

**RIJKSINSTITUUT VOOR VOLKSGEZONDHEID EN MILIEUHYGIËNE
BILTHOVEN**

Rapportnr. 253601002

Optimalisering van de meticillinegevoeligheids-
bepaling bij coagulase negatieve staphylococcen

A. van Veen-Rutgers¹, F.H. Sijbolts³, C.S. Schot¹,
L.M. Schouls², A.J. de Neeling¹, B. van Klingeren¹

juni 1994

¹ RIVM, Laboratorium voor Bacteriologie en Antimicrobiële Middelen

² RIVM, Unit Moleculaire Microbiologie

³ Diakonessenhuis Utrecht

VERZENDLIJST

1 -	5	Geneeskundige Hoofdinspectie van de Volksgezondheid
	6	Directeur-generaal van de Volksgezondheid
	7	Plv. Directeur-Generaal van de Volksgezondheid
	8	Drs.J.K.van Wijngaarden, arts, Hoofd Afdeling Infectieziekten van de Hoofdafdeling Bijzondere Gezondheidszorg
	9	Dr. J. de Jong, medisch microbioloog, Amersfoort
10 -	17	Hoogleraren Medische Microbiologie
18 -	25	Leden Werkgroep Richtlijnen Gevoeligheidsbepalingen
26 -	102	Inzenders MRSA-isolaten
	103	Depot van Nederlandse publikaties en Nederlandse bibliografie
	104	Directie Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieuhygiëne
	105	Prof.Dr.Ir.D.Kromhout
106 -	113	Auteurs
114 -	115	Bibliotheek
	116	Hoofd Bureau Voorlichting en Public Relations RIVM
	117	Bureau Projecten- en rapportenregistratie
118 -	130	Reserve exemplaren

INHOUDSOPGAVE

VERZENDLIJST	ii
ABSTRACT	v
SAMENVATTING	1
1. INLEIDING	2
1.1 Voorkomen coagulase negatieve staphylococcen	2
1.2 Meticilline-resistentie bij coagulase negatieve staphylococcen	2
1.3 Meticilline resistentie mechanisme	2
1.4 Factoren die de expressie van meticilline-resistentie beïnvloeden	3
1.5 Doel onderzoek	3
1.6 Opzet onderzoek	3
2. MATERIALEN EN METHODEN	4
2.1 Teststammen	4
2.2 Antibiotica	4
2.3 Media	4
2.4 Gevoeligheidsbepalingen	4
2.4.1 Agardilutietest	5
2.4.2 E-test	5
2.5 Onderzoek <i>mecA</i> gen	5
3. RESULTATEN	6
3.1 Aanwezigheid van het <i>mecA</i> gen	6
3.2 Groei	6
3.3 Aflezen E-test	6
3.4 Aflezen agardilutietest	10
3.5 Correlatie aanwezigheid van het <i>mecA</i> gen en fenotypische resistentie voor meticilline en oxacilline	10
3.5.1 E-test	10
3.5.2 Agardilutie	11
3.6 Correlatie tussen de afwezigheid van het <i>mecA</i> gen en de gevoeligheid voor meticilline en oxacilline	11
3.6.1 E-test meticilline en oxacilline	11
3.6.2 Agardilutietest meticilline en oxacilline	11
3.7 MRC verdeling <i>mecA</i> + en <i>mecA</i> - groep, hoog inoculum, 37°C	11
3.8 Eindconclusies resultaten	12
3.9 Vergelijking hoogte MRC's E-test en agardilutie test	13
4. DISCUSSIE	13
4.1 Inoculum	13
4.2 Incubatietemperatuur	13

4.3 Incubatietijd	14
4.4 Media	14
4.5 Aanbeveling oxacilline of meticilline	14
4.6 Paradoxaal effect	15
4.7 Effect losliggende kolonies	15
4.8 PCR techniek: relatie <i>mecA</i> gen en meticilline-resistentie	16
4.9 E-test	16
5. ADVIES	17
6. DANKWOORD	17
7. LITERATUUR	18
TABELLEN	22
FIGUREN	27

ABSTRACT

Coagulase negative staphylococci are increasingly found to be involved in nosocomial infections, especially after invasive surgery. Since the prevalence of methicillin resistance among these strains is high, there is a need for a fast and reliable method to detect this resistance.

In this investigation 40 CNS strains, consisting of *S.epidermidis* and *S.haemolyticus*, were tested using the E-test and the agardilution test. The tests were carried out with methicillin and oxacillin on Mueller Hinton agar, Columbia and PDM agar supplied with 0, 2 and 5% sodium chloride, inocula of 10^6 en 10^8 cfu/ml and MIC reading after 24 and 48 h incubation.

The presence of the *mecA* gene, the structural gene for PBP2a, responsible for methicillin resistance in staphylococcus species, was determined by a PCR method and served as reference (golden standard) for methicillin resistance of the isolates.

The most reliable results to detect methicillin resistance in these coagulase negative staphylococcus strains were obtained with the E-test as well as the agar dilution test on Mueller Hinton agar supplemented with 2% NaCl, an inoculum of 10^8 cfu/ml, an incubation temperature of 37°C and an incubation period of 24 h or 48 h (if sensitive after 24 h). The test was more reliable with oxacillin than with methicillin, particularly in the E-test.

SAMENVATTING

Coagulase negatieve staphylococcen spelen steeds vaker een belangrijke rol bij ziekenhuisinfecties, met name bij patiënten na chirurgische ingrepen. Deze stammen zijn vaak resistent voor meticilline en het is van belang deze resistentie met een snelle en betrouwbare bepalingmethode op te sporen.

In dit onderzoek werden de optimale omstandigheden onderzocht voor het opsporen van meticilline-resistentie bij een groep van 40 coagulase negatieve staphylococcen, bestaande uit *S.epidermidis* en *S.haemolyticus* stammen, m.b.v. de E-test en de agardilutie methode. De bepalingen werden uitgevoerd met meticilline en oxacilline op Mueller Hinton agar, Columbia agar en PDM agar waaraan toegevoegd 0, 2 en 5% NaCl, met inocula van 10^6 en 10^8 cfu/ml, een incubatietemperatuur van 30 en 37°C en een incubatietijd van 24 en 48 uur.

De aanwezigheid van het *mecA* gen in de stammen werd aangetoond met een PCR techniek en diende als gouden standaard voor meticilline-resistentie. De beste resultaten voor het opsporen van meticilline-resistentie bij zowel de E-test als de agardilutietest werden gevonden op Mueller Hinton agar met 2% NaCl, met een inoculum van 10^8 cfu/ml, een temperatuur van 37°C, en een incubatietijd van 24 uur of 48 uur (indien gevoelig na 24 uur). De bepaling met oxacilline was vooral bij de E-test betrouwbaarder dan die met meticilline.

1. INLEIDING

1.1 Voorkomen coagulase negatieve staphylococcen

Hoewel coagulase negatieve staphylococcen tot de normale huidflora behoren, wordt een aantal species als belangrijke ziekenhuis pathogenen beschouwd. Infecties met coagulase negatieve staphylococcen treden veel op na invasieve chirurgische ingrepen. Ze kunnen implantaten (bv. hart-kleppen), intraveneuze catheters en drains koloniseren en worden frequent uit pus en bloedmonsters gekweekt (1). Coagulase negatieve staphylococcen zijn belangrijke pathogenen bij patiënten met immuun-deficiëntie. De belangrijkste ziekteverwekkers zijn *S.epidermidis* en *S.haemolyticus* (2, 3, 4).

1.2 Meticilline-resistentie bij coagulase negatieve staphylococcen

Bij coagulase negatieve staphylococcen komt veel antibioticaresistentie voor: in Nederland is 20% resistent voor meticilline, bovendien zijn de stammen vaak resistent voor meerdere antibiotica (1, 5, 6,). Bij infecties met deze stammen is de therapiekeuze beperkt doordat geen van de β -lactam antibiotica kunnen worden toegepast (7, 8). Snelle opsporing van meticilline-resistente coagulase negatieve staphylococcen (MRSE) m.b.v een gevoelige kwantitatieve bepalingsmethode is dan ook van groot belang. Voor de meticilline-resistentie bepaling bij coagulase negatieve staphylococcen is nog geen officiële standaardmethode beschreven: de richtlijnen voor de bepaling bij MRSA worden gevolgd (8, 9), hoewel het twijfelachtig is of de bepalingmethode voor MRSA hiervoor zonder meer te gebruiken is (10). Daarom trachten we met dit onderzoek een gevoelige en betrouwbare bepaling voor het opsporen van meticilline-resistentie bij coagulase negatieve staphylococcen te vinden.

1.3 Meticilline resistentie mechanisme

Meticilline-resistentie in coagulase negatieve staphylococcen is evenals bij aureus geassocieerd met de produktie van een gemodificeerd penicillinebindingseiwit, het PBP2a (7, 11, 12), dat een lage affiniteit heeft t.o.v. β -lactam antibiotica (13).

Dit PBP2a is een essentieel PBP dat een rol speelt bij fundamentele processen als celgroei en celdeling; door zijn transpeptidase activiteit katalyseert het de vorming van bruggen tussen peptidoglycanpolymeren in de celwand.

Het PBP2a wordt gecodeerd door het chromosomale *mecA* gen (14, 15, 16). De synthese en expressie van het enzym worden gecontroleerd door regulatiegenen (17, 18), zodat de meticilline-resistentie fenotypisch variabel tot expressie komt.

1.4 Factoren die de expressie van meticilline-resistentie beïnvloeden
Het aantonen van meticilline-resistentie bij in vitro testen in een heterogene populatie staphylococcen is afhankelijk van omgevingsfactoren, n.l.:

- inoculumgrootte (19);
- medium (10);
- NaCl-concentratie in medium (20, 21);
- incubatietemperatuur en -tijd (5, 19, 22, 23).

1.5 Doel onderzoek

In de literatuur zijn diverse testen voor het bepalen van meticilline bij coagulase negatieve staphylococcen beschreven, maar er is een grote verscheidenheid in de gevolgde methoden. Omdat er in de praktijk behoefte is aan een snelle, eenvoudige en betrouwbare standaard bepalingsmethode werd de E-test (24), een nieuwe kwantitatieve diffusiemethode voor gevoeligheidsbepalingen, door ons getest.

Dit onderzoek richt zich op het vinden van de optimale omstandigheden waaronder de meticilline-resistentie bij coagulase negatieve staphylococcen aangetoond kan worden bij toepassing van de E-test en de klassieke agardilutietechniek. Beide methoden worden met elkaar vergeleken.

1.6 Opzet onderzoek

Veertig coagulase negatieve staphylococcen (*S.epidermidis* en *S.haemolyticus*) zijn met twee inocula (10^6 en 10^8 cfu/ml) getest op drie agarmedia (Mueller Hinton, Columbia en PDM) met concentraties NaCl (0, 2 en 5%), waarbij geïncubeerd werd bij 30°C en 37°C gedurende 24 en 48 uur. Het *mecA* gen werd in de stammen bepaald m.b.v. een PCR techniek. De aanwezigheid van het *mecA* gen in de stammen werd aangehouden als "gouden standaard" voor meticilline-resistentie. Genotypische identificatie van meticilline-resistentie bij coagulase negatieve staphylococcen m.b.v de PCR techniek komt goed overeen met de fenotypische, uitgevoerd m.b.v. gevoeligheidsbepalingen van meticilline (12, 25, 26).

2. MATERIALEN EN METHODEN

2.1 Teststammen

Er zijn 40 coagulase negatieve staphylococcen onderzocht, waarvan 30 *S.epidermidis* en 10 *S.haemolyticus*. De *S.epidermidis* stammen zijn gekozen uit een verzameling klinische isolaten die behoren tot een resistentiepeilingsonderzoek met staphylococcen in de regio Utrecht in 1993.

De *S.haemolyticus* stammen zijn afkomstig van een epidemiologisch onderzoek met klinische isolaten in 1992, waarbij de stammen getypeerd zijn met moleculaire technieken. Gelijke aantallen meticilline-gevoelige en -resistente stammen werden uitgezocht op basis van de uitkomsten van eerder meticilline-gevoeligheidsonderzoek waarbij *S.epidermidis* met een microtitermethode en *S.haemolyticus* volgens de richtlijnen van de WRG (1990) werden getest.

Alle stammen waren coagulase negatief (slide test) en geïdentificeerd m.b.v. API Staph (Bio Merieux).

Controlestammen waren een meticilline-gevoelige *S.aureus* (23-88.10019) en een meticilline-resistente aureus (50-A247), klinische isolaten die als referentiestammen voor onze meticilline-gevoeligheidsbepaling bij MRSA dienen.

Inocula

Voor het bereiden van inocula van 10^6 en 10^8 cfu/ml werden van 24 uren culturen op bloedagar suspensies in 0.9% NaCl gemaakt: suspensies met een extinctie van 0.4-0.6 bij 595 nm (Vitalab 10, Vital Scientific) bevatten 10^8 cfu/ml en werden 100x verdund tot 10^6 cfu/ml.

2.2 Antibiotica

Meticilline (Sigma Chemical Co, USA) en oxacilline (Sigma Chemical Co, USA) werden opgelost in gedestilleerd water en gebruikt voor de agar-dilutietest.

E-test strips met resp. meticilline en oxacilline werden geleverd door AB Biodisk (Zweden).

2.3 Media

Mueller Hinton II agar (Becton-Dickinson, USA), Columbia Agar Base (Unipath Ltd. Engeland) en PDM agar (AB Biodisk, Zweden) werden bereid volgens de voorschriften van de fabrikanten; voor het steriliseren werd NaCl (BDH, Engeland) toegevoegd tot een eindconcentratie van 0%, 2% en 5% (w/v).

2.4 Gevoeligheidsbepalingen

De gevoeligheidsbepalingen werden uitgevoerd met de agardilutietest en de E-test op bovenstaande media, met inocula van 10^6 en 10^8 cfu/ml, geïncubeerd bij een temperatuur van 30°C en 37°C, en afgelezen na 24 (18-24) uur en 48 (42-48) uur.

Voor de beoordeling van de gevoeligheid werden de NCCLS breekpunten (8) gehanteerd:

- oxacilline: gevoelig ≤ 2 mg/l, resistent ≥ 4 mg/l
- meticilline: gevoelig ≤ 8 mg/l, resistent ≥ 16 mg/l

2.4.1 Agardilutietest

In de media werden tweevoudige verdunningsreeksen van meticilline en oxacilline tot concentraties van 0.12-64 mg/l gemaakt en in petrischalen gegoten. Controleplaten zonder antibiotica werden eveneens gemaakt. De reeksen werden vóór gebruik maximaal 1 dag bewaard bij 4°C. Na drogen gedurende 0.5 uur 37°C werden de platen beënt met 1 μ l van de inocula met behulp van een multipoint inoculator. Ter controle werden bij elke test een meticilline-gevoelige en een -resistente controlestam meegenomen. Na incuberen werd de MRC afgelezen als de laagste concentratie waarbij de zichtbare groei volledig was geremd. Een entvlek met meer dan 5 losliggende kolonies werd als groei beschouwd.

2.4.2 E-test

De E-test bestaat uit een kunststof strip van 50 x 5 mm, waarop aan de onderkant een exponentiële gradiënt van een antibioticum gehecht is en aan de bovenkant een afleesschaal. Hierop staan de MRC's vermeld in een verdunningsreeks waarbij de concentraties oplopen met een factor 1.5. Het concentratiebereik (0.016-256 mg/l) van de oxacilline-, resp. meticilline-gradiënt is verdeeld in tweemaal zoveel concentratiestappen als een overeenkomstige reeks bij de agardilutie-verdunningstest.

De E-test werd uitgevoerd in petrischalen gevuld met de media zonder antibiotica met een volgens de fabrikant voorgeschreven agardikte van 4 ± 0.5 mm. De platen werden in plastic verpakt bij 4°C bewaard en binnen 4 weken gebruikt. Na drogen (0.5 uur 37°C) werden ze beënt door 300 μ l inoculum met een wattedragers gelijkmatig over de voedingsbodem te verdelen. Na eventueel nadrogen werden twee E-teststrips met resp. meticilline en oxacilline in tegengestelde richting op de agarplaat gelegd. Na incuberen werd op de begrenzing van de remmingszone de MRC op de strip afgelezen. Bij afwijkingen van een scherpe begrenzing zijn voor het bepalen van het afleespunt de aanwijzingen van de fabrikant gevolgd (27). Een paradoxaal groei/remmingseffect rondom de strip met een groeizone tot de strip wordt evenals losliggende kolonies in een schone remzone als doorgroei geïnterpreteerd.

De controlestammen zijn éénmaal getest op elk van de media.

2.5 Onderzoek *mecA* gen

De aanwezigheid van het *mecA* gen is aangetoond m.b.v. een PCR-techniek en uitgevoerd met ongezuiverde lysostaphine lysaten. De gekozen primers sloten een gebied van 1800 baseparen in van de 2451 baseparen waaruit het *mecA* gen bestaat, zodat een groot gedeelte van het *mecA* gen geamplificeerd werd. De verkregen PCR fragmenten werden geanalyseerd op ethidiumbromide gekleurde agarose gels.

3. RESULTATEN

3.1 Aanwezigheid van het *mecA* gen

Bij 25 van de 40 stammen is het *mecA* gen m.b.v. een PCR-techniek aangetoond. Stammen waarbij het *mecA* gen is aangetoond worden als resistent beschouwd voor meticilline en oxacilline, de overige als gevoelig.

3.2 Groei

De stammen groeiden goed op PDM en Columbia agar. De groei was minder goed op Mueller Hinton agar; één stam groeide helemaal niet op dit medium, terwijl de stam redelijke groei vertoonde op de andere voedingsbodems. Mueller Hinton vertoonde na 24 uur bij 30°C en laag inoculum veelal vage, soms helemaal geen groei.

Op alle voedingsbodems groeiden de stammen beter bij 37°C dan bij 30°C, beter na 48 uur dan na 24 uur en beter met hoog dan met laag inoculum.

De toevoeging van 5% NaCl aan de voedingsbodems had een sterk negatieve invloed op de groei, dit kwam vooral tot uitdrukking bij 30°C, laag inoculum en een incubatietijd van 24 uur.

3.3 Aflezen E-test

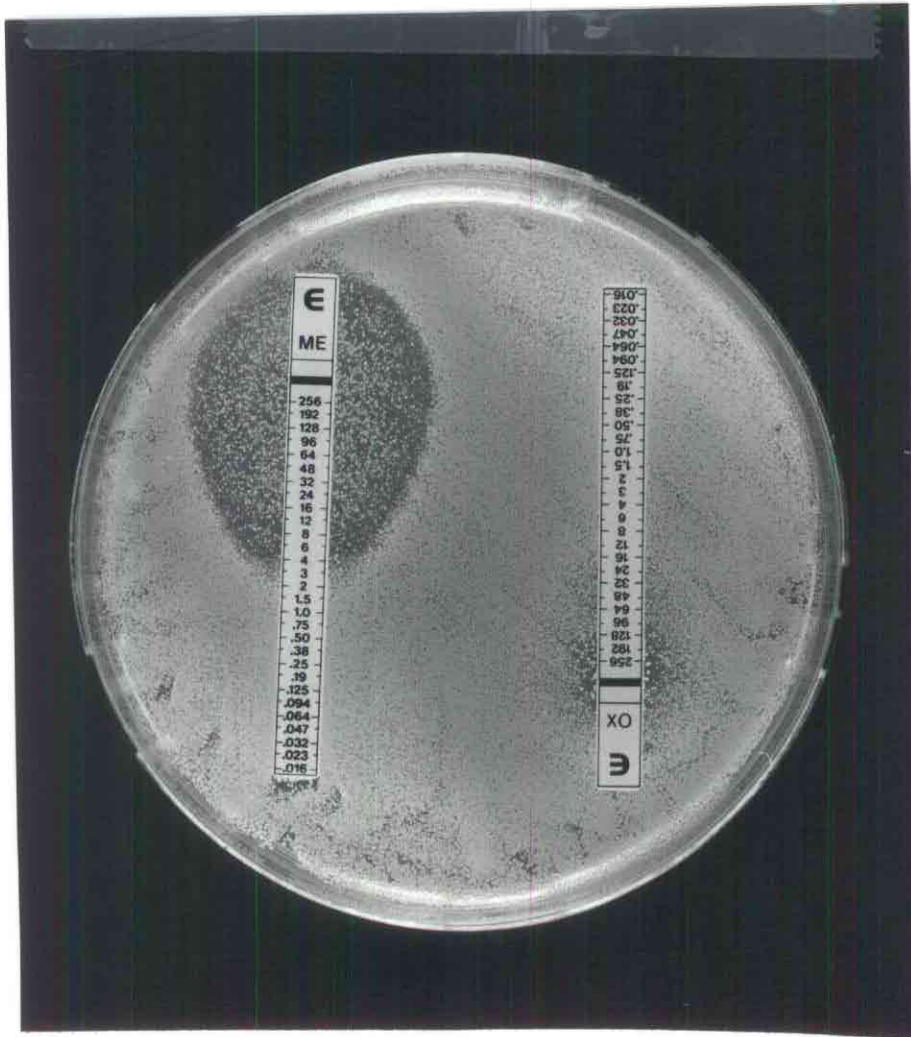
De scherpste aflezing van zowel meticilline als oxacilline was bij 37°C en hoog inoculum op alle media met 0 en 2% NaCl. De aflezing met oxacilline gaf op Mueller Hinton zonder zout iets minder vaak vage remzones dan de test met meticilline onder dezelfde omstandigheden. Binnen de media vertoonde PDM agar met 0 en 2% NaCl de meest scherpe begrenzing van de remzone.

Losliggende kolonies in de remzone

Losliggende kolonies (na 48 uur incuberen meestal grote kolonies), die tot de strip groeien in een overigens heldere scherp begrensde remzone (foto 1 en tabel), werden meegeteld als groei. Deze stammen werden als resistent beoordeeld. Dit verschijnsel doet zich alleen bij de resistente *mecA* gen bevattende stammen in meerdere of mindere mate op alle media voor; zowel bij de meticilline als de oxacilline E-testen het meest op de media met 0 en 2% NaCl, na 48 uur incuberen, bij 30°C en 37°C.

Op Mueller Hinton komt dit verschijnsel bij de resistente stammen 3 à 4 maal minder frequent voor dan op Columbia agar en PDM, minder bij de oxacilline test op Mueller Hinton dan bij de meticilline test op dit medium. Het verschijnsel van losliggende kolonies in remzones zoals dat gevonden werd bij een hoog inoculum of na 48 uur incuberen, waren in veel gevallen niet aanwezig bij overeenkomstige condities bij laag inoculum of na 24 uur incuberen, zodat de stam onder de laatstgenoemde condities als gevoelig werd afgelezen.

Foto 1



links meticilline - losliggende kolonies in de remzone
rechts oxacilline - doorgroei tot aan de strip

E-test: aantal aflezingen met kolonies in remzones bij resistente stammen en % op een totaal van 600 tests per medium

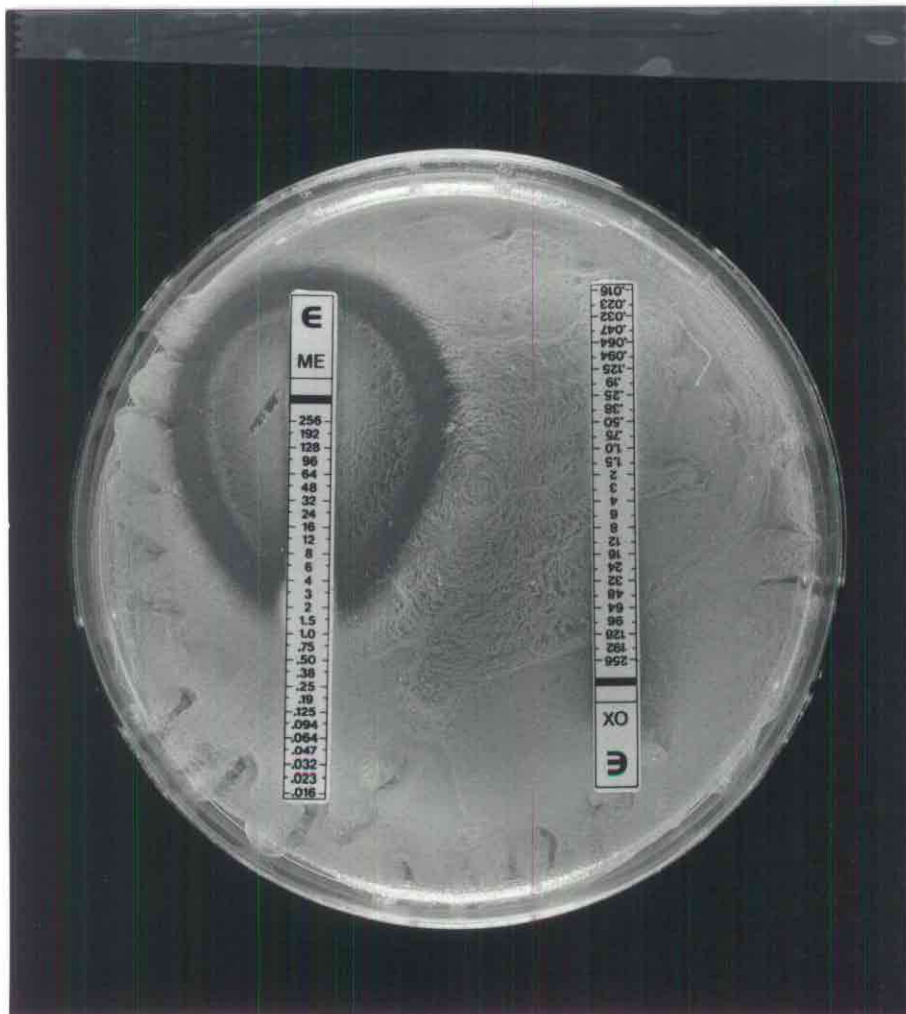
medium		n	%
Mueller Hinton	meticilline	27	4.5
Mueller Hinton	oxacilline	13	2.2
Columbia	meticilline	65	10.8
Columbia	oxacilline	62	10.3
PDM	meticilline	88	14.7
PDM	oxacilline	69	11.5

Paradoxaal effect

De stammen met een paradoxaal groei/remmingseffect rondom de strip (in de literatuur soms "target zones" genoemd), waarbij een groeizone tot de strip, vervolgens een smalle remmingszone, daarna weer groei verschijnt (foto 2 en tabel 2), worden als resistent beschouwd. Het verschijnsel komt alleen voor bij de meticilline-bepaling van vrijwel alle resistente *S.epidermidis* stammen; de E-testbepalingen van de overeenkomstige oxacilline tests laten normale doorgroei zien en scoren allen resistent. Het paradoxaal effect trad bij alle voedingsbodems in gelijke mate op, echter niet onder dezelfde omstandigheden. Op Columbia en PDM agar veelal bij 2 en 5% NaCl (in de helft van de gevallen bij beide media onder dezelfde omstandigheden), op Mueller Hinton voornamelijk op de media zonder NaCl, terwijl op Mueller Hinton met 2% en 5% NaCl het verschijnsel alleen werd waargenomen bij 30°C.

In het algemeen ontstond er bij een hoog inoculum vaker een paradoxaal effect dan bij een laag inoculum.

Foto 2



links meticilline - paradoxaal effect
rechts oxacilline - doorgroei tot aan de strip

3.4 Aflezen agardilutietest

Het bepalen van het eindpunt van groei is bij de agardilutie test soms moeilijk doordat er een geleidelijk afname van groei is op de oplopende antibioticumconcentratiereeks. Dit wordt versterkt wanneer de stam slecht groeit op het medium. Vage aflezingen komen voornamelijk voor bij een laag inoculum, na 24 uur incubatie bij 30°C en op de media met 5% NaCl. De scherpste aflezingen van de agardilutietest van zowel de meticilline- als de oxacilline-bepaling waren met hoog inoculum bij 37°C op Columbia en PDM agar met 0 en 2% NaCl; het breekpunt van groei op Mueller Hinton agar was iets minder duidelijk.

Doorgroei met losliggende kolonies

Het verschijnsel waarbij doorgroei optreedt van losliggende kolonies was bij de agardilutietest minder duidelijk waarneembaar dan bij de E-test. Bij het aflezen werden losliggende kolonies als groei bestempeld wanneer er meer dan vijf per entvlek waren. Bij zowel de meticilline- als de oxacilline- gevoeligheidsbepaling treden ze voornamelijk op bij de media met 0 en 2% NaCl, na 48 uur incuberen bij 37°C. Op Mueller Hinton minder frequent dan bij Columbia en PDM agar. Bij de agardilutietest komt soms doorgroei van losse kolonies voor bij stammen die gevoelig zijn onder alle andere omstandigheden.

Paradoxaal effect

Het optreden van geen of verminderde groei op enkele tussenliggende concentraties bij de agardilutietest zou op het paradoxaal effect kunnen wijzen. Het verschijnsel was echter erg moeilijk waar te nemen bij de agardilutietest. Het effect is soms opgemerkt bij de meticilline-reeksen.

3.5 Correlatie aanwezigheid van het *mecA* gen en fenotypische resistentie voor meticilline en oxacilline

De MRC's voor beide antibiotica van de groep van 25 resistente stammen werden sterk beïnvloed door de diverse bepalingssomstandigheden. Geen der stammen waren onder alle bepalingssomstandigheden resistent voor één van beide antibiotica.

3.5.1 E-test

Tabel 3 geeft het aantal stammen weer waarbij het *mecA* gen is aangetoond, dat bij de E-test resistent was voor meticilline, respectievelijk oxacilline. Hieruit is af te lezen dat de resistentie voor zowel meticilline als oxacilline van alle stammen behorend tot de *mecA*+ groep alleen optrad met een hoog inoculum.

In vergelijking met de andere media gaf Mueller Hinton agar veruit de beste resultaten bij zowel de meticilline- als de oxacilline-bepaling. De hoogste correlatie op Mueller Hinton werd verkregen bij 0 en 2% NaCl, de andere media hadden hiervoor 2 of 5% NaCl nodig.

Bij een incubatietemperatuur van 30°C correleerde de resistentie en de aanwezigheid van het *mecA* gen alleen goed na 48 uur incuberen.

3.5.2 Agardilutie

Tabel 4 geeft het aantal stammen met *mecA* weer dat onder de diverse omstandigheden bij de agardilutietest resistent was voor meticilline, resp oxacilline. De beste resultaten werden verkregen met oxacilline, hoog inoculum, op Mueller Hinton met 0 en 2% NaCl en Columbia agar met 0, 2 en 5% NaCl, zowel bij 30°C als 37°C en zowel na 24 als 48 uur incuberen.

Meticilline gaf goede resultaten op Mueller Hinton zonder en met zout-toevoeging en op de andere media met zout met hoog inoculum en na 48 uur incuberen bij 37°C.

3.6 Correlatie tussen de afwezigheid van het *mecA* gen en de gevoeligheid voor meticilline en oxacilline

3.6.1 E-test meticilline en oxacilline

Alle 15 stammen waarin het *mecA* gen niet werd aangetoond, waren onder alle omstandigheden gevoelig, zowel voor meticilline (alle MRC's < 4 mg/l) als voor oxacilline (alle MRC's < 2 mg/l). De hoogte van de MRC's werd niet beïnvloed door de diverse bepalingcondities.

3.6.2 Agardilutietest meticilline en oxacilline

Tabel 5 geeft een overzicht van de omstandigheden waarbij doorgroei (van meestal enkele kolonies) van stammen uit de *mecA*- groep werd waargenomen, zodat de betreffende stam onterecht als resistent werd beoordeeld.

Bij de meticilline-bepaling kwam dit voor met hoog inoculum bij 7 van de 15 *mecA* negatieve stammen, voornamelijk bij de bepalingen op Columbia agar. Het verschijnsel deed zich bij de oxacilline-bepaling in veel mindere mate voor (bij 3 stammen).

De rest van de *mecA* negatieve stammen was gevoelig voor zowel meticilline (alle MRC's < 8 mg/l) als oxacilline (alle MRC's < 4 mg/l).

Evenals bij de E-test werd de hoogte van de MRC's van deze laatste groep stammen niet beïnvloed door de diverse bepalingcondities.

3.7 MRC verdeling *mecA*+ en *mecA*- groep, hoog inoculum, 37°C

Uit bovenstaande resultaten blijkt dat voor het aantonen van de meticilline- en oxacilline-resistentie bij coagulase negatieve staphylococcen een incubatietemperatuur van 37°C en een hoog inoculum voorwaarden zijn.

In de figuren 1 t/m 8 zijn frequentieverdelingen van de MRC's bij deze omstandigheden van de totale groep stammen weergegeven.

E-test: (fig. 1 t/m 4)

De bepaling van zowel meticilline (fig. 1 en 2) als oxacilline (fig. 3 en 4) op Mueller Hinton agar met 0 en 2% NaCl scoort alle stammen met *mecA* resistent en de stammen zonder *mecA* gevoelig na 24 en na 48 uur incuberen; met 5% NaCl zijn na 48 uur enkele resistente stammen, die na 24 uur incuberen als gevoelig scoren, ook resistent.

Het verschil tussen de hoogste MRC van de gevoelige en de laagste MRC van de resistente groep is op Mueller Hinton met 2% NaCl het grootst. Dit verschil bedraagt na 24 uur incuberen voor beide antibiotica een concentratiegebied van zes 2-voudige verdunningsstappen (factor 64).

De bepalingen van beide antibiotica op Columbia en PDM agar resulteerden niet zelden in vals-gevoelige uitslagen, vooral op de media zonder zouttoevoeging. Consistent juiste uitslagen werden slechts gevonden na 24 uur met oxacilline op PDM met 2% zout en na 48 uur met beide antibiotica op Columbia met 5% NaCl en PDM met 2% en 5% NaCl (alleen oxacilline).

Agardilutiemethode: (fig 5 t/m 8)

Met de agardilutiemethode gaven de oxacilline-bepalingen (fig.5 en 6) op alle media duidelijk betere resultaten dan die met meticilline (fig.7 en 8).

De meticilline-test gaf slechts bij één bepalingssconditie steeds goede resultaten: na 48 uur incuberen op PDM met 2% NaCl. De meticilline-MRC trajecten van de *mecA*+ groep en *mecA*- groep overlaptten elkaar op alle media, het meest op Columbia en PDM agar.

Voor de oxacilline-bepaling is geen duidelijke voorkeur voor een van de media. Toevoeging van 2% NaCl en een langere incubatietijd resulteerden in een grotere discriminatie tussen de *mecA*- en de *mecA*+ groep: op Mueller Hinton met 2% NaCl bestrijkt het tussenliggende concentratietraject na 24 uur 1 en na 48 uur 4 verdunningsstappen.

3.8 Eindconclusies resultaten

E-test

Mueller Hinton agar met 2% NaCl, 37°C en hoog inoculum zijn de meest geschikte omstandigheden voor zowel de meticilline- als de oxacilline-bepaling.

Hoewel de meticilline-resistentie met beide antibiotica bij deze omstandigheden even goed is aan te tonen, verdient oxacilline een lichte voorkeur boven meticilline omdat de oxacilline-bepaling niet gestoord wordt door het optreden van paradoxale effecten en er bij de oxacilline-bepaling een grotere discriminatie lijkt te zijn tussen de MRC's van de *mecA*+ en *mecA*- groep.

Agardilutietest

Het aantonen van meticilline-resistentie met oxacilline is bij de agardilutietest veel betrouwbaarder dan met meticilline.

Bij de oxacillinebepaling is er geen verschil tussen de media, maar toevoeging van 2% NaCl is aan te bevelen. Onze voorkeur gaat uit naar Mueller Hinton met 2% NaCl, mede omdat dit medium ook wordt gebruikt voor de MRSA bepaling.

3.9 Vergelijking hoogte MRC's E-test en agardilutie test

De MRC's van meticilline van de gevoelige stammen liggen bij de E-test veelal een factor 2 lager dan bij de overeenkomstige bepalingen met de agardilutietest; dit komt overeen met de bevindingen van Bignardi (30). Bij de oxacillinebepaling was dit minder duidelijk aanwijsbaar, omdat MRC's bij de E-test veelal lager waren dan 0.12 mg/l, de laagste concentratie van de agardilutietest.

4. DISCUSSIE

4.1 Inoculum

De inoculumdichtheid is de belangrijkste variabele die de resultaten van de gevoeligheidsbepalingen van meticilline bij staphylococcen beïnvloedt. De NCCLS schrijft een uitgangssuspensie voor van kolonies van een 18-24 uren cultuur op vaste voedingsbodem waarvan de troebeling overeenkomt met die van een McFarland (BaSO₄) standaard 0.5; de optische dichtheid hiervan is 0.1 bij 625 nm en men stelt dat het aantal levende cellen 10⁸ cfu/ml is (8). Dit inoculum wordt door de meeste onderzoekers overgenomen. Voor de agardilutiemethode suggereert de NCCLS de suspensie te verdunnen tot 10⁴ cfu/spot, voor de agarscreen een egale plaatbeënting met de onverdunde suspensie van 10⁸ cfu/ml. Onze ervaring is echter dat de optische dichtheid van een staphylococcensuspensie - bereid van groei op agarmedium - die 10⁸ cfu/ml bevat, een factor 4-6 hoger ligt. Dit komt overeen met de bevindingen van Baker et al. (28) en Barry (29) die in staphylococcensuspensies overeenkomend met de troebeling van McFarland 0.5 standaard een factor 2-4 minder cfu/ml vonden.

De inocula in dit onderzoek liggen in vergelijking met die voorgeschreven door de NCCLS voor de agardilutiemethode ongeveer een factor 50 hoger, nl 10⁵ cfu/spot. Gezien onze bevindingen dat het aantal vals gevoelige stammen bij de testen met een laag inoculum hoger is in vergelijking met die met een hoog inoculum, kunnen we concluderen dat wanneer het onderzoek uitgevoerd zou zijn met inocula volgens NCCLS richtlijnen, een aantal resistente stammen bij de agardilutietest ten onrechte als gevoelig beoordeeld was.

Diverse auteurs geven het belang van een hoog inoculum aan voor de detectie van meticilline-resistentie bij heterogene stammen van coagulase negatieve staphylococcen (30, 31).

4.2 Incubatietemperatuur

In tegenstelling tot de optimale (lage) incubatietemperatuur voor de meticilline-bepaling bij aureus, blijkt uit ons onderzoek dat de meticilline-resistentie bij coagulase negatieve staphylococcen beter aangetoond kan worden bij 37°C dan bij 30°C. De stammen groeiden beter bij een hogere incubatietemperatuur. Onze conclusies komen overeen met de bevindingen van Hedin en Hambræus (19) die de voorkeur gaven aan 35°C boven een incubatietemperatuur van 30°C voor de meticilline-detectie bij

S.epidermidis. Hamilton-Miller en Iliffe (5) stelden na gevoeligheids-onderzoek dat uitgevoerd werd bij 30°C en 37°C met coagulase negatieve staphylococcen dat de incubatietemperatuur geen invloed had op het aantonen van meticilline-resistentie.

4.3 Incubatietijd

Voor de meticilline-bepaling bij *S.aureus* wordt een incubatietijd van 48 uur afgeraden omdat een β -lactamase vormer het antibioticum zodanig kan inactiveren dat er groei ontstaat (32). Uit de resultaten van bepalingen bij coagulase negatieve staphylococcen blijkt dat een incubatietijd van 48 uur de gevoeligheid van de bepaling vergroot. Dit wordt bevestigd door de onderzoeken van Milne et al. (10, 33), Law et al. (21) en Woods et al. (34), waarin werd aangetoond dat het aantal resistente coagulase negatieve staphylococcen na een langere incubatietijd toenam.

Het is raadzaam om de gebleken gevoeligheid van een stam na 24 uur incuberen te controleren na 48 uur.

4.4 Media

Hoewel de coagulase negatieve staphylococcen stammen in ons onderzoek op Columbia en PDM beter groeiden dan op Mueller Hinton medium, blijkt uit ons onderzoek dat Mueller Hinton met 2% NaCl het meest geschikte medium is voor het aantonen van meticilline-resistentie bij coagulase negatieve staphylococcen. Toevoeging van 5% zout aan de media vertoonde veelal een groeiremmend effect.

Uit de literatuur blijkt dat Mueller Hinton het medium van voorkeur is voor de meeste onderzoekers. Sommige auteurs verkiezen Columbia agar waarbij aan beide media 2 tot 5% NaCl wordt toegevoegd (21, 33).

De NCCLS adviseert voor de bepaling van meticilline-resistentie eveneens Mueller Hinton agar met 2% NaCl, of voor de bouillonverduunningsmethode Mueller Hinton bouillon gesupplementeerd met Ca-ionen en 2% NaCl (8).

Hindler en Interlied (35) toonden aan dat er verschillen in resultaten kunnen optreden bij gevoeligheidsonderzoek van MRSA op Mueller Hinton agar afkomstig van diverse fabrikanten. Om de invloed van batchverschillen te vermijden schrijft de NCCLS een kwaliteitscontrole van de Mueller Hinton media voor (36). Mueller Hinton agar van BBL, gebruikt in dit onderzoek, voldoet aan de eisen gesteld in dit document.

4.5 Aanbeveling oxacilline of meticilline

Uit de resultaten van ons onderzoek is gebleken dat oxacilline de meticilline-resistentie bij coagulase negatieve staphylococcen beter kan aantonen dan meticilline zelf, zowel met de agardilutietechniek als met de E-test. Hoewel in de literatuur diverse auteurs de voorkeur geven aan oxacilline voor de bepaling bij coagulase negatieve staphylococcen (37, 34, 38, 19) concludeerden Coudron et al. (39) dat de resistentie bij *S.epidermidis* betrouwbaarder met meticilline dan met oxacilline aangetoond kon worden. De NCCLS stelde in haar richtlijn voor het opsporen van meticilline-resistentie bij staphylococcen (8) dat oxacilline de

heteroresistentie bij deze organismen waarschijnlijk beter aantoonbaar dan met icilline. De grotere stabiliteit bij bewaren is een andere belangrijke reden om oxacilline aan te bevelen.

4.6 Paradoxaal effect

Uit de resultaten van dit onderzoek is gebleken dat het paradoxaal effect alleen voorkwam bij met icilline-bepalingen en het duidelijkst zichtbaar was in de E-test. De stammen vertoonden een normale doorgroei met de oxacilline-strips. Bij Columbia en PDM agar zonder zouttoevoeging is het verschijnsel niet waargenomen: onder deze omstandigheden vertoonde slechts een enkele met icilline-resistente stam egale doorgroei tot de strip, de meeste stammen groeiden door met losse kolonies in de remzone, zodat het effect dan niet waar te nemen is.

In de literatuur wordt het verschijnsel bij diskdiffusietesten soms "target zones" genoemd. Het verschijnsel wordt zowel bij bepalingen met *S.aureus* (37, 40) als met *S.epidermidis* (19, 21) beschreven, waarbij in overeenstemming met onze resultaten het effect wel voorkwam bij bepalingen met met icilline en niet met oxacilline.

Boyce et al. (40) concludeerden na inductieproeven met beide antibiotica dat het fenomeen veroorzaakt werd door inductie van PBP2a in resistente organismen behorend tot een heterogene populatie van *S.aureus*. Uit hun resultaten bleek dat oxacilline een veel sterkere inducer is dan met icilline. Ze veronderstelden dat "target zones" zullen optreden als de concentratie van het β -lactam antibioticum dat nodig is voor inductie van het PBP2a hoger is dan de benodigde concentratie voor het remmen van de andere PBP's.

4.7 Effect losliggende kolonies

Het verschijnsel van losliggende kolonies dat optrad bij zowel de met icilline- als de oxacilline-bepaling met beide technieken was het duidelijkst waarneembaar bij de E-test waar in heldere remzones kolonies verschenen. Het wordt waarschijnlijk veroorzaakt doordat de met icilline-resistentie slechts bij een klein gedeelte van de bacteriën behorend tot een heterogene populatie staphylococci tot expressie komt. Wij vonden dat het effect minder voorkwam op Mueller Hinton dan op Columbia of PDM agar. Een verklaring hiervoor is dat er onder mildere omstandigheden volledige doorgroei en hogere MRC's gevonden werden op het eerst genoemde medium dan onder vergelijkbare condities op de beide andere media.

In de literatuur wordt vaak gesproken van "pinpoint" kolonies en het effect is beschreven bij bepalingen met zowel *S.aureus* (37, 35) als met coagulase negatieve staphylococci (19, 33). Overeenkomend met onze resultaten werden de stammen met een dergelijk verschijnsel door genoemde auteurs als resistent beschouwd. Coudron et al. (39) echter indiceren het waargenomen effect bij *S.epidermidis* en *S.aureus* als vals positief. Om het verschijnsel te kunnen waarnemen is het gebruik van een hoog inoculum en vaak een langere incubatietijd van belang.

4.8 PCR techniek: relatie *mecA* gen en meticilline-resistentie

Genotypisch kan de meticilline-resistentie bij coagulase negatieve staphylococcen aangetoond worden door het uitvoeren van een PCR techniek op het *mecA* gen dat codeert voor PBP2a. Deze kan als referentietest beschouwd worden als men aanneemt dat de resistentie fenotypisch altijd tot expressie komt, resulterend in een hoge MRC voor meticilline. Bij ons onderzoek werd onder optimale testomstandigheden volledige correlatie gevonden tussen de aan- of afwezigheid van het *mecA* gen en de fenotypische expressie hiervan. Dit komt overeen met de resultaten van zowel Predari et al. (25) als Hedin en Löfdahl (26), die onderzoek uitvoerden met een zeventigtal coagulase negatieve staphylococcen waarbij voor het opsporen van meticilline-resistentie diverse testmethoden, waaronder de PCR techniek, met elkaar werden vergeleken. Suzuki et al. (12) vonden echter in een groep van 125 meticilline-resistente coagulase negatieve staphylococcen, vier stammen waarbij het *mecA* gen niet kon worden aangetoond terwijl de stammen een meticilline-MRC hadden van 16-64 mg/l; ze schreven het resistentiemechanisme toe aan veranderingen van de andere PBP's.

4.9 E-test

De E-test is als alternatieve gevoeligheidsbepaling inmiddels door vele onderzoekers geëvalueerd; de resultaten zijn vergelijkbaar met of beter dan die van de gangbare bepalingsmethoden (41, 42). Bignardi et al. (30) vergeleken de E-test met andere methoden voor meticilline-bepalingen bij coagulase positieve en negatieve staphylococcen en signaleerden dat de heteroresistentie bij deze stammen met de E-test beter aangetoond kon worden. Ook uit ons onderzoek komt naar voren dat de E-test nauwkeuriger de meticilline-resistentie bij coagulase negatieve staphylococcen opspoort dan de agardilutietechniek: de discriminatie in MRC's tussen de stammen met *mecA* en die zonder *mecA* is het grootst bij de E-test.

De E-test verenigt de eenvoud van de kwalitatieve diskdiffusiemethode met de nauwkeurigheid van de agardilutiemethode, terwijl een groot concentratiebereik van het antibioticum, verdeeld in kleine verdunningsstappen van een factor 1.5, getest wordt. Verschijnselen die voor de beoordeling van de resistentie van belang kunnen zijn zoals losliggende kolonies en paradoxale effecten zijn bij de E-test duidelijker dan bij de agardilutietest.

Een belangrijk voordeel boven de agardilutiemethode is de stabiliteit van de antibiotica in de E-test strips, zodat ze bij juist bewaren lang houdbaar zijn.

Gezien de kosten van de E-test lijkt deze echter minder geschikt voor seriematige bepalingen. Wanneer van een groot aantal stammen de gevoeligheid moet worden bepaald is de multipoint-agardilutiemethode misschien iets sneller, maar zeker goedkoper.

5. ADVIES

Zowel voor de E-test als de agardilutietest wordt aanbevolen om bij de meticilline-resistentiebepaling van coagulase negatieve staphylococcen de volgende condities in acht te nemen:

Oxacilline, Mueller Hinton met 2% NaCl, inoculum 10^8 cfu/ml, incubatietemperatuur 37°C, incubatietijd 24 uur (indien gevoelig dan na 48 uur nogmaals aflezen).

6. DANKWOORD

Dit onderzoek werd, via de Stichting Wetenschappelijk Onderzoek Diakonesenhuis Utrecht, financieel ondersteund door Eli Lilly Nederland.

We zijn Dr.J.de Jong en dhr.G.van Dijk (bacteriologisch laboratorium Eemland Ziekenhuis Amersfoort) erkentelijk voor het leveren van de *S.epidermidis* stammen.

Mw.M.Dessens-Kroon danken we voor de hulp bij de computerverwerking van de gegevens.

7. LITERATUUR

1. Neeling AJ de, Hemmes JH, Klingereren B van. Resistentie tegen antibiotica bij routine-isolaten van bacteriën in zeven streeklaboratoria. RIVM 1993 rapportnr. 253601001.
2. Lowy FD, Hammer SM. *Staphylococcus epidermidis* infections. Ann Intern Med 1983; 99:834-9.
3. Froggatt JW, Johnston JL, Galetto DW, Archer GL. Antimicrobial resistance in nosocomial isolates of *Staphylococcus haemolyticus*. Antimicrob Ag Chemother 1989; 33:460-6.
4. Kloos WE, Lambe DW. *Staphylococcus*. In Balows A (ed), Manual of Clinical Microbiology, 5th ed. 1991, p. 224-225, American Society for Microbiology, Washington, D.C.
5. Hamilton-Miller JMT, Iliffe A. Antimicrobial resistance in coagulase negative staphylococci. J Med Microbiol 1985; 19:217-26.
6. Mouton RP, Hermans J, Simoons-Smit AM, Hoogkamp-Korstanje JAA, Degener JE, van Klingereren B. Correlation between consumption of antibiotics and methicillin resistance in coagulase negative staphylococci. J Antimicrob Chemother 1990; 26:573-83.
7. Chambers HF. Coagulase-negative staphylococci resistant to β -lactam antibiotics in vivo produce penicillin-binding protein 2a. Antimicrob Ag Chemother 1987; 31:1919-24.
8. NCCLS: National Committee for Clinical Laboratory Standards. Methods for dilution antimicrobia; susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. NCCLS document M7-A3 1993;13:25. NCCLS, Villanova, Pennsylvania, 19085.
9. Werkgroep Richtlijnen Gevoeligheidsbepalingen (WRG). Standaardisatie van gevoeligheidsbepalingen. 2e supplement. RIVM, 1990.
10. Milne LM, Curtis GDW, Crow MR, Kraak WAG, Selkon JB. Comparison of culture media for detecting methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* and coagulase negative staphylococci. J Clin Pathol 1987; 40: 1178-81.
11. O'Hara DM, Harrington CR, Reynolds PE. Immunological detection of penicillin-binding protein 2' in clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. FEMS Microbiology Letters 1989; 57:97-104.
12. Susuki E, Hiramatsu K, Yokota T. Survey of methicillin-resistant clinical strains of coagulase negative staphylococci for *mecA* gene distribution. Antimicrob Ag Chemother 1992; 36:429-34.
13. Hartman BJ, Tomasz A. Low-affinity penicillin-binding protein associated with β -lactam resistance in *Staphylococcus aureus*. J Bacteriol 1984; 158: 513-6.
14. Matsushashi M, Song MD, Ishino F, Wachi M, Dol M, Inoue M, Ubukata K, Yamashita N, Konno M. Molecular cloning of the gene of a penicillin - binding protein supposed to cause high resistance to β -lactam antibiotics in *Staphylococcus aureus*. J Bacteriol 1986; 167:975-80.

15. Tesch W, Strässle A, Berger-Bächli B, O'Hara D, Reynolds P, Kayser FH. Cloning and expression of methicillin resistance from *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus carnosus*. *Antimicrob Ag Chemother* 1988; 32:1494-9.
16. Ryffel C, Tesch W, Birch-Machin I, Reynolds PE, Barberis-Maino L, Kayser F, Berger-Bächli. Sequence comparison of *mecA* genes isolated from methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Gene* 1990; 94:137-8.
17. Hürlimann-Dalel RC, Ryffel C, Kayser F, Berger-Bächli B. Survey of the methicillin resistance-associated genes *mecA*, *mecRI-mecI*, and *femA-femB* in clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Ag Chemother* 1992; 36:2617-21.
18. Lencastre H de, de Jonge BLM, Matthews PR, Tomasz A. Review. Molecular aspects of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother* 1994; 33:7-24.
19. Hedin G, Hambræus A. Screening tests for the detection of methicillin resistance in *Staphylococcus epidermidis*. *J Antimicrob Chemother* 1991; 28:681-94.
20. Chambers HF, Hackbarth CJ. Effects of NaCl and nafcillin on penicillin-binding protein 2a and heterogeneous expression of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Ag Chemother* 1987; 31:1982-8.
21. Law D, Megson GM, Keaney MGL, Ganguli LA. The influence of salt concentration on the detection of methicillin resistance in coagulase-negative staphylococci. *J Antimicrob Chemother* 1992; 30:603-14.
22. Hartman BJ, Tomasz A. Expression of methicillin resistance in heterogeneous strains of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Ag Chemother* 1986; 29:85-92.
23. Madiraju MVVS, Brunner DP, Wilkinson BJ. Effects of temperature, NaCl, and methicillin on penicillin-binding proteins, growth, peptidoglycan synthesis, and autolysis in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Ag Chemother* 1987; 31:1727-33.
24. Bolmström A, Arvidson S, Ericsson M, Karlsson Å. A novel technique for direct quantification of antimicrobial susceptibility of microorganisms. Los Angeles, ICAAC, 1988: Abstract 1209.
25. Predari SC, Ligozzi M, Fontana R. Genotypic identification of methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci by polymerase chain reaction. *Antimicrob Ag Chemother* 1991; 35:2568-73.
26. Hedin G, Löfdahl S. Detecting methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* - disc diffusion, broth breakpoint or polymerase chain reaction? *APMIS* 1993; 101:311-8.
27. AB Biodisk, Solna Sweden. E-test technical guide. May 1993.

28. Baker CN, Thornsberry C, Hawkinson RW. Inoculum standardization in antimicrobial susceptibility testing: evaluation of overnight agar cultures and the rapid inoculum standardisation system. *J Clin Microbiol* 1983; 17:450-7.
29. Barry AL. Procedures for testing antimicrobial agents in agar media: theoretical considerations. In Lorian V (ed.), *Antibiotics in Laboratory Medicine*, 3rd ed. 1986 p.12-14, The William & Wilkins Co., Baltimore.
30. Bignardi GE, Riley U, Easmon CSF. Use of the E-test for methicillin sensitivity testing. *J Antimicrob Chemother* 1993; 32:37-43.
31. Hedin G. *Staphylococcus epidermidis*-hospital epidemiology and the detection of methicillin resistance. *Scan J Infect Dis* 1993; suppl 90.
32. McDougal LK, Thornsberry C. The role of β -lactamase in staphylococcal resistance to penicillinase-resistant penicillins and cephalosporins. *J Clinical Microbiology* 1986; 23:832-9.
33. Milne LM, Crow MR, Emptage AGM, Selkon JB. Effects of culture media on detection of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* and coagulase negative staphylococci by disc diffusion methods. *J Clin Pathol* 1993; 46:394-7.
34. Woods GL, Hall GS, Rutherford I, Pratt KJ, Knapp CC. Detection of methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis*. *J Clinical Microbiology* 1986; 24:349-52.
35. Hindler JA, Interlied CB. Effect of the source of Mueller-Hinton agar and resistance frequency on the detection of methicillin - resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clinical Microbiology* 1985; 21:205-10.
36. NCCLS: National Committee for Clinical Laboratory Standards. Evaluating production lots of dehydrated Mueller-hinton agar. NCCLS document M6-T tentative standard 1993. NCCLS, Villanova, Pennsylvania, 1985.
37. McDougal LK, Thornsberry C. New recommendations for disk diffusion antimicrobial susceptibility tests for methicillin-resistant (heteroresistant) staphylococci. *J Clinical Microbiology* 1984; 19:482-8.
38. Barry AL, Jones RN. Reliability of high-content disks and modified broth dilution tests for detecting staphylococcal resistance to the penicillinase-resistant penicillins. *J Clin Microbiol* 1987; 25:1897-1901.
39. Coudron PE, Jones DL, Dalton HP, Archer GL. Evaluation of laboratory tests for detection of methicillin-resistant. *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *J Clin Microbiol* 1986; 24:764-9.
40. Boyce JM, Medeiros AA, Papa EF, O'Gara CJ. Induction of β -lactamase and methicillin resistance in unusual strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother* 1990; 25:73-81.

- 41 Sanchez ML, Jones RN. E-test, an antimicrobial susceptibility testing method with broad clinical and epidemiologic application. The Antimicrobial Newsletter (ANNLDO) 1993; 8:1-8.
42. Brown FJ, Brown L. Evaluation of the E-test, a novel method of quantifying antimicrobial activity. J Antimicrob Chemother 1991;27:185-90.

Tabel 1 CNS, E-test oxacilline, meticilline; aantal stammen
(n=40) met losliggende kolonies in de remzone

		incubatie 30°C				incubatie 37°C			
		24 uur		48 uur		24 uur		48 uur	
		L	H	L	H	L	H	L	H
Mueller Hinton									
0% NaCl	Oxa	-	-	3	2	-	-	2	1
	Meti	-	-	6	4	-	1	2	1
2% NaCl	Oxa	-	-	2	-	1	-	2	-
	Meti	-	-	1	1	2	1	3	1
5% NaCl	Oxa	-	-	-	-	-	-	-	-
	Meti	-	-	-	-	1	-	2	1
Columbia									
0% NaCl	Oxa	-	-	4	1	1	2	2	7
	Meti	-	-	5	3	-	2	2	10
2% NaCl	Oxa	1	1	3	2	5	3	12	8
	Meti	1	-	3	2	7	1	11	8
5% NaCl	Oxa	-	-	-	-	3	-	4	2
	Meti	-	-	-	1	2	1	3	3
PDM									
0% NaCl	Oxa	-	-	2	3	2	4	7	8
	Meti	-	-	7	4	2	4	4	12
2% NaCl	Oxa	-	2	6	4	5	1	11	6
	Meti	1	2	7	4	8	2	16	7
5% NaCl	Oxa	-	-	1	1	1	1	3	2
	Meti	-	-	1	1	1	1	3	1

L = inoculum 10⁶ cfu/ml

H = inoculum 10⁸ cfu/ml

Tabel 2 CNS, E-test meticilline; aantal stammen (n=40)
met paradoxaal effect rondom strip

	incubatie 30°C				incubatie 37°C			
	24 uur		48 uur		24 uur		48 uur	
	L	H	L	H	L	H	L	H
Mueller Hinton								
0% NaCl	1	6	4	9	4	6	7	9
2% NaCl	2	4	10	10	-	-	-	-
5% NaCl	1	-	6	3	-	-	-	-
Columbia								
0% NaCl	-	4	-	3	-	-	-	-
2% NaCl	-	6	2	7	-	4	-	5
5% NaCl	-	8	5	10	4	9	7	13
PDM								
0% NaCl	1	3	1	3	-	1	-	1
2% NaCl	-	7	4	8	-	5	-	5
5% NaCl	1	4	6	7	3	5	5	7

L = inoculum 10^6 cfu/ml

H = inoculum 10^8 cfu/ml

Tabel 3 E-test: aantal CNS met *mecA* (n=25) resistent voor oxacilline (≥ 4 mg/l) en meticilline (≥ 16 mg/l)

		incubatie 30°C				incubatie 37°C			
		24 uur		48 uur		24 uur		48 uur	
		L	H	L	H	L	H	L	H
Mueller Hinton									
0% NaCl	Oxa	13	24	23	25	23	25	25	25
	Meti	7	18	20	23	20	25	23	25
2% NaCl	Oxa	14	23	24	25	24	25	24	25
	Meti	11	22	23	25	24	25	24	25
5% NaCl	Oxa	11	23	23	25	22	23	22	25
	Meti	11	23	22	24	21	24	22	25

Columbia									
0% NaCl	Oxa	12	24	18	22	15	22	18	23
	Meti	7	20	18	18	6	12	9	19
2% NaCl	Oxa	17	24	22	25	18	24	22	24
	Meti	16	22	20	22	17	21	19	24
5% NaCl	Oxa	19	24	21	25	23	23	23	25
	Meti	17	23	21	25	21	22	22	25

PDM									
0% NaCl	Oxa	12	22	17	22	10	22	16	23
	Meti	2	8	14	13	5	11	7	18
2% NaCl	Oxa	15	24	22	25	20	23	22	25
	Meti	11	23	22	25	17	24	22	25
5% NaCl	Oxa	17	23	23	24	21	23	23	24
	Meti	15	23	23	25	20	23	22	23

L = inoculum 10^6 cfu/ml

H = inoculum 10^8 cfu/ml

Tabel 4 Agar Dilutie test: aantal CNS met *mecA* (n=25) resistent voor oxacilline (≥ 4 mg/l) en meticilline (≥ 16) mg/l

		incubatie 30°C				incubatie 37°C			
		24 uur		48 uur		24 uur		48 uur	
		L	H	L	H	L	H	L	H
Mueller Hinton									
0% NaCl	Oxa	13	25	25	25	24	25	25	25
	Meti	7	15	9	20	18	24	22	25
2% NaCl	Oxa	17	25	23	25	23	25	23	25
	Meti	16	24	21	25	23	25	23	25
5% NaCl	Oxa	6	24	22	24	21	22	22	24
	Meti	20	24	23	24	23	24	23	25

Columbia									
0% NaCl	Oxa	16	25	23	25	20	25	24	25
	Meti	6	21	17	24	7	17	12	23
2% NaCl	Oxa	20	25	25	25	21	25	23	25
	Meti	16	25	22	25	12	25	21	25
5% NaCl	Oxa	23	25	23	25	23	25	23	25
	Meti	22	24	23	25	22	24	22	25

PDM									
0% NaCl	Oxa	6	22	16	24	12	22	20	25
	Meti	2	10	5	17	4	10	6	21
2% NaCl	Oxa	12	24	21	25	9	25	21	25
	Meti	6	24	17	22	10	24	20	25
5% NaCl	Oxa	17	23	22	24	21	24	22	25
	Meti	10	24	21	24	17	23	22	24

L = inoculum 10^6 cfu/ml

H = inoculum 10^8 cfu/ml

Tabel 5 Agar Dilutie test: aantal CNS zonder *mecA* (n=15) resistent voor oxacilline (≥ 4 mg/l) en meticilline (≥ 16) mg/l

		incubatie 30°C				incubatie 37°C			
		24 uur		48 uur		24 uur		48 uur	
		L	H	L	H	L	H	L	H
Mueller Hinton*									
0% NaCl	Oxa	-	-	-	1(K)	-	-	-	1(K)
	Meti	-	-	-	-	-	-	-	1
2% NaCl	Oxa	-	-	-	-	-	-	-	-
	Meti	-	-	-	-	-	1	-	3(K)
5% NaCl	Oxa	-	-	-	-	-	-	-	2(K)
	Meti	-	-	-	2	-	1	-	2

Columbia									
0% NaCl	Oxa	-	-	-	-	-	-	-	-
	Meti	-	1(K)	-	3(K)	-	1	-	1(K)
2% NaCl	Oxa	-	-	-	-	-	-	-	-
	Meti	-	1(K)	-	3(K)	-	2(K)	-	3(K)
5% NaCl	Oxa	-	-	-	1	-	1	-	2(K)
	Meti	-	2(K)	-	3(K)	-	3(K)	-	5(K)

PDM									
0% NaCl	Oxa	-	-	-	-	-	-	-	-
	Meti	-	-	-	-	-	-	-	-
2% NaCl	Oxa	-	-	-	-	-	1	-	-
	Meti	-	-	-	-	-	-	-	-
5% NaCl	Oxa	-	-	-	2(K)	-	2(K)	-	2(K)
	Meti	-	-	-	1	-	-	-	1(K)

L = inoculum 10^6 cfu/ml

H = inoculum 10^8 cfu/ml

K = doorgroei met losliggende kolonies

* = 1 stam niet gegroeid

Opmerking

Alle overige stammen zonder *mecA* zijn bij de agardiffusie test gevoelig voor oxacilline (in feite ≤ 2 mg/l) en meticilline (in feite ≤ 4 mg/l)

Figuur 1

CNS, E - test Methicillin 10⁸ cfu/ml 37°C 24h

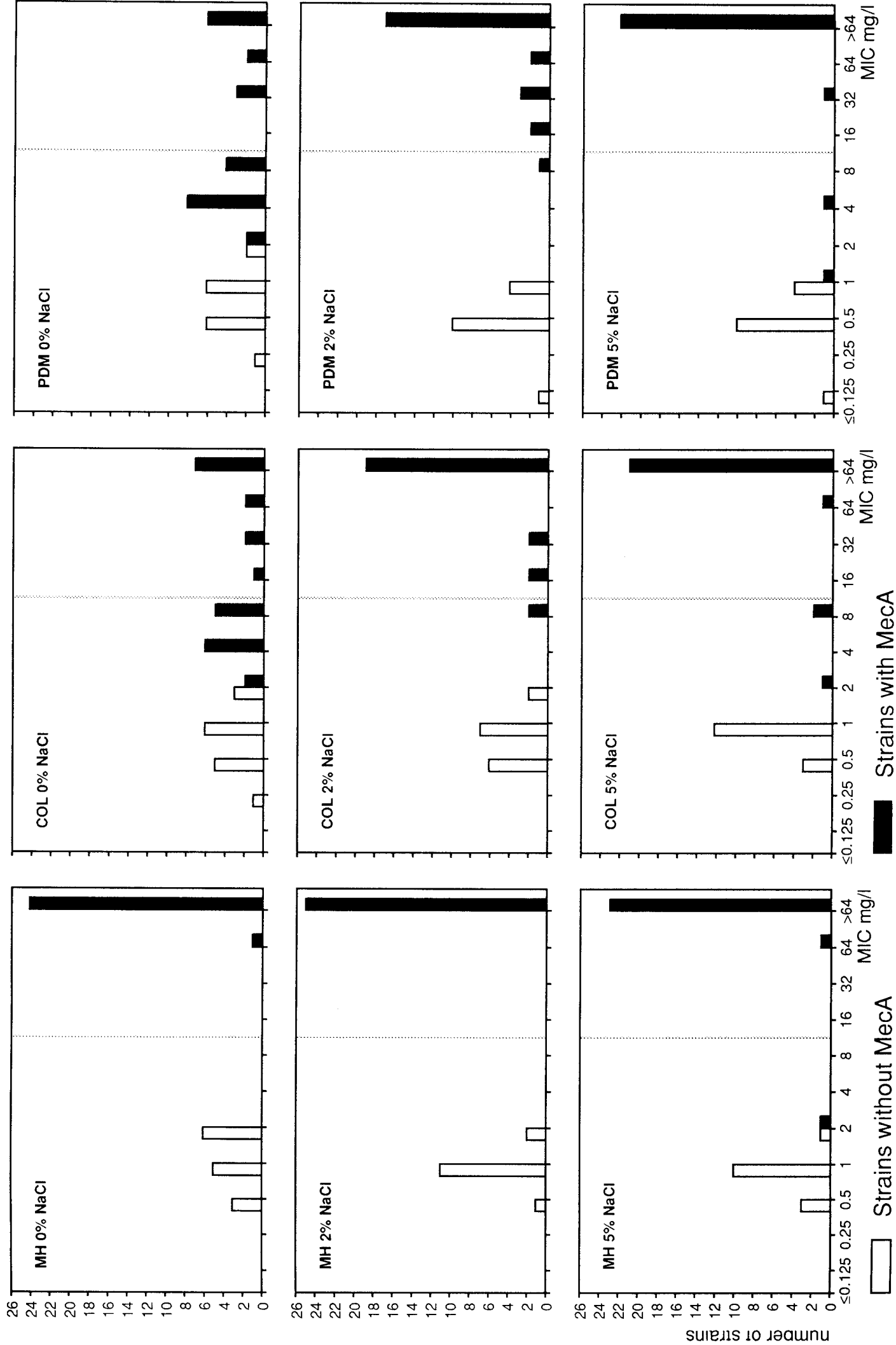
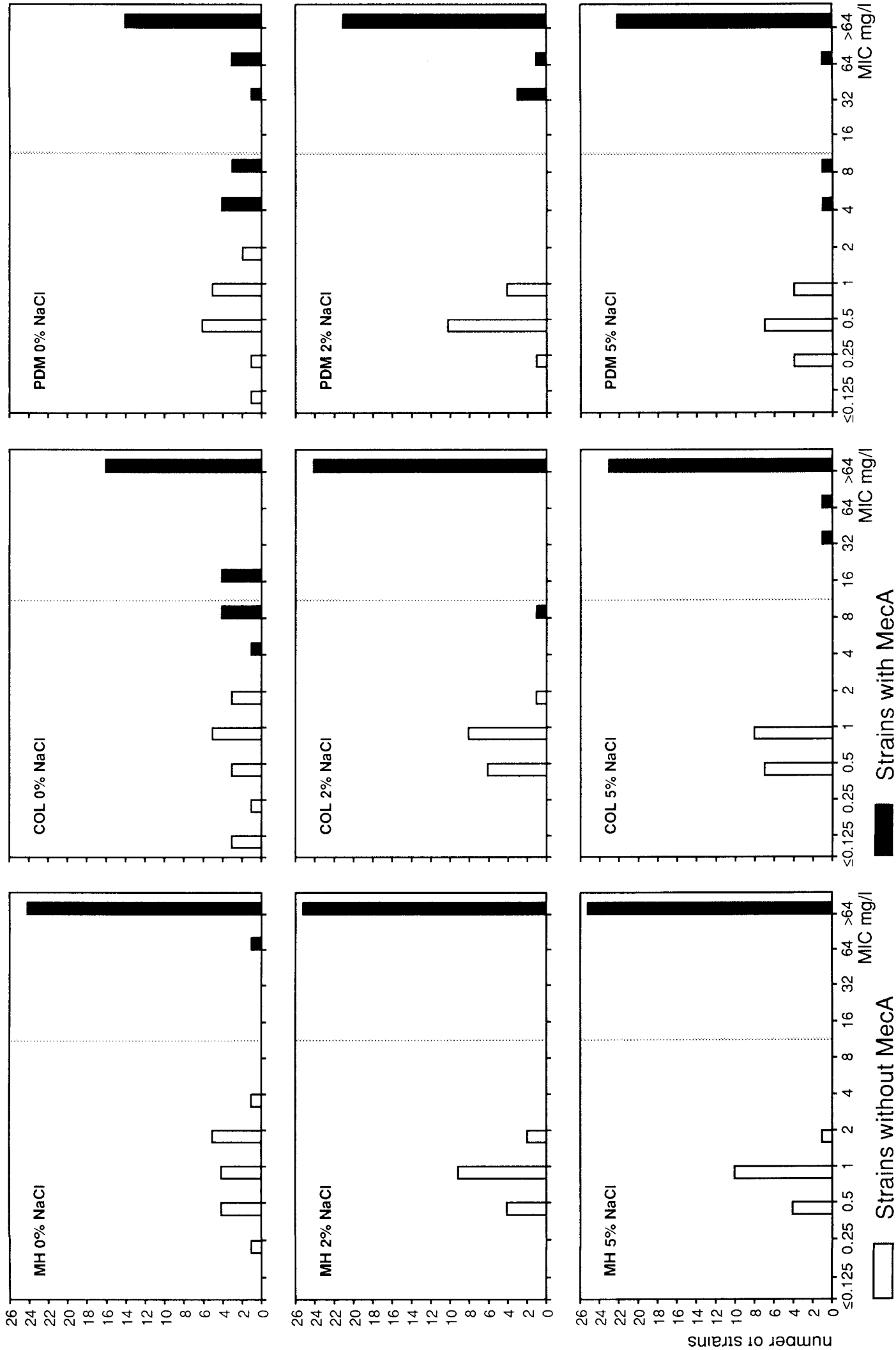


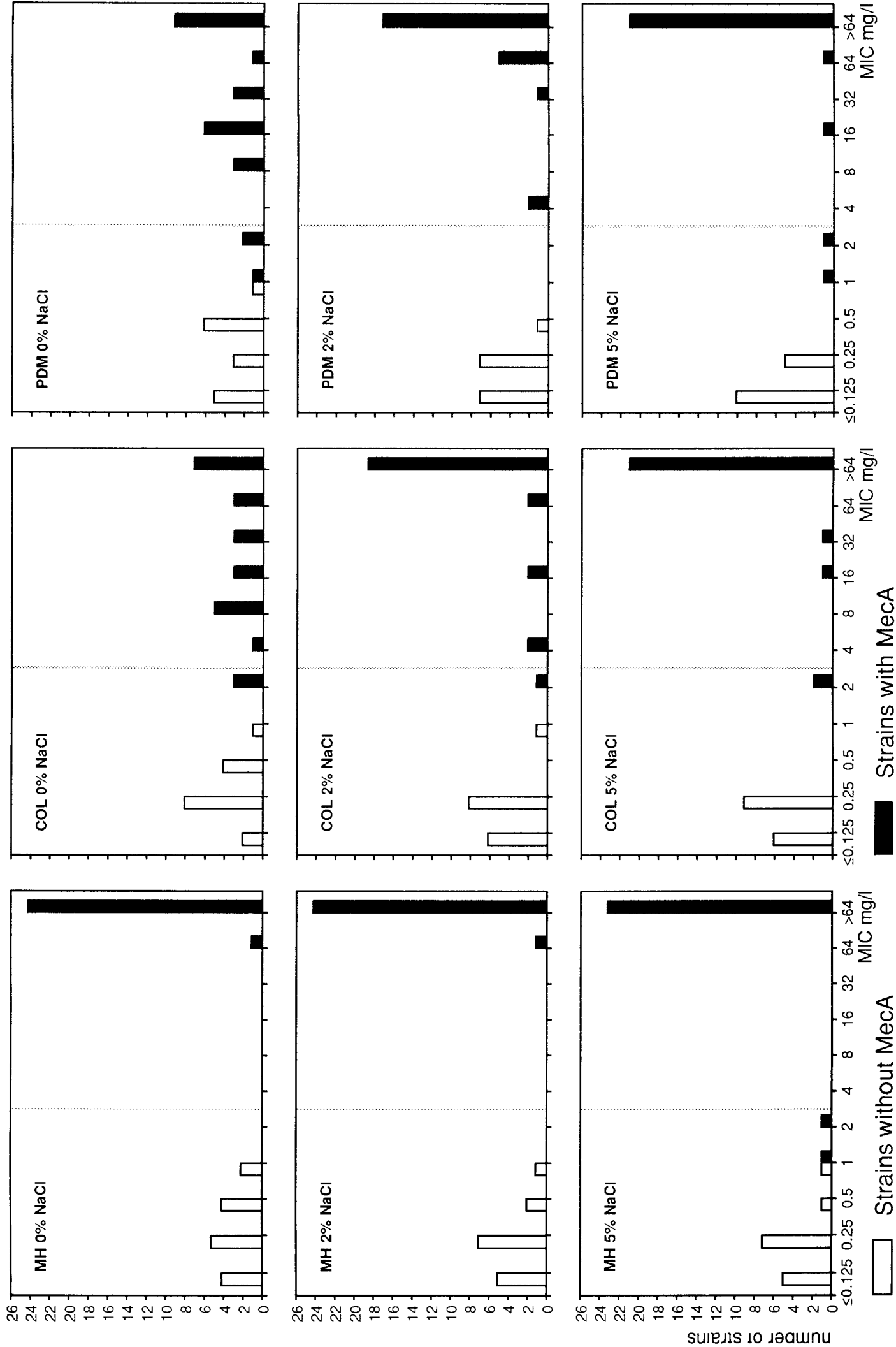
Figure 2

CNS, E - test Methicillin 10⁸ cfu/ml 37°C 48h



Figuur 3

CNS, E - test Oxacillin 10⁸ cfu/ml 37°C 24h



Figuur 4

CNS, E - test Oxacillin 10⁸ cfu/ml 37°C 48h

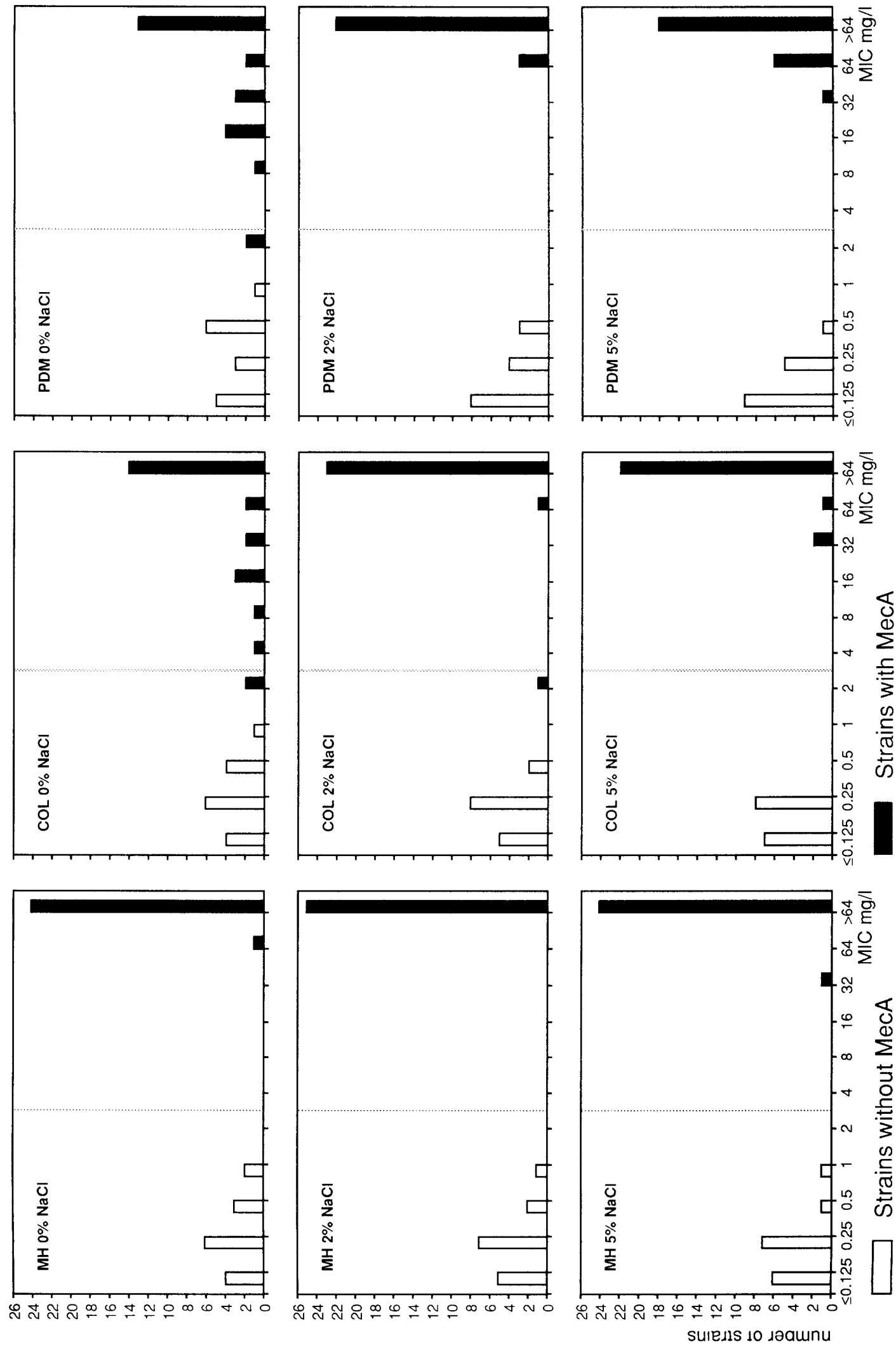
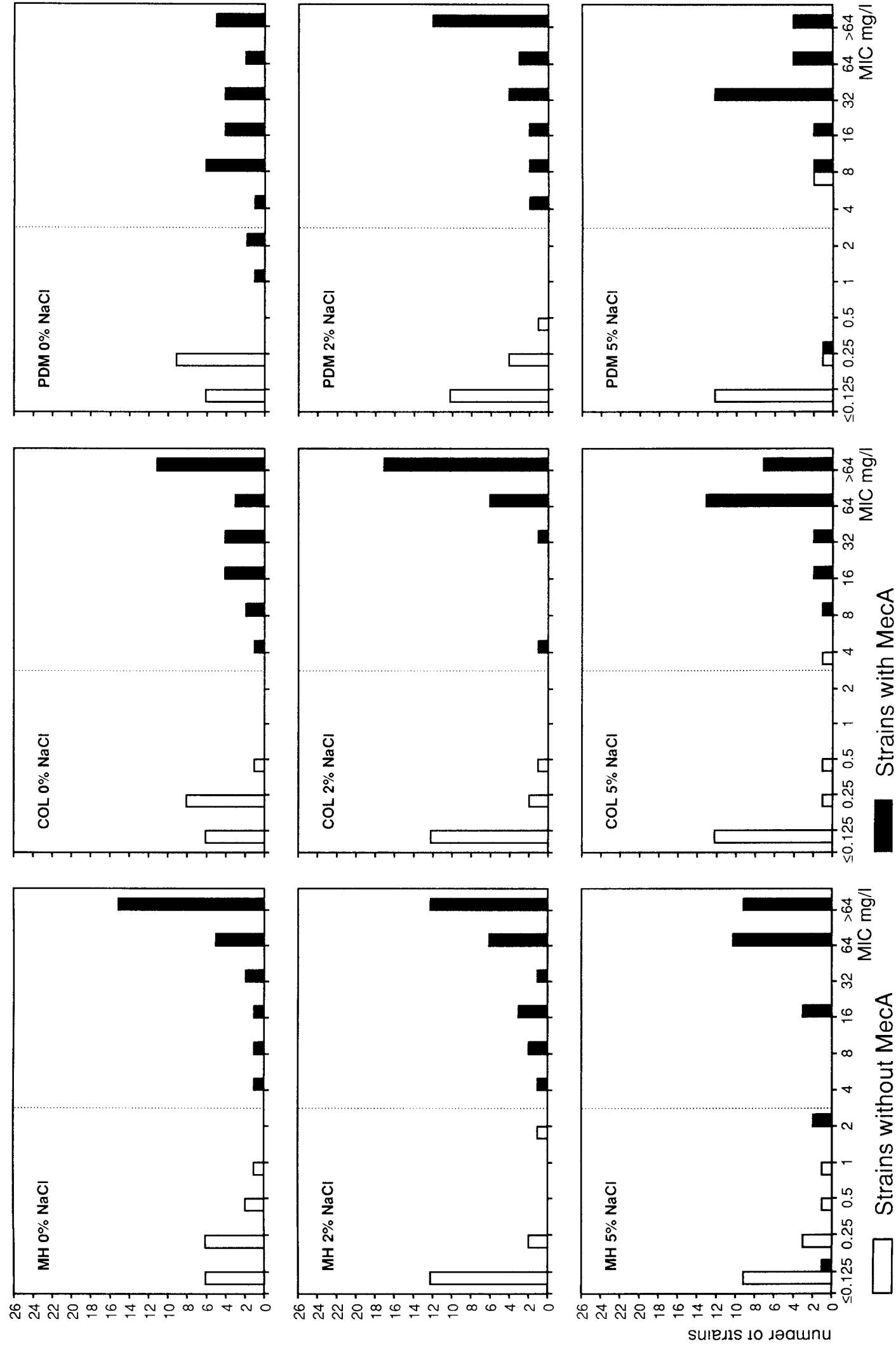


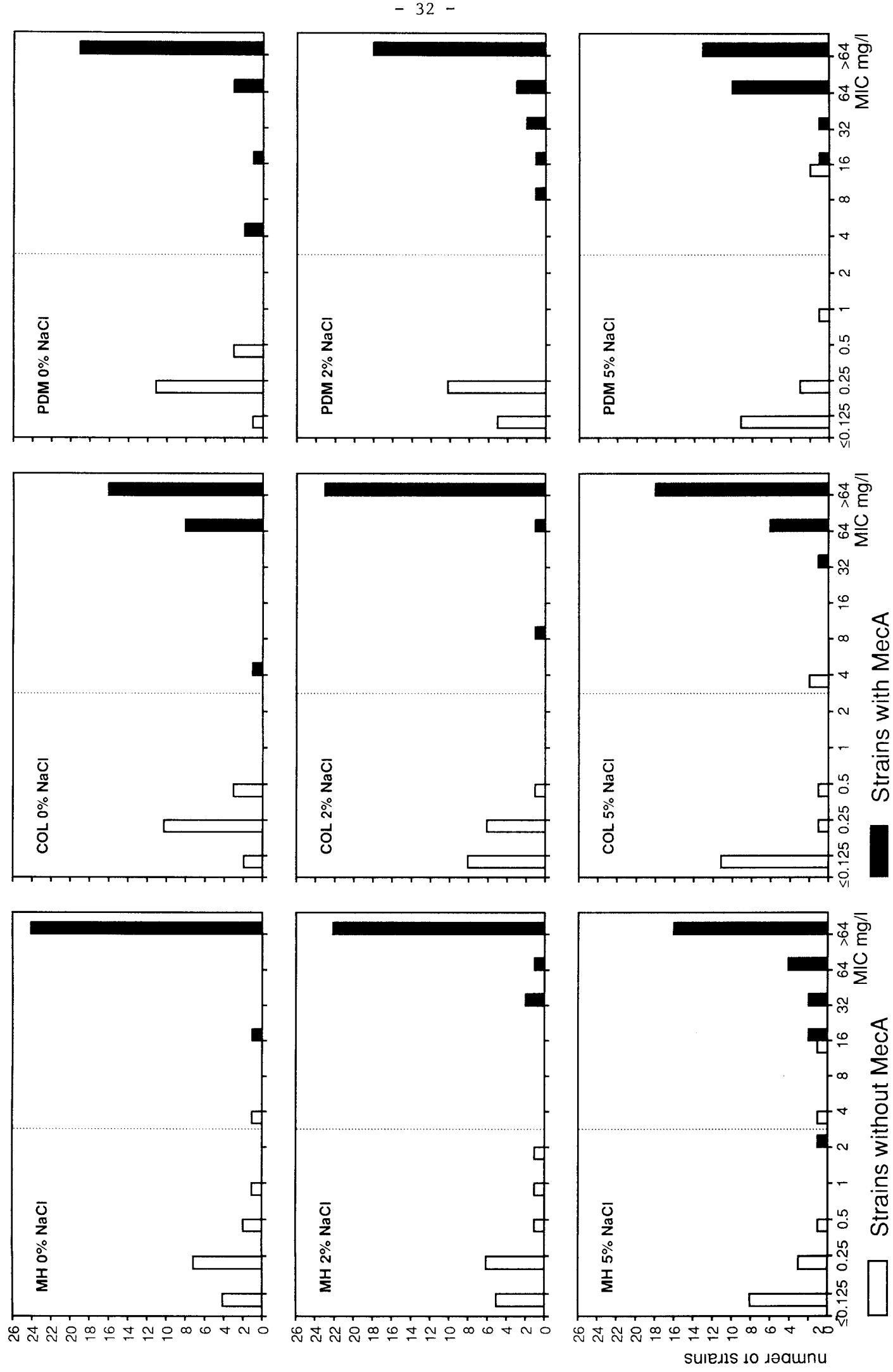
Figure 5

CNS, Agar Dilution Oxacillin 10⁸ cfu/ml 37°C 24h



Figuur 6

CNS, Agar Dilution Oxacillin 10⁸ cfu/ml 37°C 48h



CNS, Agar Dilution Methicillin 10⁸ cfu/ml 37°C 24h

Figuur 7

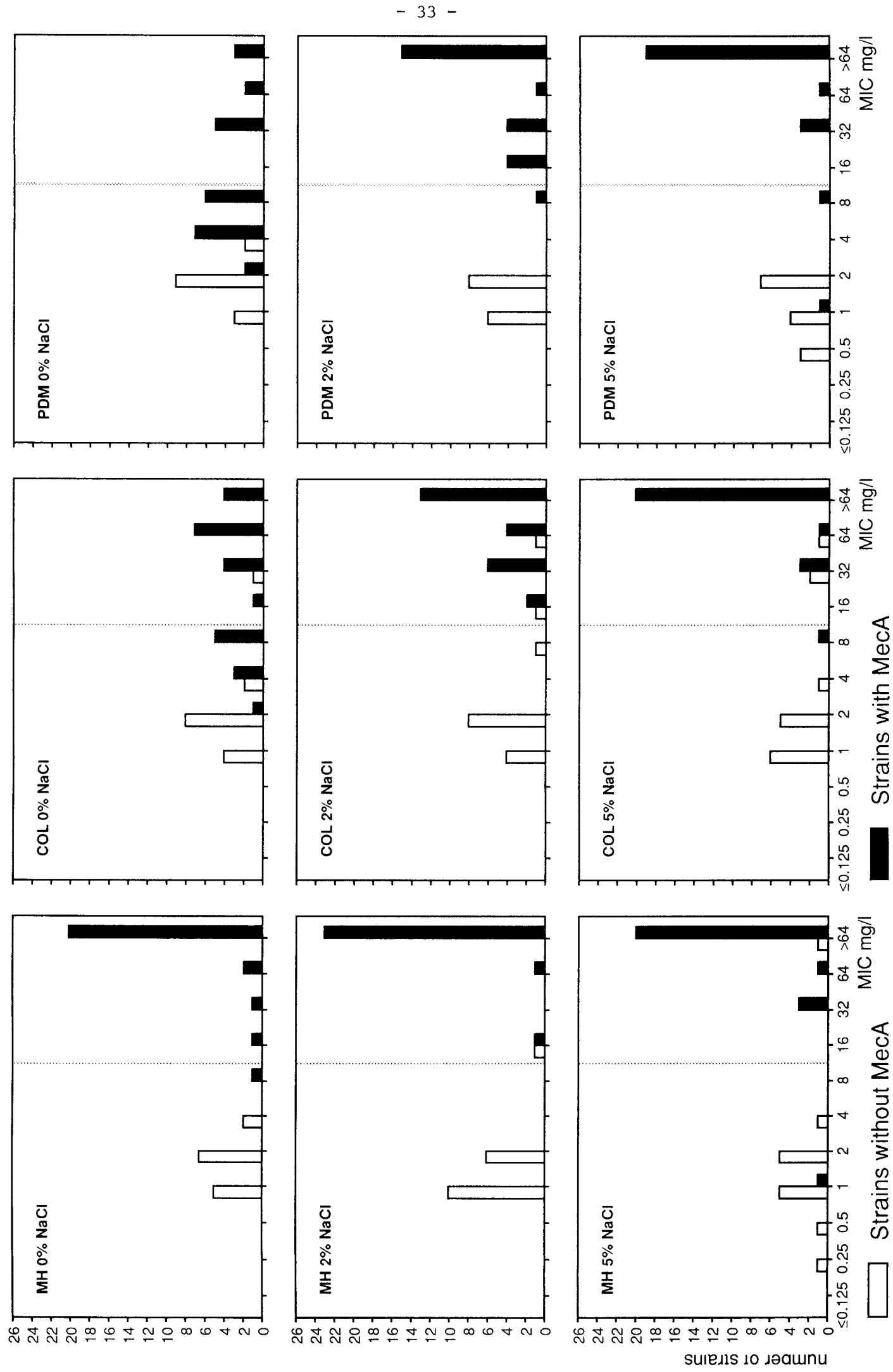


Figure 8

CNS, Agar Dilution Methicillin 10⁸ cfu/ml 37°C 48h

