

RIJKSINSTITUUT VOOR  
VOLKSGEZONDHEID EN MILIEU  
BILTHOVEN

Rapportnr. 253601003

**Onderzoek naar de gevoeligheid van  
stafylokokken voor antibiotica met  
de microtiter-methode**

A.J.de Neeling<sup>1)</sup>, M.Dessens-Kroon<sup>1)</sup>,  
J.de Jong<sup>2)</sup>, B.P.Overbeek<sup>3)</sup>, C.P.Timmerman<sup>4)</sup>,  
B.van Klingereren<sup>1)</sup>

augustus 1995

Dit onderzoek werd verricht in opdracht en ten laste van de Hoofdinspectie voor de Preventieve en Curatieve Gezondheidszorg (voorheen Geneeskundige Hoofdinspectie van de Volksgezondheid)<sup>5)</sup> in het kader van project 253601

- 1) Laboratorium voor Bacteriologie en Antimicrobiële Middelen, RIVM, Postbus 1, 3720 BA Bilthoven, tel. 030-742889, fax 030-292957
- 2) Medische Microbiologie, Ziekenhuis Eemland, Postbus 1502, 3800 BM Amersfoort
- 3) Medische Microbiologie, Antonius Ziekenhuis, Koekoekslaan 1, 3435 CM Nieuwegein
- 4) Medische Microbiologie, Ziekenhuis Hilversum, van Riebeeckweg 212, 1213 XZ Hilversum
- 5) Ministerie van VWS, Postbus 5406, 2260 HK Rijswijk

**VERZENDLIJST**

- 1 - 5 Hoofdinspectie van de preventieve en curatieve Gezondheidszorg
- 6 Directeur-generaal van de Volksgezondheid
- 7 Drs.J.K.van Wijngaarden, arts, Hoofd Afdeling Infectieziekten van de Hoofdinspectie van de preventieve en curatieve Gezondheidszorg
- 8 Glaxo B.V.
- 9 Merck Sharpe & Dohme B.V.
- 10 SmithKline-Beecham B.V.
- 11 Eli Lilly B.V.
- 12 Depôt van Nederlandse publikaties en Nederlandse bibliografie
- 13 Directie Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieuhygiëne
- 14 Hoofd Voorlichting en Public Relations RIVM
- 15 Prof.dr.ir.D.Kromhout
- 16 Dr.J.G.Loeber
- 17 Dr.M.J.W.Sprenger
- 18 - 23 Auteurs
- 24 - 25 Bibliotheek
- 26 Bureau Projecten- en rapportenregistratie
- 27 - 50 Reserve exemplaren

**WOORD VOORAF**

Wij danken de analisten in de deelnemende laboratoria en mw. A. van Veen-Rutgers en mw. C.S. Schot voor hun medewerking. De firma's Glaxo B.V., Merck Sharpe & Dohme B.V., SmithKline-Beecham B.V. en Eli Lilly B.V. zijn wij erkentelijk voor hun financiële ondersteuning.

**INHOUDSOPGAVE**

VERZENDLIJST . . . . . 2

WOORD VOORAF . . . . . 3

INHOUDSOPGAVE . . . . . 4

ABSTRACT . . . . . 5

SAMENVATTING . . . . . 6

1. INLEIDING . . . . . 7

2. MATERIALEN EN METHODEN . . . . . 7

3. RESULTATEN . . . . . 9

4. DISCUSSIE . . . . . 14

5. LITERATUUR . . . . . 15

Figuur 1 . . . . . 16

**ABSTRACT**

The susceptibility to antibiotics was determined for 192 coagulase-positive and 259 coagulase-negative staphylococci. The isolates were obtained in three regional laboratories in The Netherlands and tested using the microdilution method. After incubation the turbidity was measured in a photometer and the results were analyzed using a computer program. Fewer than 5% of the isolates of *Staphylococcus aureus* were resistant to any of the antibiotics, except amoxycillin (73%  $\beta$ -lactamase producers). The percentages resistance for coagulase-negative staphylococci were generally higher: clindamycin (21%), erythromycin (33%), fusidic acid (14%), gentamicin (36%), doxycycline (12%), cotrimoxazole (27%) and ciprofloxacin (13%). The percentage  $\beta$ -lactamase producers was 69%.

## SAMENVATTING

De gevoeligheid voor antibiotica werd bepaald bij 192 coagulase-positieve en 259 coagulase-negatieve stafylokokken. De bacteriën werden geïsoleerd in drie regionale laboratoria en onderzocht met de microtiter-methode. De groei werd gemeten met een microtiter-scanner en de resultaten werden verwerkt met een computerprogramma. De resistentie van *Staphylococcus aureus* tegen de onderzochte antibiotica was lager dan 5%, behalve dat 73% van de isolaten  $\beta$ -lactamase vormde en dus resistent was tegen amoxicilline. Coagulase-negatieve stafylokokken waren vaker resistent, bijv. tegen clindamycine (21%), erytromycine (33%), fusidinezuur (14%), gentamicine (36%), doxycycline (12%), cotrimoxazol (27%) en ciprofloxacine (13%). Het percentage  $\beta$ -lactamase vormers was 69%.

## 1. INLEIDING

Dit is het verslag van een onderzoek naar de gevoeligheid voor antibiotica van stafylokokken met behulp van de microtiter-methode. Het doel van het onderzoek was enerzijds de microtiter-methode op zijn bruikbaarheid te testen, anderzijds de mate van resistentie vast te stellen. In het onderzoek participeerden drie regionale laboratoria (Amersfoort, Hilversum, Nieuwegein) en het RIVM (Laboratorium voor Bacteriologie en Antimicrobiële Middelen). Het onderzoek richtte zich zowel op de coagulase-positieve als op de coagulase-negatieve stafylokokken. Beide groepen worden vaak bij ziekenhuisinfecties geïsoleerd, met name bij infecties van de huid, wondinfecties en catheterinfecties.

## 2. MATERIALEN EN METHODEN

Microtiterplaatjes werden bereid in het RIVM. Het gebruikte medium was IsoSensitest-bouillon (Oxoid). De layout van het microtiterplaatje met de antibiotica en de gebruikte concentraties is weergegeven in fig. 1. De onderzochte antibiotica waren rifampicine (Sigma), ciprofloxacin (Bayer), clindamycine (Upjohn), vancomycine (Eli Lilly), amoxicilline (SmithKline Beecham), teicoplanine (Yamanouchi), amoxicilline+clavulaanzuur (SmithKline Beecham), cefuroxim (Glaxo), fusidinezuur (Leo), cefalotine (Eli Lilly), gentamicine (Schering), imipenem (MSD), erytromycine (Abbott), mupirocine (SmithKline Beecham), sulfamethoxazol+trimethoprim (Sigma) en doxycycline (Pfizer). Clavulaanzuur werd toegevoegd in een vaste concentratie van 2 mg/L.

De plaatjes werden gevuld met 200  $\mu$ l bouillon medium per cupje. Ze werden direct na bereiding bij  $-70^{\circ}\text{C}$  ingevroren en in bevroren toestand gedistribueerd naar de deelnemende laboratoria. Voor meticilline werden speciale plaatjes bereid met cation-supplemented Mueller Hinton bouillon (meticilline concentraties: 0 en 0.5-32 mg/L).

De plaatjes werden beënt met ca. 1  $\mu$ l van een bacteriesuspensie van ca.  $10^6$  CFU/ml (meticilline:  $10^8$  CFU/ml) door middel van een multipoint inoculator. De incubatie was 24 uur bij  $37^{\circ}\text{C}$  (meticilline-plaatjes bij  $30^{\circ}\text{C}$ ).

De plaatjes werden afgelezen met behulp van een microtiter-scanner (Titertek Multiskan MKII) bij 540 nm. Cupjes met een extinctie boven 0.2 AU werden als begroeid beschouwd.

Coagulase-negatieve stammen werden gedetermineerd met behulp van een Api-Staph strip.  $\beta$ -Lactamase werd bepaald in twee laboratoria met behulp van de zgn. klaverblad-methode.

Ter controle van de microtiter-methode werd de gevoeligheid van 16 coagulase-negatieve stafylokokken uit de peiling in het RIVM onderzocht met de agardilutie-methode. *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 en *Escherichia coli* ATCC 25922 werden hierbij als referentiestammen gebruikt. De meticilline-resistentie van 89 stafylokokken werd vergeleken met een agardilutie-methode.<sup>1)</sup> Voor zover beschikbaar werden de gevoeligheidsbreekpunten van de Werkgroep Richtlijnen Gevoeligheidsbepalingen gehanteerd (tabel 4).



### 3. RESULTATEN

#### Determinatie

Twee laboratoria determineerden de coagulase-negatieve stafylokokken met behulp van API-strips (tabel 1). Meer dan de helft van de stammen behoorde tot *Staphylococcus epidermidis*. De andere soorten waren vertegenwoordigd door slechts enkele stammen. Het is opvallend dat een aantal coagulase-negatieven met de API-strips als *Staphylococcus aureus* werd gedetermineerd.

Tabel 1 *Determinatieresultaten van coagulase-negatieve stafylokokken met API-strips*

	Hilversum	Amersfoort
<i>S. aureus</i>	3	15
<i>S. capitis</i>		3
<i>S. cohnii</i>	1	
<i>S. epidermidis</i>	46	63
<i>S. haemolyticus</i>	3	2
<i>S. hominis</i>	3	3
<i>S. hyicus</i>	3	
<i>S. lugdunensis</i>	6	2
<i>S. sciuris</i>	3	
<i>S. simulans</i>	2	3
<i>S. xylosus</i>	4	
niet te determineren	11	8
totaal	85	99

#### Controle experimenten

De resultaten van de bepaling van de meticilline-resistentie met de microdilutie-methode kwamen in het algemeen slecht overeen met die van de controle, de agardilutie-methode. Van de 89 onderzochte stammen waren er 24 gevoelig volgens de microtiter-methode, maar resistent met de agardilutie-methode. Zeven stammen waren

resistent met de microtiter-methode, doch gevoelig volgens de agardilutie-methode. Vanwege deze grote afwijkingen worden de resultaten van de meticilline-bepalingen in de microtiterplaatjes hier verder buiten beschouwing gelaten.

De resultaten van een controle experiment met de andere antibiotica waren beter (tabel 2). De MRC's in microtiter waren meestal lager dan de MRC's volgens de agardilutie-methode, maar in het algemeen lagen de microtiter-MRC's niet verder dan een factor 4 verwijderd van de controle-MRC's. Grotere verschillen traden slechts op bij teicoplanine (negen van de zestien stafylokokken hadden met de microtiter-methode een factor 8 tot 16 lagere MRC), bij cefalotine (één stam), imipenem (één stam) en doxycycline (één stam).

**Tabel 2** *Verhouding tussen de MRC in microtiter en de MRC in agar bij zestien stafylokokken; voor deze vergelijking werd een MRC groter dan de maximale waarde genomen als twee maal die waarde*

Antibioticum	Verhouding microtiter/agar						
	1/16	1/8	1/4	1/2	1	x2	x4
clindamycine				6	10		
amoxicilline				5	8	1	2
erytromycine				5	11		
Augmentin			2	3	10	1	
vancomycine				7	9		
fusidinezuur			1	8	7		
teicoplanine	5	4	5	1	1		
gentamicin					16		
cefalotine	1			6	9		
doxycycline		1		11	4		
mupirocine				5	11		
cotrimoxazol			6	2	8		
cefuroxim			4	4	3	4	1
ciprofloxacine				8	8		
imipenem		1	4	1	9		1

Resultaten microtiter-methode

Het totaal aantal coagulase-positieve en -negatieve stammen dat per laboratorium op gevoeligheid werd onderzocht is weergegeven in tabel 3.

Tabel 3 *Aantal coagulase-negatieve en -positieve stafylokokken dat per laboratorium op gevoeligheid is onderzocht en het aantal, waarvan de groeiconrole positief was*

lab.	aantal coagulase-positief		aantal coagulase-negatief	
	totaal	groei+	totaal	groei+
Hilversum	27	27	81	80
Amersfoort	100	100	95	93
Nieuwegein	99	65	101	86
totaal	226	192	277	259

De percentages stammen per MRC zijn vermeld in tabel 4 (coagulase-positief) en tabel 5 (coagulase-negatief). Elke laatste waarde in een kolom moet worden gelezen als "groter dan de voorlaatste waarde".

**Tabel 4** MRC-verdeling (%) van coagulase-positieve stafylokokken

	<u>rip</u>	<u>clin</u>	<u>ery</u>	<u>aug</u>	<u>amx</u>	<u>cef</u>	<u>cxm</u>	<u>imp</u>	<u>mup</u>	<u>van</u>	<u>fus</u>	<u>tcp</u>	<u>gen</u>	<u>dox</u>	<u>sxt</u>	<u>cip</u>
R-breekpunt:																
>	1	4	2	32	32	16	16	8	4*	8	1	8*	4	4	2	2
n.d.				0.5							0.5			0.5	0.5	0.5
0.001	93.8															
0.01	5.2															
0.0625		97.9						99.5							95.3	
0.125	-	0.5	97.9	93.8	28.7	38.5		-	95.8	0.5	91.7	70.8		87.5	3.7	29.2
0.25		0.5	-	4.7	5.7	57.3	19.3	-	3.1	0.5	2.1	25.5	30.7	6.8	-	63.5
0.5		-	-	-	28.7	2.1	68.8	-	-	55.2	1.0	2.1	49.0	1.6	0.5	4.7
1	0.5	-	-	0.5	24.5	0.5	9.9	-	-	41.7	0.5	0.5	16.2	0.5	-	-
2/>1	0.5	-	-	-	4.7	0.5	0.5	0.5	-	0.5	1.0	-	2.6	1.6	-	1.0
4/>2		-	-	-	2.1	0.5	0.5	-	0.5	1.0	1.0	0.5	0.5	1.0	-	0.5
8/>4		1.0	2.1	0.5	5.7	0.5	0.5		0.5	0.5	2.1	0.5	-	0.5		0.5
16/>8							0.5						1.0			
res.perc.	0.5	1.0	2.1	**	*	**	**	0.0	0.5	**	4.1	**	1.0	0.5	0.0	1.0

**Tabel 5** MRC-verdeling (%) van coagulase-negatieve stafylokokken

	<u>rip</u>	<u>clin</u>	<u>ery</u>	<u>aug</u>	<u>amx</u>	<u>cef</u>	<u>cxm</u>	<u>imp</u>	<u>mup</u>	<u>van</u>	<u>fus</u>	<u>tcp</u>	<u>gen</u>	<u>dox</u>	<u>sxt</u>	<u>cip</u>
R-breekpunt:																
>	1	4	2	32	32	16	16	8	4*	8	1	8*	4	4	2	2
n.d.			0.4	0.4		0.4	0.4				0.8	0.8				0.4
0.001	77.6															
0.01	14.3															
0.0625		75.3						84.6							33.0	
0.125	0.4	1.2	64.5	76.5	35.1	46.0		6.6	90.0	0.8	82.6	35.5		48.3	17.1	36.3
0.25		1.2	0.4	10.0	11.6	29.7	43.2	3.5	5.8	1.9	0.4	26.3	60.2	12.7	10.9	43.6
0.5		0.4	0.4	4.6	8.9	17.0	20.5	2.3	0.4	8.9	0.8	22.8	1.5	13.1	1.2	4.3
1	3.9	1.2	0.8	1.5	12.7	4.3	12.4	0.8	0.4	70.3	1.2	9.7	0.8	5.4	1.6	0.8
2/>1	3.9	0.4	0.4	2.3	9.3	0.4	10.4	-	-	17.4	2.7	1.9	-	3.9	8.9	1.5
4/>2		-	1.9	1.5	5.4	-	5.8	2.3	-	-	4.3	1.9	1.5	4.3	27.5	2.3
8/>4		20.5	31.3	3.1	17.0	2.3	2.7		3.5	0.8	7.3	1.2	1.9	12.4		10.8
16/>8							4.6						34.0			
res.perc.	3.9	20.5	33.2	**	*	**	**	**	**	**	14.3	**	35.9	12.4	27.5	13.1

\* resistentie bepaald door  $\beta$ -lactamasevorming

\*\* de hoogste onderzochte concentratie was lager dan het resistentie breekpunt: het resistentiepercentage is lager dan het laatste vermelde percentage

\* resistentie breekpunt nog niet vastgesteld door de WRG

$\beta$ -lactamase vorming

De laboratoria in Amersfoort en Nieuwegein bepaalden de vorming van  $\beta$ -lactamase. Het percentage  $\beta$ -lactamase vormers bij de coagulase-positieve bacteriën was 73% (n=165), bij de coagulase-negatieven was dit 69% (n=179).

Bij de vergelijking van de MRC-verdelingen van amoxicilline/clavulaanzuur en van amoxicilline bij coagulase-positieve stammen, valt op dat er nauwelijks stammen resistent waren tegen 0.25 mg/L amoxicilline met clavulaanzuur, terwijl 66% resistent was tegen 0.25 mg/L amoxicilline zonder clavulaanzuur, een percentage dat vrijwel gelijk is aan het percentage  $\beta$ -lactamase vormers (73%). Dit suggereert dat resistentie tegen amoxicilline bij *S. aureus* meestal is gekoppeld aan  $\beta$ -lactamase productie. Dat vermoeden wordt bevestigd, als de MRC-verdelingen van amoxicilline bij  $\beta$ -lactamase producerende en niet-producerende coagulase-positieve stammen met elkaar worden vergeleken (tabel 6). Bij de coagulase-negatieven zijn meer stammen die  $\beta$ -lactamase produceren maar toch een amoxicilline MRC  $\leq$  0.25 mg/L hebben.

**Tabel 6** *Aantal stammen per MRC van amoxicilline bij coagulase-positieve en -negatieve stammen,  $\beta$ -lactamase vormend (+bl) of niet (-bl)*

amoxicilline MRC (mg/L)	coagulase+		coagulase-	
	-bl	+bl	-bl	+bl
.125	41	7	38	31
.25	2	7	2	14
.5	2	52	4	12
1	0	45	5	16
2	0	6	1	19
4	0	2	0	8
> 4	0	1	5	24
totaal	45	120	55	124

#### 4. DISCUSSIE

De resultaten van de meticilline gevoeligheidsbepaling in de microtiterplaatjes kwamen slecht overeen met de bepaling met de agar-verdunningsmethode. Eerder vonden Jones et al.<sup>2)</sup> dat met een microtiter-methode te veel meticilline-gevoelige stammen werden gevonden in vergelijking met de agardilutie-methode. Van de overige antibiotica weken alleen de MRC's van teicoplanine in de microtiterplaatjes sterk af van de referentiewaarden die met de agar-verdunningsmethode werden gevonden. De MRC's in agar waren tot 16 maal hoger dan die bepaald in microtiterplaatjes. Ook Bauernfeind en Petermüller<sup>3)</sup> vonden tot 32 maal hogere MRC's van teicoplanine in agar dan in microtiterplaatjes. Zij konden uitsluiten dat dit veroorzaakt werd door hitte-inactivering tijdens de bereiding van de agar of adsorptie aan de agar, maar konden geen andere verklaring voor het verschil vinden.

De coagulase-positieve stafylokokken waren zelden resistent tegen de onderzochte antibiotica. De resistentiepercentages waren lager dan 5%, behalve het percentage resistentie tegen amoxicilline, waarvoor de productie van  $\beta$ -lactamase bepalend is. Bij de coagulase-negatieve stammen kwam vaker resistentie voor, met name tegen clindamycine (21%), erytromycine (33%), fusidinezuur (14%), gentamicine (36%), doxycycline (12%), cotrimoxazol (27%) en ciprofloxacin (13%). De percentages resistentie tegen de andere antibiotica, uitgezonderd amoxicilline, waren lager dan 5%.

Deze resistentiepercentages kunnen worden vergeleken met de resultaten van een resistentiepeiling in de streeklaboratoria<sup>4)</sup>, waarbij voor de coagulase-positieve stammen (*S. aureus*) eveneens lage resistentiepercentages werden gevonden, behalve voor amoxicilline (vorming van  $\beta$ -lactamase). Bij de coagulase-negatieven waren de resistentiepercentages: clindamycine 13%, erytromycine 30%, fusidinezuur 0.9%, gentamicine 27%, doxycycline 17%, cotrimoxazol 32% en ciprofloxacin 40%. De resistentie tegen fusidinezuur lag in laatstgenoemd onderzoek dus veel lager, terwijl voor ciprofloxacin een hoger resistentiepercentage werd gerapporteerd dan in het hier beschreven project. De overige resistentie-percentages uit de twee onderzoeken komen goed overeen. Ook de nu gevonden percentages  $\beta$ -lactamase vorming bij coagulase-positieven en -negatieven (resp. 73% en 69%) zijn nagenoeg gelijk aan de percentages penicilline-resistentie in het onderzoek in de streeklaboratoria (resp. 78% en 63%).

## 5. LITERATUUR

1. Veen-Rutgers A van, Sijbolts FH, Schot CS, Schouls LM, Neeling AJ de, Klingerren B van. Optimalisering van de meticillinegevoeligheids-bepaling bij coagulase negatieve staphylococcen. RIVM 1994 rapportnr. 253601002.
2. Jones RN, Barry AL, Gardiner RV, Packer RR. The prevalence of staphylococcal resistance to penicillinase-resistant penicillins. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1989; 12:385-94.
3. Bauernfeind A, Petermüller C. In vitro activity of teichomycin A2 in comparison with penicillin and vancomycin against Gram-positive cocci. *Eur J Clin Micr* 1982; 1:278-81.
4. Neeling AJ de, Hemmes JH, Klingerren B van. Resistentie tegen antibiotica bij routine-isolaten van bacteriën in zeven streeklaboratoria. RIVM 1993 rapportnr. 253601001.

Figuur 1 *Indeling microtiterplaatje*

Contr.	RIP 0.001	0.01	0.1	1	CLIN 0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4
AMX 0.12	0.25	0.5	1	2	4	ERY 0.12	0.25	0.5	1	2	4
AUG 0.12	0.25	0.5	1	2	4	VAN 0.12	0.25	0.5	1	2	4
FUS 0.12	0.25	0.5	1	2	4	TCP 0.12	0.25	0.5	1	2	4
GEN 0.25	0.5	1	2	4	8	CEF 0.12	0.25	0.5	1	2	4
DOX 0.12	0.25	0.5	1	2	4	MUP 0.12	0.25	0.5	1	2	4
SXT 0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	CXM 0.25	0.5	1	2	4	8
CIP 0.12	0.25	0.5	1	2	4	IMP 0.06	0.12	0.25	0.5	1	2

RIP = rifampicine

CLIN = clindamycine

AMX = amoxicilline

AUG = augmentin

FUS = fusidinezuur

GEN = gentamicine

ERY = erytromycine

SXT = sulfamethoxazol/  
trimethoprim

CIP = ciprofloxacin

VAN = vancomycine

TCP = teicoplanine

CXM = cefuroxim

CEF = cefalotine

IMP = imipenem

MUP = mupirocine

DOX = doxycycline