresistente penicilliner (McDougal and Thornsburry, 1986; Thornsburry, Culver and Hughes, 1986). De rapporterer at disse stammene (i) verken var heteroresistente eller multiresistente (ii) produserte store mengder betalaktamase som raskt hydrolyserte benzylpenicillin, men også delvis og langsomt hydrolyserte penicillinaseresistente penicilliner og kefalosporiner og (iii) ble fullt følsomme i nærvær av betalaktamaseinhibitorer. MIC reduksjon ved tillegg av clavulansyre eller sulbactam ble rapportert å være mer uttalt ved bruk av salt-holdig medium (Montanari *et al.*, 1990) Senere studier bekreftet non-intrinsic mekanisme ved at borderline *S.aureus* -stammer ikke produserer penicillinbindende protein PBP2a (Montanari *et al.*, 1990) og at de ikke hybridiserer med spesifikke prober for meticillinresistens (Chambers, Archer and Matsuhashi, 1989). Det er også beskrevet BORSA-stammer som viser ervervede modifikasjoner i de vanlige penicillinbindende proteinene med nedsatt penicillinbindende kapasitet som følge (Tomasz *et al*, 1989). Nylig er det påvist en ny betalaktamase hos BORSA-stammer. Denne meticillinase produseres i tillegg til den klassiske penicillinase og er beskrevet fra membranfraksjonen hos BORSA-stammer (Massidda *et al.*, 1996).

Langsom kinetikk av meticillinase's hydrolysering av penicillinaseresistente penicilliner passer med redusert følsomhet og ikke full resistens. Det genetiske substratet for denne meticillinase er ikke dokumentert, og resultatene er ikke reproduisert i andre studier.

I alt 4 forslag til mekanismer som kan forklare redusert meticillinfølsomhet er altså så langt beskrevet: (i) heteroresistens (liten fraksjon høygradig resistente MRSA (dvs. ikke BORSA etter vår definisjon), (ii) hyperproduksjon av betalaktamase, (iii) PBP med modifisert penicillinbindende kapasitet, (iiii) meticillinaseproduksjon.

Insidens:

Insidens av BORSA-stammer blant kliniske *S. aureus* isolater er ikke veldokumentert.

Liu *et al.* har rapportert insidens på 3% (1990), Massanari *et al.* 20% (1988) og Varaldo *et al.* 12.5% (1993).

Klinisk betydning:

Det finnes svært få studier på pasienter som belyser BORSA stammers kliniske betydning eller effekt/manglende effekt av penicillinaseresistente penicilliner ved infeksjoner.

BORSA-stamme assosiert med nosokomial infeksjon er beskrevet av McMurray (1991) En spørreundersøkelse blant medlemmer i *Canadian Hospital Epidemiology Committee* og *Canadian members of the Society for Healthcare Epidemiology of America* viste store forskjeller blant "infection control decision-makers" med henblikk på tilnærming, forholdsregler og behandling av pasienter infisert med BORSA (Miller 1995).

I en retrospektiv studie av humane BORSA-infeksjoner, ble det rapportert av Massnari (1988) at disse responderte godt på penicillinaseresistente penicilliner eller kefalosporiner. Det samme er rapportert fra kontrollerte dyreeksperimenter (Thauvin-Eliopoulos C 1990 og Chambers H.F. 1989). I en retrospektiv studie fra Ullevål sykehus (Gjeruldsen 1998) tyder resultatene på at konvensjonell behandling med betalaktamasestabile penicilliner ikke fører til behandlingssvikt, økt sykkelighet eller økt dødelighet. Imidlertid var materialet for lite til å kunne trekke endelige konklusjoner. Det er også påstått at den borderline meticillinfølsomme fenotype er et rent saltavhengig *in vitro* laboratoriefenomen med tvilsom klinisk relevans (Chambers H. F. 1997 og Petersson 1999)

Påvisning:

Se metoder for påvisning av meticillinresistens (kapittel 4).

Konklusjon:

BORSA defineres som *mecA negative S. aureus* med MIC oxacillin > 1,0 mg/l. Det finnes svært få studier på pasienter som belyser BORSA stammers kliniske betydning eller effekt/manglende effekt av penicillinaseresistente penicilliner ved infeksjoner. Insidens av BORSA-stammer blant kliniske *S. aureus* isolater er ikke veldokumentert. Det er ikke sikkert dokumentert terapissvikt med penicillinase stabile penicilliner ved behandling av infeksjoner med *mecA negative S. aureus* BORSA-stammer.

Regionslaboratoriene bør kunne påvise og samle BORSA-stammer med tanke på videre undersøkelser. Prospektive studier med tanke på prevalens, klinisk og terapeutisk betydning bør igangsettes.

Møtet kom ikke til enighet om ved hvilke MIC-verdier oxacillin bør rapporteres til klinikerne som følsom, intermediaer eller resistent. Her bør vi vel holde oss til de brytningspunkter som er etablert av AFA. Det ble antydnet at usikkerheten om den kliniske betydningen av BORSA kanskje bør holdes innad på laboratoriet, og at stammene rapporteres som følsomme under forutsetning av at stammen er undersøkt for *mecA*, eventuelt følsomhet for amoxicillin med og uten clavulansyre og eventuell PBP2a agglutinasjon. Eventuelt kan man ta forbehold overfor klinikerne ved MIC oxacillin >1mg/l ved å føre 2 (intermediært ømfintlig) i antibiogrammet samt kommentere at stafylokokk-stammen har nedsatt *in vitro* følsomhet for penicillinaseresistente penicilliner og at klinisk effekt av penicilliner og kefalosporiner er usikker.

Ved negativ PCR-test for *mecA*, kan det være aktuelt å teste stammen overfor amoxicillin med og uten clavulansyre, for å se om stammen er en hyperprodusent av betalakamase. Noen vil igjen hevde at det ikke får spesielle behandlingsmessige konsekvenser å skille disse BORSA-stammene fra de andre, og at det derfor er unødvendig å teste for dette rutinemessig.

Referanser:

1. Chambers H. F. Methicillin resistance in staphylococci: Molecular and biochemical basis and clinical implications. *Clin Microbiol Rev* (1997) 10, 781-791
2. Varaldo, P. E. The "borderline methicillin-susceptible" *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother* (1993) 31,1-8
3. Montanari, M. P. Borderline susceptibility to methicillin in *Staphylococcus aureus*: A new mechanism of resistance?. *Microbiol Drug Res* (1996) 2, 257-260
4. Nicola, F. *et al.* Comparison of several methods to determine methicillin-resistance in *Staphylococcus aureus* with focus on borderline strains. *Diag Microbiol Inf Dis* (2000) 36, 91-93
5. Tomasz, A. *et al.* New mechanism for methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*: Clinical isolates that lack the PBP 2a gene and contain normal penicillin-binding proteins with modified penicillin-binding capacity. *Antimicrob Agents Chemother* (1989) 33, 1869-1874
6. Massidda, O. *et al.* Borderline methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* strains have more in common than reduced susceptibility to penicillinase-resistant penicillins. *Antimicrob Agents Chemother* (1996) 40, 2769-2774
7. Montanari, M. P. *et al.* Further characterization of borderline methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and analysis of penicillin-binding proteins. *Antimicrob Agents Chemother* (1990) 34, 911-913
8. Binardi, N. *et al.* Detection of *mecA* gene and phenotypic detection of resistance in *Staphylococcus aureus* isolates with borderline or low-level methicillin resistance. *J Antimicrob Chemother* (1996) 37, 53-63
9. Miller, M. A. *et al.* Attitudes and beliefs of Canadian infection control decision-makers towards "borderline" methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Can J Infect Control* (1995) 10, 114-116.

10. Resende C. A., Figueiredo, A. M. S. Discrimination of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from borderline-resistant and susceptible isolates by different methods. J Med. Microbiol (1997) 46, 145-149
11. Petersson A. C. *et al.* Disk with high oxacillin content discriminates between methicillin-resistant and borderline methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* strains in disk diffusion assays using a low salt concentration. J Clin Microbiol. (1999) 37, 2047-2050
12. Gjeruldsen S. *et al.* Gule stafylokokker med nedsatt meticillinfølsomhet. Tidsskr Nor Lægeforen (1998) 118: 4065-4067

8. NEDSATT FØLSOMHET FOR GLYKOPEPTID-ANTIBIOTIKA HOS STAFYLOKOKKER

Arnfinn Sundsfjord. Mikrobiologisk avdeling, Regionsykehuset og Universitetet i Tromsø

Bakgrunn

Glykopeptidantibiotika, teikoplanin og vankomycin, er effektive i behandlingen av alvorlige infeksjoner med multiresistente Gram-positive bakterier. Denne gruppen av antibiotika regnes for å være den siste effektive skansen i behandlingen av infeksjoner med flere slike bakterier. Representanter for nye antibiotika for eksempel Linezolid®, et oxazolidinone, er bakteriostatisk overfor stafylokokker og synes ikke å være et godt nok alternativ (Patel et al 2000). Den økende forekomsten av ervervet glykopeptidresistens hos slike bakterier er derfor urovekkende.

Kliniske koagulase negative stafylokokkisolater med nedsatt følsomhet for glykopeptidantibiotika ble første gang rapportert på siste halvdel av 1980-tallet (Wilson 1986, Schwalbe 1987,). Det første kliniske *Staphylococcus aureus* (SA) isolatet med nedsatt følsomhet ble rapportert i 1997 (Hiramatsu 1997). Dette japanske isolatet, *S. aureus* Mu50 med en vancomycin MIC på 8mg/l, er i dag en referansestamme i kvalitetskontrollen for påvisning av nedsatt følsomhet for glykopeptidantibiotika. Enkelte kliniske *S. aureus* isolater med tilsvarende fenotype har senere vært rapportert fra flere land (Hubert 1999). Disse stammene viser en stabil resistent fenotype som lar seg påvise med E-test og agarscreeningsteknikker gjennom flere passasjer *in vitro* uten antibiotikaseleksjon (Guerin 2000, Hubert 1999). Resistensmekanismen er ikke klarlagt, men en økt cellevegg syntese og fortykket cellevegg med påfølgende redusert absorpsjon av vankomycin, nye byggestener i peptidoglykanlaget med redusert affinitet for glykopeptider, nedsatt PBP4-produksjon har vært satt frem som mulige forklaringer for den nedsatte følsomheten (Sieradzki 1999). Overføring, stabilisering og uttrykk av vankomycinresistensgener fra enterokokker til *S. aureus* er påvist under eksperimentelle betingelser, men foreløpig ikke i kliniske isolater (Noble 1992).

Noen definisjoner

Arbeidsgruppen for antibiotikaspørsmål (AFA) har definert følgende brytningspunkter for følsomhet for både vankomycin og teikoplanin hos stafylokokker: sensitiv (S) $\leq 4 \mu\text{g/ml}$; resistent (R) $> 16 \mu\text{g/ml}$; intermediær (I) følsomhet mellom S og R. Dette er i overensstemmelse med flere andre lands brytningspunkter. Dog har NCCLS noe høyere brytningspunkter for teikoplanin sammenlignet med AFA. Terapisvikt med vankomycin er rapportert hos pasienter og i dyremodeller ved infeksjoner med *S. aureus* med vankomycin MIC $> 4 \text{ mg/l}$.

S. aureus stammer med intermediær følsomhet for glykopeptidantibiotika benevnes som GISA/VISA. Stammer med vankomycin MIC $> 16 \mu\text{g/ml}$ anses for å være resistente og benevnes GRSA/VRSA. Stammer kan også være heteroresistente (h-GRSA/VRSA). H-GRSA/VRSA kan sammenlignes med heteroresistente meticillin-resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA) stammer hvor resistens egenskapen bare uttrykkes hos en mindre andel av bakteriene ($< 10^{-6}$). Det er kontroversielt om hvorvidt slike isolater har noen klinisk betydning (Howe 1999), men terapivikt under pågående vankomycinbehandling har blitt

sannsynliggjort (Howe 1998). Faren kan derfor være til stede for at slike stammer kan gi opphav til homogent vankomycinresistente *S. aureus*. HVRSA-fenotypen er så langt bare påvist hos MRSA-isolater.

Når skal vi få mistanke om nedsatt følsomhet for glykopeptidantibiotika? (Hubert 1999, SFM 2000)

1. Isolater fra pasienter som står på langvarig behandling med glykopeptidantibiotika og som viser terapivikt.
2. Generelt ved meticillinresistente stafylokokker.
3. Nedsatt mm-hemningssone for teikoplanin eller vankomycin.
4. Avvikende hemningssoner for teikoplanin og vankomycin ved likt depot (> 3 mm forskjell).
5. Enkeltkolonier innenfor hemningssone.

Hvordan skal vi påvise nedsatt følsomhet for glykopeptidantibiotika?

Anbefalinger:

Vi antar at vi ikke har større problemer med nedsatt følsomhet for glykopeptidantibiotika i Norge i dag. Det er imidlertid ikke gjort systematiske undersøkelser som kan underbygge en slik påstand. Slike undersøkelser bør utføres.

Ved mistanke om nedsatt følsomhet mot glykopeptidantibiotika anbefales en agarscreen metode:

1. Mueller-Hinton med vankomycin 5mg/l og 10 mikroliter inokulat fra en McFarland 2.0 (ca. 1×10^8 /ml) bakterioppslemming (Huber 1999). Inkubering 48 timer ved 35-37°C.
2. Mueller-Hinton med teikoplanin 5mg/l og 10 mikroliter inokulat fra en McFarland 2.0 (ca. 5×10^8 /ml) bakterioppslemming (SFM 2000). Inkubering 48 timer ved 35-37°C. Man anbefaler her bruk av teikoplanin fordi man anser dette for å gi større sensitivitet.
3. Bruk av BHI-agar gir mindre reproduerbare resultater pga av variasjoner i medieinnhold (Huber 1999).
4. Det må benyttes kontrollstammer for å sikre kvaliteten i slike undersøkelser. Negativ kontroll *S. aureus* ATCC 29213, positiv kontroll *S. aureus* Mu50. Eventuelt andre kontrollstammer.

E-test kan også benyttes etter anbefalinger fra produsent. Per dato anbefales bruk av BHI agar med et 0.2 ml inokulat på McFarland 2.0. Inkubering 48 timer ved 35°C. Dette har en tendens til å gi høyere MIC verdier sammenlignet med agarfortynningsmetoden (Chesneau 2000). I presentasjonsmaterieell fra E-test produsenten er *S. aureus* Mu50 da også gitt en tentativ vankomycin MIC med E-test på 16-64 mg/l.

En annen kanskje vanligere forekommende type av nedsatt følsomhet for glykopeptidantibiotika er hetero-vancomycin-resistent *S. aureus* (hVRSA). Slike stammer viser en følsom fenotype med tradisjonelle metoder. Anbefalte metoder for påvisning av hVRSA

innebærer agarscreeningsteknikker med vankomycin (4-6 mg/ml), varierende inokulatmengde og påfølgende subkulturer av kolonier som viser stabilt forhøyede vancomycin MIC-verdier (Guerin 2000, Hubert 1999, Howe 1999). Slike populasjonsanalyser er kontroversielle, viser manglende reproducerbarhet og har vært anklaget for å selektere for resistens heller enn å påvise det (Howe 1999). Inntil man har fått en klarere forståelse av mekanismene bak vankomycinresistens hos *S. aureus* og mer pålitelige tester er etablert, vil det være vanskelig å vurdere de ulike grader av heteroresistens og den kliniske betydningen av dette fenomenet.

Referanser

1. Biavasco F, Vignaroli C, Varaldo PE. Glycopeptide resistance in coagulase-negative staphylococci. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2000;19:403-17.
2. Chesneau O, Morvan A, El Solh N. Retrospective screening for heterogeneous vancomycin resistance in diverse *Staphylococcus* clones disseminated in French hospitals. *J Antimicrob Chemother* 2000;45:887-90.
3. Guerin F, Buu-Hol A, Mainardi J-L, Kac G, Colardelle N, Vaupre S, Gutmann L, Podglajen. Outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to glycopeptides in a Parisian hospital. *J Clin Microbiol* 2000;38:2985-8.
4. Howe RA, Bowker KE, Walsh TR, Feest TG, MacGowan AP. Vancomycin resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet* 1998;351:602.
5. Howe RA, Wootton M, Walsh TR, Bennett PM, MacGowan AP. Expression and detection of hetero-vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrobial Chemother* 1999;44:675-8.
6. Hiramatsu K, Hanaki H, Ino T, Yabuta K, Oguri T, Tenover F. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. *J Antimicrob Chemother* 1997;40:135-6.
7. Hubert SK, Mohammed JM, Fridkin SK, Gaynes RP, McGowan JE, Tenover FC. Glycopeptide-intermediate *Staphylococcus aureus*: Evaluation of a novel screening method and results of a survey of selected US hospitals. *J Clin Microbiol* 1999;37:3590-3.
8. Noble WC et al. Co-transfer of vancomycin and other resistance genes from *Enterococcus faecalis* NCTC12201 to *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiology Letters* 1992;93:195-8.
9. Patel R, Piper KE, Rouse MS, Steckelberg JM. Linezolid therapy of *Staphylococcus aureus* experimental osteomyelitis. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44:3438-40.
10. Schwable RS, Stapelton JT, Gilligan PH. Emergence of vancomycin resistance in coagulase-negative staphylococci *N Engl J Med* 1987;316:927-31.
11. Sieradzki K, Roberts RB, Haber SW, Tomasz A. the development of vancomycin resistance in a patient with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *N Engl J Med* 1999;340:493-501.
12. Société Française de Microbiologie (SFM), Comité de l'antibiogramme. Détermination de l'activité *in vitro* des glycopeptides sur *Staphylococcus aureus* catégorisation clinique des souches suspectées d'être de sensibilité diminuée. September 2000.
13. Wilson APR, O'Hare MD, Fulmingham D, Grüneberg RN. Teicoplanin-resistant coagulase-negative staphylococci. *Lancet* (1986) ii:973.

9. DIAGNOSTIKK VED FREMMEDLEGE ME INFEKSJONER (SPESIELT PROTESER)

Eyvind Witsø, Seksjon for ortopediske infeksjoner og amputasjoner, Ortopedisk avdeling Regionsykehuset i Trondheim

Proteseinfeksjoner

For enkelthets skyld blir bare hofteproteseinfeksjoner omtalt.

I protesekirurgiens barndom (1960-årene) lå infeksjonshyppigheten på over 6%. Sir John Charnley (”far” til Charnleyprotesen) reduserte infeksjonshyppigheten til under 2% ved å bruke luftfilter på operasjonsstuene. I dag regnes det som akseptabelt dersom antall proteseinfeksjonene pr ”proteseliv” ikke overstiger 1%. De viktigste profylaktiske tiltak er fortsatt bruk av filtrert luft sammen med lokal og systemisk antibiotikaprofylakse. Den additive effekten av disse tre tiltakene er fortsatt ukjent. ”Hofteregisteret” i Bergen har vist at kombinasjonen lokal/systemisk antibiotikaprofylakse gir en redusert hyppighet av proteseløsninger; sannsynligvis som et uttrykk for en redusert infeksjonshyppighet.

Proteseinfeksjonene deles inn i tre forskjellige typer/stadier:

Type 1

Dette er den typiske postoperative infeksjon : 7 - 14 dager etter operasjonen får pasienten generelle infeksjonstegn med feber og stigende SR/CRP. Lokale funn er væsning fra operasjonssåret, erythem, ødem, o.s.v. Tidligere ble Type 1 infeksjoner klassifisert som infeksjoner som oppsto inntil 3 måneder etter operasjonen. I dag er tendensen å redusere intervallet til 4 – 6 uker. Den vanligste mikrobe som gir opphav til Type 1 infeksjoner er *S aureus*. En årsak til manglende mikrobiologisk diagnostikk ved Type 1 infeksjoner er at disse pasientene ukritisk blir satt på antibiotika ved feberstigning postoperativt. Den korrekte behandling av Type 1 infeksjoner er radikal bløtvevsrevisjon med skifte av løse protese komponenter og innsending av vevsbiopsier til bakteriologiske undersøkelser. Om nødvendig må bløtvevsrevisjonen gjentas.

Type 2

Dette er den lavvirulente infeksjon som kan debutere klinisk 1- 2 år etter operasjonen. Den kliniske diagnosen kan være svært vanskelig og manglende feber og forhøyet SR/CRP utelukker ikke diagnosen. Scintigrafi gir som regel heller ikke diagnosen da undersøkelsen uansett vil være positiv minst et år etter primæroperasjonen. Leucocytsintigrafi kan brukes, men vi har ikke erfaring med bruk av denne undersøkelsen. I klassiske tilfeller kan vanlige røntgenundersøkelser vise tegn på osteomyelitt, men stort sett er det bare røntgenologisk løsningsstegn av protesen som gir mistanke om en lavvirulent infeksjon. Pasientens angivelse av smerter, både i hvile og ved belastning er kanskje det mest konstante symptom på en lavvirulent infeksjon. Den bakteriologiske diagnosen kan stilles ved leddpunksjon, men en må regne med falske negative svar i 30 – 40% av tilfellene. Behandlingen består i utskiftningsrevisjon; det vil si at protesen fjernes og ny protese settes inn. Det vanligste i dag er totrinnsrevisjon hvor en legger inn et intervall på 4 – 12 uker. Per-operativt ved første-trinns operasjon taes det minst 5 vevsbiopsier for bakteriologisk diagnose. Ved vanlig bakteriologisk undersøkelse må en regne med 10 – 30% falske negative svar. Det er gjort store anstrengelser for å bedre denne

diagnostikken ved å sikre seg representativt prøvemateriale. Mekanisk skrapping av implantatet som fjernes, eventuelt sonifisering kan gjøre det mulig å dyrke bakterier fra biofilm. Bruk av PCR har også redusert forekomsten av falske negative svar. Foreløpig har vi hatt begrenset nytte av disse teknikkene.

I noen tilfeller vil bakteriologisk undersøkelse vise at det er oppvekst av *S epidermidis* i for eksempel 3 av 5 biopsier. Genotyping kan da være med å avklare om det dreier seg om forurensing av prøvematerialet (hvis alle stammene er genotypisk ulike).

Uansett må det understrekes at korrekt bakteriologisk diagnose ved type 2 infeksjoner forutsetter en entusiastisk og korrekt behandling av prøvematerialet fra kirurgens side. Prøvene må behandles sterilt for å unngå forurensing. Prøvene må hurtigst mulig bli sendt til nærmeste mikrobiologisk avdeling og operasjonen bør planlegges slik at mikrobiologene kan behandle prøvene på dagtid. Det er obligatorisk at all form for antibiotikabehandling seponeres minst en uke før prøvetakning.

Type 3

Dette er den hematogene infeksjon som kan komme når som helst etter innesetting av en protese. Sykdomsdebuten er ofte akutt med smerter og feber. Forut for dette har pasienten eventuelt hatt cystitt, eysipelas, o.a. Diagnosen stilles ved leddpunksjon og falske negative svar er ikke et så stort problem her. Som regel må protesen fjernes, men dersom en er sikker på at protesen ikke er løs kan bløtvevsrevisjon forsøkes.

Referanser:

- Barrack RL, Harris WH. The value of aspiration of hip joint before revision total hip arthroplasty. *J Bone Joint Surg (Am)* 1993; 75(1): 66-76
- Kamme C, Lindberg L. Aerobic and anaerobic bacteria in deep infections after total hip arthroplasty. Differential diagnosis between infectious and non-infectious loosening. *Clin Orthop* 1981; 154: 201-207
- Lachiewicz PF, Rogers GD, Thomason HC. Aspiration of hip joint before revision total hip arthroplasty. *J Bone Joint Surg (Am)* 1996; 78(5): 749-754
- Merkel KD, Brown ML, Dewanjee MK, Fitzgerald RH. Comparison of Indium-labeled-leukocyte imaging with sequential Technetium-Gallium scanning in the diagnosis of low-grade musculoskeletal sepsis. *J Bone Joint Surg (Am)* 1985; 67(3): 465-476
- Powles JW, Spencer RF, Lovering AM. Gentamicin release from old cement during revision hip arthroplasty. *J Bone Joint Surg (Br)* 1998; 80 (4): 607-610
- Tunney MM, Patrick S, Curran MD, Ramage G, Hanna D, Nixon JR, Gorman SP, Davis RI, Anderson N. Detection of prosthetic hip infection at revision arthroplasty by immunofluorescence microscopy and PCR amplification of the bacterial 16S rRNA gene. *J Clin Microbiol* 1999; 3281-3290
- Zimmerli W. Prosthetic joint infection: Diagnosis and treatment. *Current Infectious Disease Reports* 2000; 2: 377-379.

10. KATETERASSOSIERTE INFEKSJONER

Tore Lier, Mikrobiol. avd., RiTØ.

Bruk av katetre i de store kar er en helt nødvendig del av den medisinske hverdag, men er også et infeksjonsproblem. Etter en kolonisering av kateteret kan pasienten utvikle en lokal infeksjon, hyppigst enten en infeksjon i innstikksted eller en tunnellinginfeksjon. Symptomene er de klassiske infeksjonstegn, med eller uten puss. Diagnostikken er som for en hudinfeksjon. Pasienten kan også utvikle en disseminert infeksjon, eventuelt med sepsis-symptomer. Disseminert infeksjon kan oppstå med eller uten tegn til lokal infeksjon. Vanligste agens er koagulase negative stafylokokker, fulgt av gule stafylokokker og gram negative staver.

Insidenstillene for kateterrelaterte infeksjoner varierer svært i litteraturen, avhengig av blant annet avdelingstype, katertype og hvordan man definerer infeksjonene. I litteraturen finner man at antall pasienter som vil utvikle en kateterrelatert infeksjon varierer fra 0,01-25% (!). National Nosocomial Infection Surveillance System i USA (1) rapporterte i perioden 1986-90 fra intensivavdelinger rater på kateterrelaterte bakteriemier som varierte mellom 2,1 (respiratorpasienter) til 30,2 (brannskadde) per 1000 døgn med sentrale katetre.

Det er ikke bred enighet i mange av de større spørsmålene vedrørende dette emnet. En av kontroversene er patogenesen bak koloniseringen av katetre med koagulase negative stafylokokker. Det er enighet om at bakteriene i hovedsak stammer fra pasientens egen hudflora eller fra hendene til helsepersonell. Hva som videre skjer er mer omstridt.

Hovedteoriene er at koloniseringen i det vesentligste skjer ved enten a) at bakterier rundt innstikksted vandrer langs utsiden av kateteret ut til spissen, eller at b) den utvendige koblingen på kateteret koloniseres og at stafylokokkene vandrer langs innsiden av kateteret. Hvilken av disse teoriene som er viktigst, har blant annet betydning for valg av metode for dyrking av kateterspiss.

Raad og kolleger (2) utførte elektronmikroskopi av totalt 75 nontunnellerte CVK og fant at biofilmdannelse og kolonisering var universell, både hos dyrkning negative og dyrkning positive (rulle- og/eller sonikeringsteknikk). Koloniseringen var dominerende på yttersiden hos kortids-CVK (<10 d.), men dominerende på innersiden hos langtids-CVK (>30 d.).

Det har vært skrevet mye om metodikk for dyrkning av kateterspisser. Resultatene er til dels ganske sprikende og ofte vanskelig sammenlignbare fordi studiepopulasjonene (inkl. insidens av kateterrelaterte infeksjoner), patogenese og definisjoner varierer mye. Ofte er positiv dyrkning av kateterspiss med i definisjonen av kateterrelatert bakteriemi, slik at man ikke kan angi sensitiviteten for metoden.

Den sannsynligvis mest utbredte metoden er den semikvantitative rulleteknikken, introdusert av Maki et al i 1977 (3). Man ruller kateterspissen fram og tilbake over en agarskål og teller kolonier. Tradisjonelt har man satt grensen for positiv test ved 15 kolonier, men flere forfattere foreslår cut-off på 5 kolonier. En prospektiv studie av Collignon et al (4) med 780 kateterspisser (cut-off 5 kolonier) ga sensitivitet 92%, spesifisitet 83%, positiv og negativ prediktiv verdi henholdsvis 8,8% og 99,8%. Insidensen av kateterrelaterte bakteriemier var 2%. Cut-off på 15 kolonier ga samme spesifisitet, men dårligere sensitivitet. "Gullstandard" var bakteremi (≥ 2 pos. blodkulturer) uten andre primære fokus enn kateteret, bedømt klinisk og radiologisk. Positiv kateterdyrking var ikke en del av kriteriene for å klassifisere infeksjonen som "sannsynlig kateterrelatert" (dette for å kunne regne ut sensitiviteten for rulleteknikk). Problemene med å få gode studier innen dette feltet illustreres ved at det i

denne gruppen med sannsynlig kateterrelatert infeksjon, ikke var en eneste koagulase negative stafylokokk. (!).

En fordel med denne metoden er at den er enkel å utføre. Det kan være en ulempe at kun yttersiden av spissen dyrkes.

En annen mye brukt teknikk er å plassere spissen i buljong, ofte kombinert med gjennomspyling av lumen, sonikering eller bruk av vortex. Det finnes lite prospektive studier på dette, men de fleste sammenlignende studier tyder på at sensitiviteten er bedre enn for rulleteknikken, men samtidig trolig lavere positiv prediktiv verdi. En kvantitativ variant av denne teknikken, hvor man sår ut en fortynningsrekke av buljongen, skal gi bedre spesifisitet, men er lite utbredt i rutinediagnostikk fordi den er ressurskrevende.

Kristinsson et al (5) har gjort en prospektiv studie med 209 kateterspisser, og hvor pasientene ble klassifisert ut i fra ikke nærmere angitte kliniske kriterier til sannsynligvis å ha en kateterrelatert infeksjon eller ikke. Sannsynlige infeksjoner utgjorde 47 pasienter (hvorav 14 innstikksted-inf. og 8 med sepsis). Kateterspissene ble dyrket med tre metoder: Rulleteknikk, gjennomspyling av lumen med 5 ml buljong og utsæd av 1 ml av denne og til slutt sonikering av spissen i buljong med utsæd av 1 ml av buljongen. Ideen med gjennomspyling skal være å selektivt dyrke innsiden av kateteret. Dyrkning ga bifasisk mønster med høy andel (90-95%) i gruppene ”ingen vekst” og ”>100 CFU”, og forfatterne anbefaler 100 CFU som cut-off på alle metodene p.g.a. bedre prediktiv verdi. I så fall ble positiv prediktiv verdi 56% og 71% for henholdsvis rulleteknikk og spyling av lumen. Cut-off på 15 CFU ga tilsvarende verdier på 46% og 66%. Negativ prediktiv verdi ble 96% for rulleteknikk og 93% for spyling med 100 CFU som grense og 99% og 94% ved 15 CFU. Sonikeringsteknikk ga ikke bedre resultater enn dette. I så godt som alle tilfellene med uttalt kolonisering, var det mye bakterier både på innvendig og utvendig overflate. Rulleteknikken ga flere tilfeller med lave CFU-tall, muligens som følge av forurensning ved fjerning av kateter.

Direktepåvisning ved gram- eller acridinfarging av kateterspissen, eller enklere av ”avtrykk” av spissen på et objektglass, har i øvede hender gitt høyere sensitivitet enn rulleteknikken, men igjen vil trolig spesifisiteten være et problem, spesielt i populasjoner med relativ lav prevalens av kateterrelaterte bakteriemier. Fordelen er at dette er hurtigdiagnostikk, men det gir selvfølgelig ingen resistensbestemmelse. Resistensbestemmelse er særlig viktig ved koagulase negative stafylokokker.

Det er også forsøkt å gjøre kvantitativ utsæd av blod henholdsvis tappet gjennom kateteret og blod tatt perifert. Et høyere CFU-tall i kateterblod enn i perifert blod skal sannsynliggjøre kateterinfeksjon. Ofte angir man en ratio > 10 for å regne det som positiv test. Fordelen med denne teknikken er at man utfører den uten å fjerne kateteret, og det kan i en del tilfeller være viktig. Metoden har til nå hatt liten utbredelse, og det er gjort få studier. Resultatene har vært varierende, sannsynligvis på grunn av forskjellig teknikk og ikke minst at det er anvendt forskjellig blodvolum.

Hvilken metode man benytter seg av, synes jeg i stor grad er en smakssak, så lenge man er oppmerksom på begrensningene i den metoden man benytter. Jeg har ikke kommet over studier som på en overbevisende måte viser at buljongteknikken er bedre enn rulleteknikken, eller vice versa. Hovedproblemet er heller det at ingen av de brukte metodene kan sies å være veldig gode når det gjelder å slå fast om en infeksjonstilstand er kateterrelatert. Særlig er den positive prediktive verdien dårlig, så man vil få mange falske positive svar. Blodkulturer vil kanskje være vel så viktig i diagnostikken. Klinikken har også en sentral plass, blant annet for å sannsynliggjøre andre fokus.

Referanser:

1. Pearson ML. Guideline for prevention of intravascular-device-related infections. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1996;17:438-73.
2. Raad I et al. Ultrastructural analysis of indwelling vascular catheters. *J Infect Dis* 1993;168:400-7.
3. Maki DG et al. A semiquantitative culture method for identifying intravenous-catheter-related infections. *N Eng J Med* 1977;296:1305-9.
4. Collignon PJ et al. Is semiquantitative culture of central vein catheter tips useful in the diagnosis of catheter-associated bacteremia? *J Clin Microbiol* 1986;24:532-5.
5. Kristinsson KG et al. Evaluation of three methods for culturing long intravascular catheters. *J Hosp Infect* 1989;14:183-91.

11. TYPING AV BAKTERIESTAMMER MOLEKYLÆR EPIDEMIOLOGI)

Kåre Bergh, Avd for mikrobiologi, Regionsykehuset i Trondheim/ NTNU, Trondheim

Momenter som må vurderes uavhengig av metodevalg:

- Typbarhet
- Reproduserbarhet
- Diskriminerende styrke
- Teknisk utførelse (vanskelighetsgrad, tid før svar)
- Tolkning: problemer, kriterier.
- Kostnader
- Behov for stor-skala analyser
- Behov for å generere referanse-samling / database

Prinsipielt to typingsmetoder; fenotypiske og genotypiske.

Fenotypiske metoder:

- Biotyping
- Antibigram
- Serotyping, Western blot
- Biocintyping
- Fagtyping
- Multilokus enzym elektroforese
- Plasmid-profil

Genotypiske metoder:

RFLP (Restriksjons-fragment lengde polymorfisme):

- REA: Restriksjon endonuklease analyse - "Fingerprinting"
- Makrorestriksjon endonuklease analyse ved PFGE : Pulsed-field Gel Electrophoresis
- Cleavase fragment LP (utført på enkelttrådet DNA)
- RFLP av lokus-spesifikke PCR-produkter

RFLP kombinert med PCR:

- AFLP : Amplified Fragment Length Polymorphism

RFLP kombinert med Southern blotting og hybridisering med prober:

ex: Ribotyping

PCR-baserte teknikker:

- RAPD: Randomly amplified polymorphic DNA
- Ribotyping
- Repetitive elementer (REP,ERIC, BOX)
- Lokus-spesifikk PCR (m/hybridisering eller real-time + smeltepunkt sammenligning)

DNA-sekvensering

Fenotypiske metoder vil generelt være for lite diskriminerende og med for lav reproduserbarhet til definitivt å kunne benyttes til å avgjøre om man står overfor et utbrudd av en epidemisk klon (5,6). Antibiogram som ofte benyttes, vil generelt være lite egnet. Dog vil det finnes situasjoner hvor spesielle resistensforhold (enkeltresultatet eller konstellasjoner) hos isolater kan gi mistanke om at det er en klonal opphopning, men dette bør bekreftes ved bruk av bedre metoder.

Fagtyping har som kjent tidligere vært benyttet i stor utstrekning på *Staphylococcus aureus* og vil for mange formål være en god metode. Hovedproblemet knyttet til fagtyping har vært at relativt mange stammer ikke er typbare, videre de spesielle problemer knyttet til teknisk utførelse (vedlikehold av fager, teknisk kompetanse osv). Dette har ledet til at fagtyping definitivt har tapt sin posisjon som referansemetode for karakterisering av stafylokokk-stammer og er erstattet av genotypiske metoder (1).

Av de fenotypiske metodene er sannsynligvis multilokus enzymelektroforese (MLEE) den som har høyest grad av reproduserbarhet og diskriminerende styrke. Jeg er ikke kjent med utstrakt bruk av MLEE for *S.aureus*, men i en publikasjon beskrives dette som godt diskriminerende (10). Kompleksiteten i teknisk utførelse gjør at MLEE neppe vil finne stor utbredelse i kliniske laboratorier og derfor at genotypiske metoder nok vil være å foretrekke.

Av de genotypiske metodene vil de PCR-baserte være enkle å utføre. Ribotyping basert på polymorfisme innen 16S-23S spacer regionen har vært en del benyttet for *S.aureus*. RAPD har mange tilhengere, men min erfaring er at metoden for mange bakteriespecies har problemer knyttet opp til dårlig reproduserbarhet. Rep-PCR er også brukbar (12), men dårligere enn PFGE. Genotyping ved real-time PCR og smeltepunktbestemmelse av amplikon er forventet å finne sin plass blant raske PCR-baserte metoder. Dette vil spesielt være aktuelt hvor man kjenner distinkte genetiske assosiasjoner med ”utbruddsbakterier”, f.eks resistensgener.

DNA sekvensering som epidemiologisk verktøy er ennå relativt lite benyttet for *S.aureus*, men det foreligger noen publikasjoner ved sekvensering av visse loci (proteinA genet, coagulase genet) til sammenligning med andre metoder (2,9). Begrensningene ligger i valg av gener som skal sekvenseres, disse må være egnede, dvs både ha konserverte og variable sekvenser. Idag benyttes oftest automatisert DNA sekvensering, utstyr som er meget kostbart i innkjøp. Problem knyttet til DNA sekvensering for bakterietyping er at informasjonen kan bli for detaljert uten at man nødvendigvis kan knytte påviste forskjeller sikkert opp mot epidemiologiske forbindelser (mens for virus er sekvensering ofte vurdert som gullstandard).

Av de genotypiske metoder har hittil PFGE funnet størst anvendelse pga høy grad av diskriminerende styrke og reproduserbarhet. AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) er en potensiell kandidat til å utfordre PFGE's plass, men det er foreløpig sparsomt med publikasjoner om stafylokokker og AFLP.

PFGE (*Pulsed-field gel electrophoresis*):

For enkelhets skyld omtales kun pulsed-field, men i prinsippet er det mulig å utføre genomisk makrorestriksjonanalyse ved bruk av andre prinsipper til generering av elektriske felt for å separere høymolekylære DNA-fragmenter.

Bakteriecellene inkorporeres i en agaroseplugg hvor cellene lyses og vaskes. Metoden baseres på at hele bakteriegenomet splittes opp i relativt få store fragmenter (vanligvis ca 10–30) ved hjelp av restriksjonszymer som kutter sjelden. Fragmentene separeres så ved hjelp av gelelektroforese. I motsetning til konvensjonell elektroforese som ikke skiller fragmenter større enn ca 30 kbp, brukes en spesiell elektroforeseteknikk hvor strømmen går i vekslende retning (vanligvis skiftes vinkelen 120°). Jo større fragmentene er jo lenger tid vil de bruke på å reorientere seg før de kan vandre i den nye retningen. En vil herved kunne skille fragmenter opp til størrelsesområdet megabasepar. Tidsintervallene for retningsendringer vil ofte være bestemt av empiri. Ved å variere på tiden som strømmen går i en bestemt retning ("switch time") vil man kunne oppnå bedre separasjon i de ulike områder som et bestemt restriksjonsenzym produserer. Optimalisering vil derfor måtte utføres avhengig av hvilke bakteriespecies og restriksjonszymer som benyttes.

Tolkning av likhet mellom bakteriestammer er basert på graden av likhet i antall fragmenter og fragmentstørrelser. Det er etablert tolkningskriterier hvor man tar i betraktning muligheten av genetiske begivenheter som relativt ofte hender i bakteriepopulasjonen over tid (inersjoner, delesjoner, mutasjoner som affiserer restriksjonssetene) (8,11). Økende antall båndforskjeller blir derfor å betrakte som uttrykk for forskjeller i genetiske "events" og derav mindre sannsynlighet for at stammene er av samme klonale opprinnelse. Vanlig brukte kriterier tar i betraktning om spesifikke genetiske "events" kan forklare disse forskjellene, og stammene vil ofte kunne karakteriseres i kategorier i forhold til utbruddsstammen som:

- a) ikke adskillbar: ingen båndforskjeller, forutsatt epidemiologisk konneks: isolatet er en del av utbruddet.
- b) nært relatert: forskjell 1 genetisk "event" : 1-3 båndforskjeller, forutsatt epidemiologisk konneks: isolatet er sannsynligvis en del av utbruddet.
- c) mulig relatert: forskjell 2 genetiske "events" : inntil 6 båndforskjeller, forutsatt epidemiologisk konneks: isolatet er mulig del av utbruddet.
- d) ulikt: forskjell ≥ 3 genetiske "events": ≥ 7 båndforskjeller, epidemiologisk ikke del av utbruddet.

Disse kriterier må brukes med forsiktighet og kan ikke i seg selv bevise at det er samme klon, men ved en epidemiologisk sammenheng økes sannsynligheten for at det er en klonal utbredelse av en stamme (forutsatt at aktuelle species er typbar og med tilstrekkelig stor spredning av ulike typer normalt).

Metoden har fått stor utbredelse pga sin høye diskriminerende styrke og reproducerbarhet. Det skal dog ikke unnlates å nevnes at det er publisert rapporter om inter-laboratorie variasjon ved bruk av denne metode. Pga av endringer i bakterier over tid vil denne metode være tryggest å benytte hvor stammer innsamles over en relativt kort periode (2-3 mndr) (11). Metodens diskriminerende evne kan økes ved å benytte evt flere restriksjonszymer. Ulempen er høye kostnader av datastyrt elektroforese-utstyr og kostbare restriksjonszymer. En annen ulempe ved PFGE er at metoden tar relativt lang tid pga lysing og preparering av DNA for restriksjonsenzymbehandling (*S.aureus* er dog blant de bakteriespecies det er lettest

å arbeide med.) Vi har erfaring med at det går greit å få resultat i løpet av to arbeidsdager fra man har renkultur på agarskål. En fordel er også at det kan etableres databaser basert på fragmentstørrelsene og utveksling av data mellom laboratorier. (Eksempler på dette er PulseNet (CDC, hittil mest nyttet på EHEC og Salmonella), PHLS har også etablert et system for epidemisk MRSA (EMRSA).) Dette krever billedbehandlingsutstyr og software samt erfaring med ”normalisering” av geler for å korrigere interassay variasjon i migrasjonsbetingelser.

AFLP (amplified fragment length polymorphism)

Prinsippet for metoden er at det gjøres restriksjonfragmentkutting med 1 eller 2 restriksjons-enzymmer. Vanligvis benyttes 2 enzymer: ett med middels kuttefrekvens (ofte *EcoI*) og ett som kutter hyppigere (ex: *MseI*). Det gjøres så en ligering av dobbeltrådet adapter til fragmentkuttstedet hvor adapteren inneholder en sekvens som både 1) rekonstruerer restriksjonssekvensen, og 2) sekvens som vil være bindingssete for en ny primer for adapter-spesifikk PCR. PCR gjøres deretter under høstringente betingelser og gjøres selektiv ved at man i primeren kopler 1-3 nukleotider etter restriksjonssetet slik at bare en seleksjon av utgangsfragmentene vil bli amplifisert. Deretter adskilles de oppformerte fragmenter i antall og fragment-størrelsene bestemmes. Prinsipielt kan dette gjøres ved konvensjonell elektroforese, men kan også utføres ved automatisert DNA sekvensering (fluorescensmerking av nukleotider). Metoden kan innstilles mht antall fragmenter man ønsker å håndtere (ca 40 – ca 200), hvis færre bånd ønskes kan man ekstenere nukleotid(er) i 3’enden av den adapterspesifikke primeren.

Fordel med metoden er at den kan gjøres med utgangspunkt i små mengder rensset DNA, metoden synes å ha et stort potensiale mht svært god diskriminerende styrke og reproducerbarhet (6,7). Metoden forventes å få betydelig økende omfang fremover. Den har nylig vist sin anvendbarhet i en studie av britiske MRSA (fagtyper EMRSA 1-16 og urelaterte MRSA) (3,4).

Konklusjon:

Genotypiske metoder har i dag liten plass ved utredning av utbrudd forårsaket av stafylokokker. Flere genotypiske metoder er tilgjengelige, og utviklingshastigheten er svært høy. Valg av metode vil være avhengig av en rekke forhold, bl.a hvilket utstyr man har tilgjengelig, hvor raskt ønskes svar, behov for sammenligning med andre isolater fra andre institusjoner og tidligere isolater etc. En del PCR baserte metoder vil være relativt enkle å utføre og kan gjøres flere steder. Det forventes betydelig videreutvikling av PCR-baserte metodikker som vil være raske og diskriminerende. Pr idag synes PFGE eller AFLP være best egnet. Disse metodene vil også kunne basere seg på databasert sammenligning med mange isolater fra ulike områder.

Referanser:

1. Bannermann TI et al. Pulsed-field gel electrophoresis as a replacement for bacteriophage typing of *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol, 1995; 33: 551-55.

2. Chiou C-H et al: Comparison of pulsed-field gel electrophoresis and coagulase gene restriction profile analysis techniques in the molecular typing of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol*, 2000: 2186-90.
3. Grady R et al. Genotyping of epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* phage 15 isolates by fluorescent amplified-fragment length polymorphism analysis. *J Clin Microbiol*, 1999, 37: 3198-203.
4. Grady R et al. Use of amplified-fragment length polymorphism analysis of the MRSA epidemic. *FEMS Microbiology Letters*, 2000, 187:27-30.
5. Maslow JN et al. Molecular epidemiology: application of contemporary techniques to the typing of microorganisms. *Clin Infect Dis*, 1993: 17: 153-64.
6. Olive DM, Bean, P. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. *J Clin Microbiol*, 1999, 37: 1661-69.
7. Savelkoul PHM et al. Amplified-fragment length polymorphism analysis: the state of an art. *J Clin Microbiol*, 1999: 3083-91.
8. Struelens MJ and members of the European study group on epidemiological markers. Consensus guidelines for appropriate use and evaluation of microbial epidemiologic typing systems. ESCMID STUDY GROUP REPORT ,1996
9. Tang Y-W et al. Comparison of protein A gene sequencing with pulsed-field gel electrophoresis and epidemiologic data for molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol*, 2000: 1347-51.
10. Tenover FC et al. Comparison of traditional and molecular methods of typing of isolates of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol*, 1994, 32: 407-15.
11. Tenover FC et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol*, 1995, 33: 2233-39.
12. van der Zee A et al. Molecular genotyping of *Staphylococcus aureus* strains: comparison of repetitive element sequence-based PCR with various typing methods and isolation of a novel epidemicity marker. *J Clin Microbiol*, 1999: 37: 342-49.

DEL 3 ENDRINGER

Endringer i rapporten etter første gangs utsendelse

Dato for endring	Side	Fot-note	Ny tekst
05.02.2002	10	1	Undersøkelse mhp MRSA: Mueller Hinton (MH) agar med 2 % NaCl og oxacillin 4 mg/L. Spotinokuler med ca. 10^6 CFU. Utføres ved å avsette 10 μ l med pipette eller inokulere med våt vattpensel (hvor overskuddsvæske er presset av) fra en McFarland 0,5 oppslemming i 0,9% NaCl (ca. 10^8 CFU/ml).