

Påvisning av methicillinresistens i Stafylokokker

Truls Leegaard
NordicAST workshop
Göteborg 27. mai

Bakgrunn

- Methicillin/oxacillin resistente stafylokokker, både *Staphylococcus aureus* (MRSA) og koagulase negative stafylokokker (MRSE), forårsager en lang række infektioner herunder alvorlige infektioner.
- MRSA er internationalt et betydeligt problem, mens antallet af MRSA infektioner i Norden fortsat er begrænset.
- MRSE er væsentligt hyppigere end MRSA. De er ofte multiresistente i tillæg til methicillinresistensen og således kan give vanskeligt behandlelige infektioner især fremmedlegeme relaterede infektioner.

Mekanismer

- Methicillin resistens skyldes dannelsen af et ekstra penicillin bindende protein (PBP2a eller det nyligt fundne PBP2c) . PBP2a/2c har lav affinitet og derfor resistente til alle β -laktam antibiotika undtagen den nye klasse af anti-MRSA cephalosporiner. PBP2a kodes af *mecA* och PBP2c av *mecC* (*mecAlga251*) .
- *mec* genet er placeret i Staphylococcal cassette chromosome *mec* elementet og findes ikke i methicillin følsomme stafylokokker. Ekspressionen af *mecA* /*mecC* og hermed PBP2a/2c er meget variabel og den uinducerede resistensgrad er derfor meget variabel så en del stammer trods tilstedeværelse af *mecA/mecC* har meget lav MIC til oxacillin. Tilsvarende fænomen ses i mindre grad för cefoxitin Cefoxitin kan anvendes som et meget pålideligt screenings middel til at detektere MRSA (meget høj sensitivitet og specificitet) og til en hvis grad MRSE (høj sensitivitet, lavere specificitet) NordicAST anbefaler derfor, at cefoxitin bruges til detektion af methicillin resistens.
- Få, *S. aureus* isolater udviser lavresistens mod oxacillin men ikke mod cefoxitin og er *mecA/mecC* og PBP2a/2c negative. Disse kendes under betegnelsen "borderline susceptible *S. aureus* (BORSA)". Resistensmekanismen hos disse er oftest dårligt karakteriseret/ukendt men kan inkludere hyperproduktion af β -lactamases eller ændring af de eksisterende PBPs

Metode

- Methicillin/oxacillin resistens kan detekteres både fænotypisk med disk diffusion, MIC (herunder automatiserede metoder) eller genotypisk med PCR. Observer, at der er forskellige species specifikke MIC/zone brydepunkter.

Brytningspunkttabellen

Cefoxitin (screen) <i>S.aureus</i> , <i>S.lugdunensis</i> och <i>S. saprophyticus</i>	4	4	30	22	22
Cefoxitin (screen) Övriga koagulasnegativa stafylokker	Note	Note	30	25	25
Cefoxitin (screen) , <i>S. pseudintermedius</i>	Note	Note	30	35	35

Benytt kun lappediffusjon. Sonebrytningspunktene er kun gyldige ved tydelig konfluerende vekst.

Fænotypisk detektion

- Inkubering: Ved fænotypiske metoder er det vigtigt at inkubere pladerne ved maksimum 35°C. Der inkuberes i 18 t ± 2 t. Disk diffusion: Standard EUCAST disk diffusions metode med cefoxitin Bouillon MIC - (mikrotitter): For cefoxitin anvendes standard EUCAST metode i Kation-supplementeret Mueller Hinton bouillon, inokulat på 5x10E05 CFU/mL. For oxacillin anvendes Kation-supplementeret Mueller Hinton bouillon supplementeret med 2% NaCl (w/v; 0.34mol/L), inokulat på 5x10E05 CFU/mL. .
- Automatiseret MIC bestemmelse anvender sig ofte af en kombination af cefoxitin og oxacillin MIC, kombineret med expert systems tolkning. Producentens forskrift følges.
- Gradient test. Cefoxitin udføres på MH agar, inokulat på 5x10E05 CFU/mL. Oxacillin udføres på kation-supplementeret Mueller Hinton agar supplementeret med 2% NaCl (w/v; 0.34mol/L), inokulat på 5x10E05 CFU/mL.
- Latex agglutinations kits for detektion af PBP2a proteinet. Følg anvisningerne fra producenten. Der er god korrelation til mecA for MRSA, korrelationen er dårligere for MRSE
- QC stamme: *S. aureus* ATCC 29213

Genotypisk detektion

- Genotypisk detektion af *mecA* gene med PCR. Både kommercielle samt in-house metoder kan anvendes. Det skal bemærkes at kommercielle kits oftest ikke anvender gensekvenser fra *mecA* genet, men i stedet gensekvenser fra *SCCmec*. kassetten. Dette kan give anledning til både falsk positive samt falsk negative resultater. Desuden kan *mecC* og PBP2c for nuværende ikke detekteres ved brug af kommercielle metoder. Primere og metoder for detektion af *mecC* er publiceret for nyligt (4,5) Såfremt eget laboratorium ikke udfører *mecC* PCR, bør isolatet sendes til regions/reference laboratorium.
- MRSA-isolater skal *mecA/mecC*-konfirmeres og sendes til nationalt referencelaboratorium.

Tolkning

- Se NordicAST-tabel. Det anbefales kun at teste med cefoxitin. Om der testes både med cefoxitin og oxacillin kan enkelte isolater udvise uoverenstemmelse mellem cefoxitin og oxacillin MIC ($R > 2 \text{ mg/L}$). Tolk ud fra nedenstående tabel. For isolater der er oxacillin MIC R men cefoxitin S bør der foretages genotypisk verifikation af epidemiologisk årsag (anmeldelse af *mecA/mecC* positive isolater).

Oxacillin MIC	Cefoxitin MIC eller disk diffusion	
	S	R
Oxacillin MIC R	Rapporter som R	Rapporter som R
Oxacillin MIC S	Rapporter som S	Rapporter som R

- For cefoxitin resistente stammer kan følgende antibiotika umiddelbart besvares som R: penicilliner (inklusive betalaktamase-hemmerkombinasjoner og betalaktamasestabile penicilliner), cefalosporiner (unntatt ceftaroline som må testes særskilt) og karbapenemer.

Nordiske referencelaboratorium:

- Norge: St.Olavs hospital i Trondheim
- Sverige: SMI i Stockholm
- Danmark: SSI i København