

Resistensbestemmelse af *Aerococcus* arter

Derya Carkaci

PhD-studerende, Cand. Scient.

Slagelse Sygehus, Klinisk Mikrobiologisk Afdeling
Statens Serum Institut
Roskilde Universitet
DANMARK



STATENS
SERUM
INSTITUT

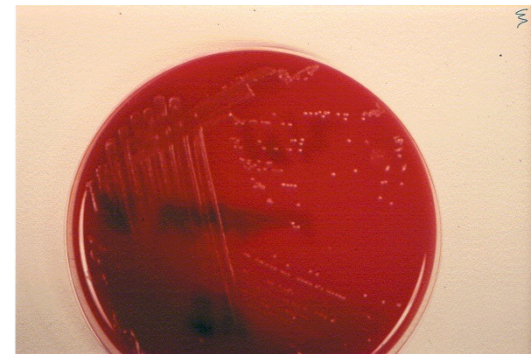
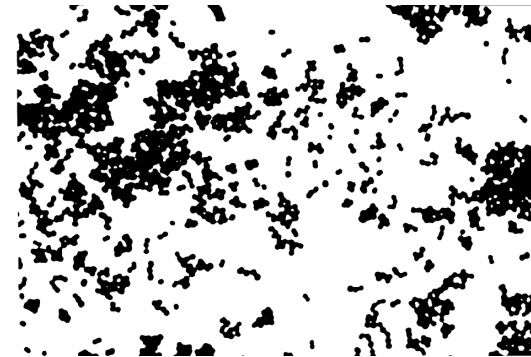


Genus *Aerococcus*

8 arter

- *Aerococcus viridans* (1953)
- ***Aerococcus urinae*** (1992)
- *Aerococcus christensenii* (1999)
- *Aerococcus urinaehominis* (2001)
- ***Aerococcus sanguincola*** (2001)
- *Aerococcus urinaeequi* (2005)
- *Aerococcus suis* (2007)
- *Aerococcus vaginalis* (2014)

- Gram-positive kokker i hobe
- Non-hæmolytiske
- Katalase-negativ



Sygdomsspektrum

Urinvejsinfektion

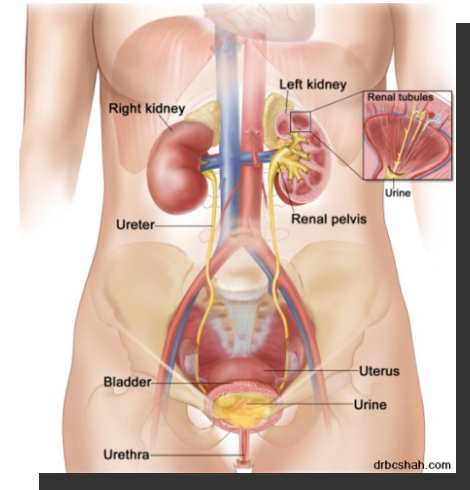
- Hyppigst

Bakteræmi/septikæmi

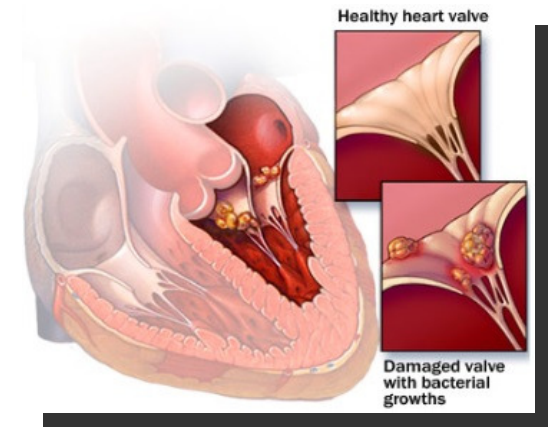
Infeksiøs endokarditis

- Sjælden

Turbulent blodgennemstrømning forårsager af bakteriel vegetation på hjerteklapperne.



Patogene mikroorganismer i urinvejene kan give urinvejsinfektion.



Vækst af *Aerococcus* sp. på hjerteklapperne hos patienter diagnosticeret med infektiøs endokarditis.



Epidemiologi

- Ældre gruppe af patienter med en medianalder på 75 år
- Underliggende årsag som diabetes, cancer eller kateter-relateret
- Findes hyppigst i urin, men kan også forekomme i blod
- Studier viser mellem 0,3-4 % af alle undersøgte urinvejsprøver
- Fatale konsekvenser



Diagnostik i laboratoriet

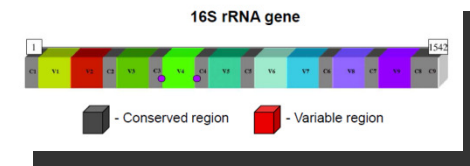
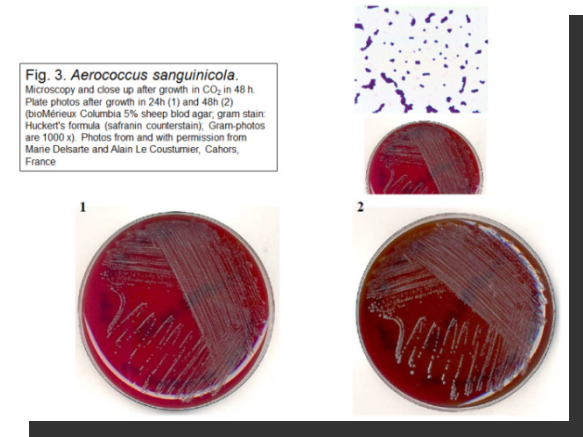
- 5 % blodagar-plader (α - og γ -hæmolytisk)
- + CO₂
- 24-48 timers inkubation

- **Species identifikation**

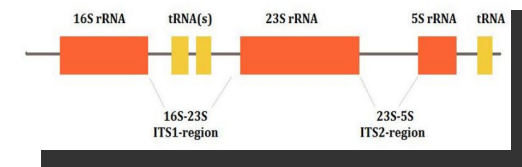
- MALDI-ToF MS
- Fænotypisk identifikation
- 16S rRNA gensekvensanalyse
- 16S-23S Intergenic Spacer Region sekvensanalyse



MALDI-ToF MS



16S rRNA gene sequence



16S-23S rRNA Intergenic Spacer Region 5

Prævalens

- Formentlig underestimeret prævalens
- Kan være vanskelig at dyrke og identificere
- Karakteristika
 - Staphylokok-lignende morfologi
 - Streptokok-lignende vækst-karakteristika (α - og γ -hæmolytisk)



Den norske Ringtest-undersøgelse

- QC prøver med *A. urinae* sendt til 24 norske laboratorier
- Udført i år 1999

RESULTATER

- 25 % finder *A. urinae*
- 46 % angiver streptokokker
- Ingen vækst i 2 ud af 24 → formentlig grundet insufficient vækst
- Gram negative kokker i et enkelt laboratorium

Gruppering	Identifikation	Antal laboratorier
Gram positive kokker (N=10)	<i>A. urinae</i>	6
	<i>A. viridans</i>	2
	Gram positive kokker	2
Streptokokker (N=11)	α-hæmolytisk Streptokokker	10
	<i>S. mitis</i>	1
Gram negative kokker (N=1)	---	1
Ingen vækst (N=2)	---	2

Resultater fra den norske Ringtest-undersøgelse foretaget i 1999.

Sandven & Lassen, "Ringtest for bakteriologi - 3/99,"
FOLKEHELSEA, Statens Institutt for Folkehelse, National Institute
of Public Health, Afdeling for Bakteriologi, 1999

A. urinae/A. sanguinicola
Klinisk Mikrobiologisk Afdeling (KMA)
Slagelse Sygehus, DK

430.000 analyser i 2014 på KMA Slagelse

- 109.000 blodanalyser
- 72.400 urinalyser

424 positive fund i rutinediagnostikken

- 403 urinprøver (95 %)
- 8 blodprøver (2 %)
- 13 prøver (podning, pus og væv) (3 %)

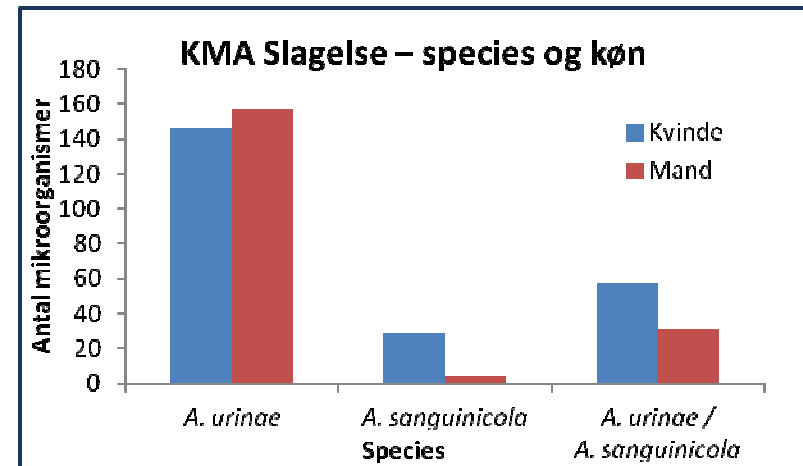
MALDI-ToF MS identifikation



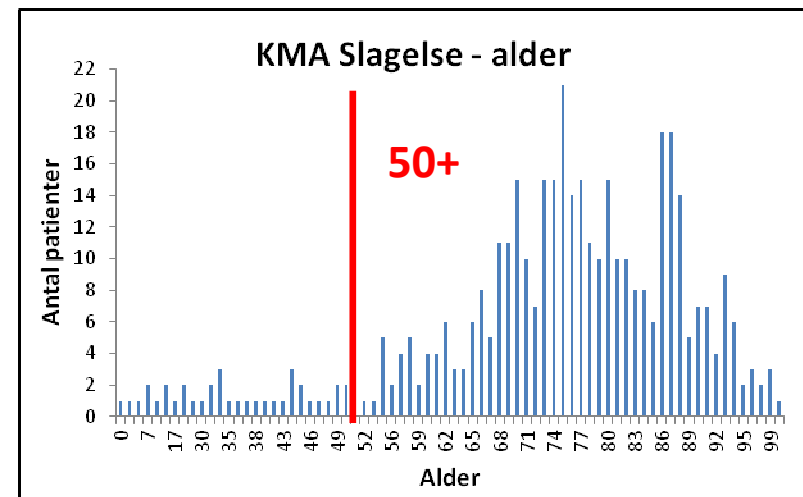
Incidens KMA Slagelse

Speciesfordeling

- *A. urinae* i 303 af prøverne (71 %)
- *A. sanguinicola* i 33 af prøverne (8 %)
- *A. urinae/A. sanguinicola* i 88 af prøverne (21 %)
- Lidt flere kvinder (55 %) end mænd (45 %)
- 50+ patienter



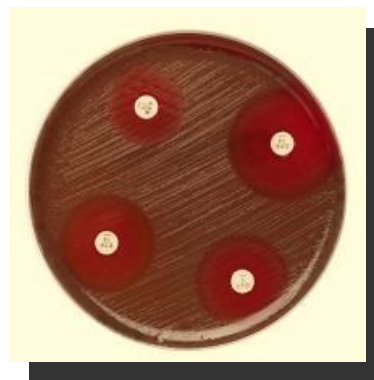
Fordeling af *A. urinae*, *A. sanguinicola* og *A. urinae/A. sanguinicola* stammer baseret på køn, KMA Slagelse 2014 opgørelse.



Opgørelse over patientalder ved fund af *A. urinae* og *A. sanguinicola* på KMA Slagelse baseret på 2014 opgørelse.

Resistensbestemmelse af kræsne mikroorganismer

- Resistensbestemmelse af kræsne mikroorganismer kan være udfordrende
- Det samme kan være gældende for *A. urinae*/*A. sanguinicola*
- I dag findes ingen EUCAST breakpoints for *A. urinae*/*A. sanguinicola*



Projektsamarbejde

Slagelse Sygehus (Klinisk Mikrobiologisk Afdeling), DK

Statens Serum Institut (Afdeling for Mikrobiologi og Infektionskontrol), DK

EUCAST Development Laboratory, Växjö, SE



FORMÅL

Definere breakpoints for *A. urinae* og *A. sanguinicola* stammer baseret på EUCAST metodologi og sammenligne med et kommercielt system

Metode

Antibiotika resistensmetoder:

- Diskdiffusion (EUCAST metodologi)
- Etest (EUCAST metodologi)
- Kommercielt bouillionfortynding (Sensititre)



8 forskellige antibiotika

- Penicillin
- Cefotaxime
- Meropenem
- Erythromycin
- Clindamycin
- Vancomycin
- Linezolid
- Rifampicin



Studiedesign

Stammesamling

- Kliniske *A. urinae* (N=81) og *A. sanguinicola* (N=39) isolater fra Danmark, Schweiz og Spanien
- *A. urinae* og *A. sanguinicola* typestammer
- Stammer isoleret fra
 - Urin → Urinvejsinfektion
 - Blod → Infektøs endokarditis eller septikæmi



Metodegennemgang

Diskdiffusion og Etest

- Mueller-Hinton Fastidious (MH-F) plader med 5% hesteblood og β -NAD
- Inkubation i 16-20 timer ved 35 °C med 5 % CO₂

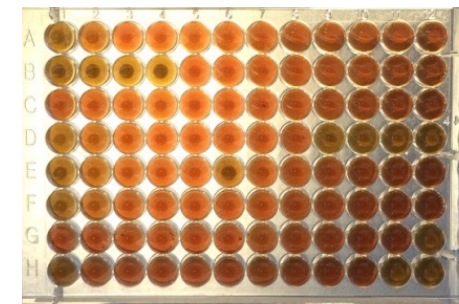
Sensititre

- Kommerciel MH-F bouillion med 5 % hesteblood og β -NAD
- Sensititre STP6F plader
- Inkubation i 16-20 timer ved 35 °C med atmosfærisk luft

Inokulum: McFarland 1



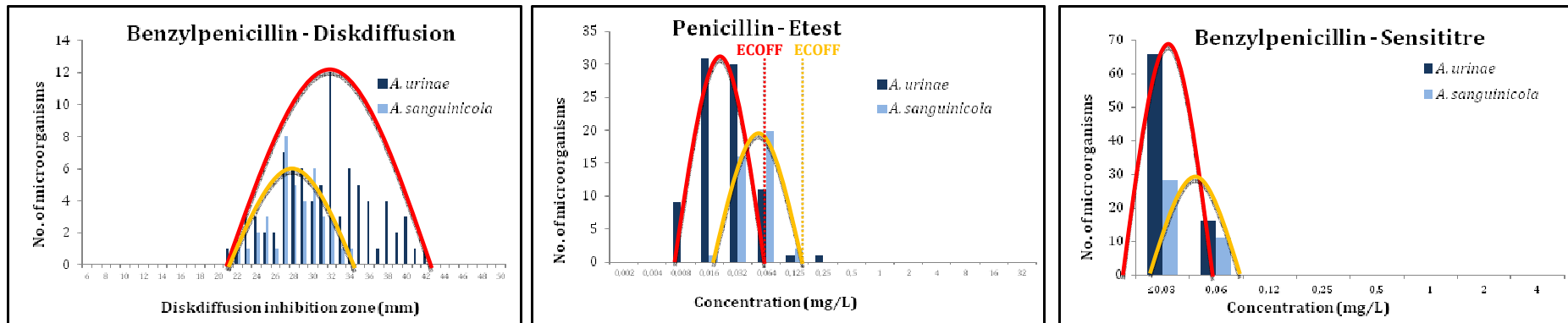
Aflæsning af bakteriel vækst på Sensititre STP6F plader.



Sensititre STP6F plader efter 1 døgns inkubation.

Resultater

- Zonediameter og MIC-værdierne aflæst efter 16-20 timers inkubation
- Forlænget inkubationstid til 40-44 timer for N=15 *A. urinae* stammer
- *A. sanguinicola* vokser generelt bedre end *A. urinae*, både på MH-F plader og MH-F bouillion



— *A. urinae*
— *A. sanguinicola*

Resultater

- *A. urinae* og *A. sanguinicola* er alle følsomme overfor penicillin, cefotaxime, meropenem, erythromycin, clindamycin, vancomycin, linezolid og rifampicin

Antimicrobial agent			<i>A. urinae</i>			<i>A. sanguinicola</i>		
Method	Disc content	Etest strip content (mg/L)	Disc diffusion inhibition zone (mm)	Etest MIC (mg/L)	Sensititre MIC (mg/L)	Disc diffusion inhibition zone (mm)	Etest MIC (mg/L)	Sensititre MIC (mg/L)
Penicillin ^I	1 unit	0.002-32	21-42	0.008-0.125	≤0.03-0.06	22-34	0.016-0.125	≤0.03-0.06
Cefotaxime	5 µg	0.016-256	20-49	0.016-2	≤0.12-2	20-36	0.064-1	≤0.12-1
Meropenem	10 µg	0.002-32	26-56	0.004-0.25	≤0.25	29-47	0.032-0.125	≤0.25
Erythromycin	15 µg	0.016-256	25-41	0.032-1	≤0.25-1	24-38	0.064-0.5	≤0.25
Clindamycin	2 µg	0.016-256	12-39	0.032-1	≤0.12-1	12-32	0.032-1	≤0.12-0.5
Vancomycin	5 µg	0.016-256	19-29	0.125-1	≤0.5	18-24	0.25-1	≤0.5-1
Linezolid	10 µg	0.016-256	22-40	0.25-2	≤0.25-2	25-34	0.5-2	0.5-1
Rifampicin	5 µg	0.002-32	28-50	≤0.002-0.125	II	23-36	0.008-0.125	II

- Overensstemmelse mellem zonediameter og MIC-værdierne for Etest og Sensititre
- Generelt: Jo større zonediameter, jo lavere MIC

Resultater

- Forslag til ECOFF værdier baseret på Etest og Sensititre MIC
- ECOFF er ens for *A. urinae* og *A. sanguinicola*, undtagen for penicillin og rifampicin

ECOFF værdier for *A. urinae* og *A. sanguinicola* stammer for de 8 testede antibiotika. Rifampicin ECOFF-værdierne er kun baseret på Etest

	ECOFF værdier (mg/L)	
	<i>A. urinae</i>	<i>A. sanguinicola</i>
Penicillin	0,064	0,125
Cefotaxime	1	1
Meropenem	0,125	0,125
Erythromycin	0,5	0,5
Clindamycin	1	1
Vancomycin	1	1
Linezolid	2	2
Rifampicin	0,032	0,125

Opsummering



❖ EUCAST metodologi kan anvendes ved resistensbestemmelse af *A. urinae* og *A. sanguincola* stammer

❖ Alle stammer fundet følsomme for de 8 testede antibiotika (penicillin, cefotaxime, meropenem, erythromycin, clindamycin, vancomycin, linezolid og rifampicin)

❖ Overensstemmelse mellem zonediametre og MIC-værdier

❖ Endelig fastsættelse af breakpoints foretages i EUCAST-regi

Hvordan resistensbestemmes *A. urinae*/*A. sanguincola* på KMA Slagelse?

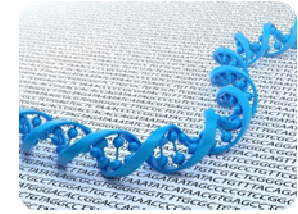
- EUCAST breakpoints som angivet for non-hæmolytiske streptokokker (zonediameter og MIC-bestemmelse)
- Førstevalg ved behandling: Penicillin (urinvejsfokus) eller penicillin+gentamycin (septikæmi, infektiøs endokarditis)

A. urinae/A. sanguinicola: Hvorfor er de interessante?

- De er formentlig underestimeret
- Kan give anledning til svære infektioner (septikæmi, infektiøs endokarditis)
- Få kendte virulensmekanismer og -faktorer
- Mit PhD-projekt



Mit PhD-projekt



Aerococcus Infective Endocarditis: A pathogenicity study based on comparative genomics and a model of experimental infective endocarditis

- Helgenom sekventering
- Kortlægning af virulensmekanismer og -faktorer
- Resistensmekanismer
- Eksperimentel infektiøs endokarditis



Miseq whole-genome sequencing machine



Samarbejdspartnere

Slagelse Sygehus, Klinisk Mikrobiologisk Afdeling, Danmark

Jens Jørgen Christensen

Xiaohui Chen Nielsen

Hanne Junker

Anne Bonde Jensen

Janne Fønns Møller



Statens Serum Institut, Afdeling for Mikrobiologi og Infektionskontrol, Danmark

Kurt Fuursted

Robert Skov



Roskilde Universitet, Institut for Natur, System og Modeller, Danmark

Ole Skovgaard



EUCAST Development Laboratory, Växjö, Sverige

Erika Matuschel

Jenny Åhman

Gunnar Kahlmeter



ADMED Microbiology, La Chaux de Fonds, Schweiz

Reto Lienhard



Department of Microbiology, Hospital Universitario Donostia, San Sebastián, Spanien

Emilio Pérez Trallero

