

Coördinaten van het referentiecentrum

Dr. O. DENIS Tel.: 02/555.45.19	U.Z. Erasmus - Bacteriologie Fax: 02/555.31.10.	Lenniksebaan 808 E-mail: odenis@erasme.ulb.ac.be	1070 Brussel
------------------------------------	----------------------------------------------------	-----------------------------------------------------	--------------

Het referentiecentrum voor *staphylococcus aureus* aan de **Universit  Libre de Bruxelles** verleent de volgende diensten:

- Identificatie en antibiogram van atypische stafylokokkenstammen met behulp van:
 - ❖ fenotypische methodes: proteïne profiel (MALDI-TOF), biochemische testen, minimale inhibitorische concentraties (MIC); fenotype van glycopeptidegevoeligheid (d.m.v. populatiestudie).
 - ❖ genotypische methodes: detectie via PCR van de genen *nuc* (*S. aureus*), *mecA* (oxacilline/cefoxitine resistentie), *mecC* (variant van *mecA*), *mupA* (mupirocineresistentie), *cfr* (linezolide resistentie) en van resistentiegenen voor macroliden-lincosamiden-streptogramines (MLS), tetracyclines en aminoglycosides.
- Opsporen van toxinegenen: exfoliatines A, B en D, Panton Valentine Leucocidine (PVL), Toxic Shock Syndroom Toxine (TSST-1) en enterotoxines.
- Moleculaire typering: *spa* typering (enkel voor *S. aureus*); bepaling van het staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*)-type voor oxacilline/cefoxitine resistente stafylokokken; genomische macrorestrictie gevolgd door pulsed field gel electrophoresis (PFGE); multilocus sequence typering (MLST); bepaling van de *agr*-groep; bepaling van het *arcA* gen (marker van het Arginine Catabolic Mobile Element (ACME) "pathogeniciteitseiland").

Deze analyses worden op verzoek van perifere laboratoria uitgevoerd voor klinische stammen met diagnoseproblemen of voor stafylokokkencollecties afkomstig van lokaal epidemiologisch onderzoek. Aanvraagformulieren kunnen via de site van het referentiecentrum voor *S. aureus* (<http://www.mrsa.be>) worden gedownload.

De dienst Microbiologie, met inbegrip van het Nationaal Referentiecentrum *S. aureus*, is geaccrediteerd volgens de ISO15189 norm. De lijst van geaccrediteerde analyses is beschikbaar op de Belac website (<http://economie.fgoc.be/belac.jsp>).

Karakterisering van atypische klinische stafylokokkenstammen

In 2012 heeft het laboratorium 187 klinische stafylokokkenstammen gekarakteriseerd in het kader van gerichte identificatie- en antibiogramaanvragen. Er werd geen enkele MRSA stam met verminderde gevoeligheid aan glycopeptides (glycopeptide intermediaire *S. aureus*, GISA) vastgesteld.

Van de 56 stammen opgestuurd voor confirmatie van oxacilline/cefoxitine resistentie werden er 6 (11%) heterogene MRSA waargenomen: positief voor *mecA* maar fenotypisch gevoelig t.o.v. oxacilline (MIC \leq 2 mg/l) en/of cefoxitine (MIC \leq 4 mg/l). Verder werden 4 (7%) oxacilline resistente (MIC > 2 mg/l) stammen waargenomen, die niet beschikten over het *mecA* gen maar wel over een *mecA* gen variant (*mecC*, voorheen *mecA*_{LGA251}). *mecC*-MRSA stammen zijn moeilijk te detecteren met de huidige technieken gebruikt in routine laboratoria, voornamelijk met conventionele PCRs. Mupirocineresistentie werd voor 19 stammen geanalyseerd door MIC bepaling en door PCR. Negen stammen (47%) vertoonden een hoog niveau van mupirocine resistentie (MIC > 524 mg/l) en de aanwezigheid van het *mupA* gen.

Opsporing van toxines en karakterisatie van de 'community-associated' stammen

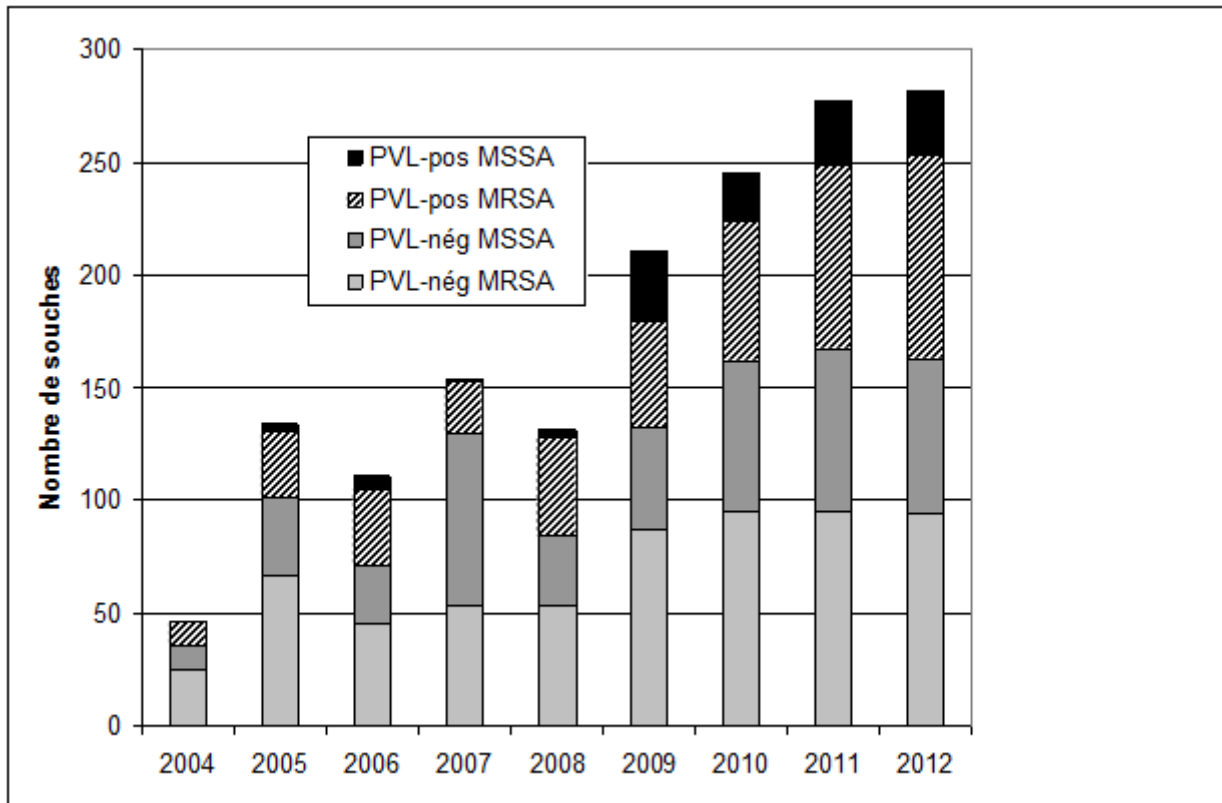
In 2012 werden 281 *S. aureus* stammen, waarvan 184 MRSA en 97 MSSA, opgestuurd naar het referentiecentrum voor de opsporing van toxines (figuur 1).

De genen *lukS-lukF*, coderend voor PVL, werden aangetroffen in 90 (49%) MRSA stammen. Die stammen werden voornamelijk geïsoleerd uit huidinfecties, vooral abscessen van de huid of weke weefsels en furunkels (n=48), maar ook uit diep vocht (n=11) en screeningsstalen (n=8).

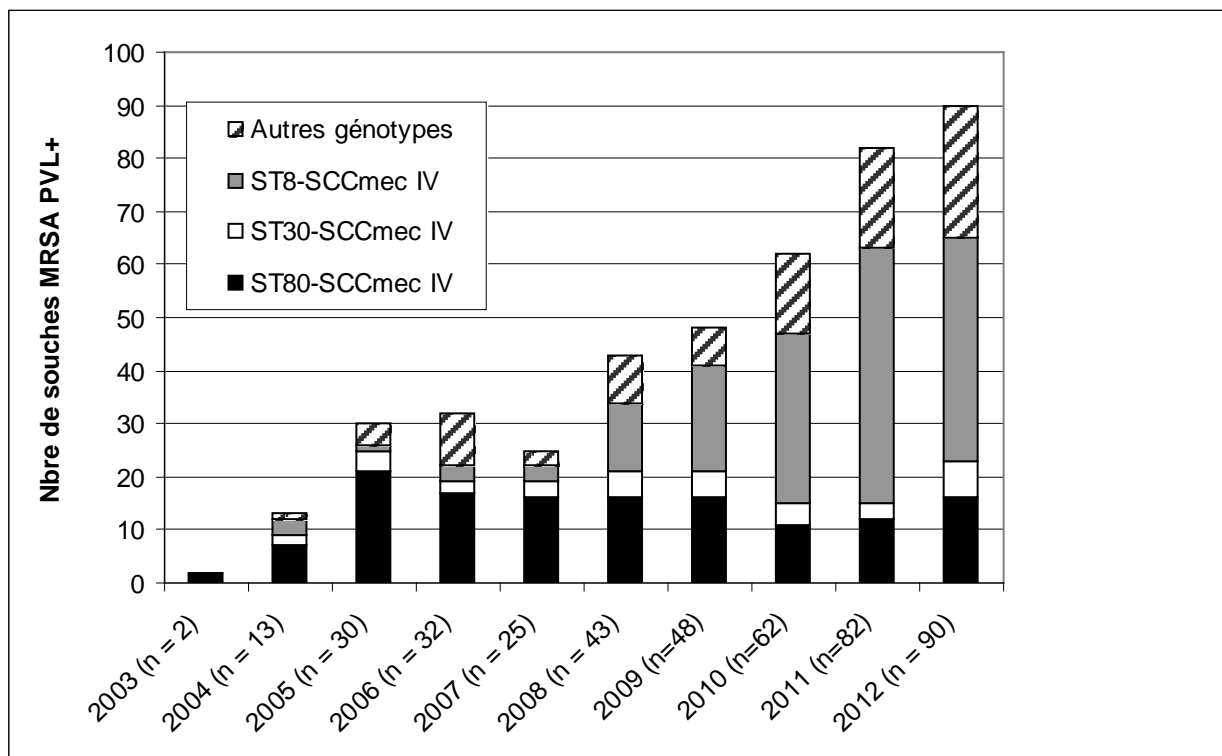
Door moleculaire typering werd aangetoond dat de meerderheid (72%) van de PVL-positieve MRSA stammen tot 3 klonen behoorden: de Europese kloon ST8-SCC*mec* IV (n=16), kloon ST8-SCC*mec* IV (n=42) en kloon ST30-SCC*mec* IV (n=7) (figuur 2). Vierendertig van de 42 (81%) stammen behorend tot de ST8-SCC*mec* IV kloon bevatten het "pathogeniciteitseiland" ACME, een karakteristieke eigenschap van MRSA USA300 stammen (tabel 1).

Van de 90 CA-MRSA stammen, werden 4 stammen toegewezen aan de Taiwanese kloon ST59 en 12 andere stammen aan de ST398 kloon van dierlijke oorsprong (zie hoofdstuk "analyse van *S. aureus* van dierlijke oorsprong").

Figuur 1: Aantal MRSA en MSSA stammen opgestuurd voor opsporing van PVL, 2004-2012



Figuur 2: Evolutie van de voornaamste genotypes van PVL-positieve CA-MRSA-stammen, 2003-2012



Achtentwintig (29%) MSSA stammen bezatten de *lukS-lukF* genen coderend voor PVL. Genotypering van de 28 PVL-positieve MSSA stammen toonde aan dat hun moleculaire epidemiologie verschilde van die van de MRSA stammen. PVL-positieve MSSA behoorden voornamelijk tot de klonen ST30 (n=10), ST121 (n=3) en de dieergeassocieerde ST398 kloon (n=3), alsook tot 5 andere genotypes.

Het toxine TSST-1 werd gedetecteerd bij 15 MRSA en 10 MSSA stammen, afkomstig van oppervlakkige huidletsels (n=2), screeningsstalen (n=4), bloedculturen (n=2) of van andere klinische sites (n=7). Door moleculaire typering behoorden de TSST-1-positieve stammen voornamelijk tot de ST5 kloon (87%).

De genen coderend voor de exfoliatines A en B werden aangetroffen in 1 MSSA stam geïsoleerd uit een huidletsel. Deze stam behoorde tot de Europese, fusidineresistente impetigokloon ST121 (Epidemic European Fusidic acid-resistant Impetigo Clone, EEFIC). Het gen coderend voor exfoliatine A alleen werd aangetroffen in 15 MSSA stammen, waarvan de meerderheid (80%) behoorde tot de ST109 kloon, en in 2 MRSA stammen. Het gen coderend voor exfoliatine B alleen werd aangetroffen in 1 MSSA stam behorende tot de ST121 kloon.

Tabel 1: Percentage resistente MRSA stammen opgestuurd voor toxine bepaling, per antibioticum.

Antibioticum	Percentage resistente MRSA stammen		
	PVL positief (n=90)	PVL negatief (n=94)	Totaal (n=184)
Erythromycine	59	42	50
Clindamycine	20	32	26
Ciprofloxacine	28	41	34
Gentamicine	4	12	8
Tobramycine	4	35	20
Kanamycine	59	45	52
Minocycline	0	17	8
Tetracycline	26	26	26
Rifampicine	0	2	1
Cotrimoxazol	2	9	5
Linezolide	0	0	0
Fusidinezuur	20	23	22
Mupirocine	2	2	2

Tabel 2: Percentage resistente MSSA stammen verstuurd voor toxine bepaling

Antibioticum	Percentage resistente MSSA stammen		
	PVL positief (n=28)	PVL negatief (n=69)	Totaal (n=97)
Erythromycine	32	33	33
Clindamycine	3	29	22
Ciprofloxacine	3	4	4
Gentamicine	0	0	0
Tobramycine	0	0	0
Kanamycine	18	1.5	6
Minocycline	0	4	3
Tetracycline	47	7	17
Rifampicine	0	3	2
Cotrimoxazol	28	0	8
Linezolide	0	0	0
Fusidinezuur	18	6	1
Mupirocine	0	0	0

Moleculaire typering in het kader van lokale epidemieën

In 2012 werd moleculaire typering door PFGE en/of *spa*-typering uitgevoerd voor 336 *S. aureus* stammen, waarvan 240 MRSA en 96 MSSA. In totaal werden 64 MRSA en 24 MSSA stammen opgestuurd voor typering in het kader van lokaal epidemiologisch onderzoek (n=19). De 64 MRSA stammen afkomstig van 12 ziekenhuizen werden geklasseerd in 13 verschillende genotypes, waarvan de meest voorkomende genotypes frequent worden gedetecteerd in Belgische ziekenhuizen: *spa* t002, t003 of andere *spa* types geassocieerd met de ST5-SCC*mec* II of IV kloon werden teruggevonden voor 37% van de stammen afkomstig van 5 ziekenhuizen; *spa* t008, t068 of andere types geassocieerd met de ST8-SCC*mec* IV kloon werden teruggevonden voor 30% van de stammen uit 6 ziekenhuizen. Moleculaire typering kon horizontale transmissie van MRSA stammen voor 9 van de 13 onderzochte clusters bevestigen.

Programma EARSS voor de surveillance van de resistentie van *S. aureus* geïsoleerd uit hemoculturen

Sinds 2005 en in samenwerking met het WIV-ISP, moeten klinische en bacteriologische gegevens voor *S. aureus* bacteriëmiën, veroorzaakt door zowel oxacilline gevoelige als resistente stammen, gerapporteerd worden. In 2011 werden 1744 patiënten met een eerste episode van een *S. aureus* bacteriëmie geregistreerd, waarvan 304 MRSA. Anders gesteld, 17% van de *S. aureus* bacteriëmiën werd veroorzaakt door een oxacilline resistente stam (tabel 3). Op de website <http://www.ecdc.europa.eu/en/publications/publications/antimicrobial-resistance-surveillance-europe-2011.pdf> kunnen de gegevens van alle landen die deelnemen aan het EARSS programma worden geconsulteerd. De gegevens van 2012 waren op het moment van schrijven nog niet beschikbaar.

Tabel 3: Resultaten voor oxacillinegevoeligheid bij *S. aureus* geïsoleerd uit bloedculturen in België, 1999-2011

Jaar	Aantal			Totaal	Percentage		
	S	I	R		N	S	I
1999	340	0	105	445	76.4	0.0	23.6
2000	520	0	137	657	79.1	0.0	20.9
2001	729	0	213	942	77.4	0.0	22.6
2002	783	0	309	1092	71.7	0.0	28.3
2003	798	0	336	1134	70.4	0.0	29.6
2004	819	0	408	1227	66.7	0.0	33.3
2005	719	0	329	1048	68.6	0.0	31.4
2006	670	0	188	858	78.1	0.0	21.9
2007	656	0	199	855	76.7	0.0	23.3
2008	719	0	187	906	79.4	0.0	20.6
2009	748	0	200	948	78.9	0.0	21.1
2010	840	0	217	1057	79.5	0.0	20.5
2011	1440	0	304	1744	82.6	0	17.4

Analyse van *S. aureus* van dierlijke oorsprong

Er werden 12 MRSA stammen (3,6%) behorend tot de diergeassocieerde ST398 kloon gedetecteerd bij ambulante of gehospitaliseerde patiënten in Vlaanderen (n=11) en Brussel (n=1). Deze stammen werden geïsoleerd uit screeningsstalen (n=8), urine (n=1) of hadden een onbekende oorsprong (n=3). Op basis van de verzamelde gegevens kon worden aangetoond dat 4 patiënten direct contact hadden met landbouwdieren (boer, veearts).

Drie MSSA ST398 stammen werden gedetecteerd. Daarvan werden 2 stammen geïsoleerd bij kinderen jonger dan 2 jaar met impetigo (Brussel en Aalst), voor geen van de stammen werden toxines gedetecteerd. De derde stam was afkomstig van een wondscreening uitgevoerd bij een dakloze persoon in Brussel.

Conclusies

In vergelijking met het voorgaande jaar wordt een lichte stijging van het aantal PVL-positieve MRSA stammen waargenomen: 90 gevallen in 2012 versus 82 gevallen in 2011. Het aantal stammen behorend tot de MRSA kloon ST8-SCCmec IV USA300 blijft stabiel t.o.v. vorig jaar. Het aantal MRSA stammen behorende tot de klonen ST80-SCCmec IV en ST30-SCCmec IV of II stijgt lichtjes in vergelijking met 2011. Bovendien wordt er een grotere diversiteit aan genotypes waargenomen, met ondermeer de aanwezigheid van de Taiwanese ST59 kloon. Het aantal gevallen van PVL-positieve MSSA aangetroffen in 2012 bleef stabiel in verhouding tot de 2 vorige jaren: 28 gevallen in 2012 versus 28 gevallen in 2011 en 21 gevallen in 2010. PVL-positieve MSSA stammen behoren voornamelijk tot de ST30 kloon.

Wat betreft MRSA in zorginstellingen toont genotypering in het kader van lokaal epidemiologisch onderzoek naar epidemieën of gegroepeerde gevallen aan dat deze stammen voornamelijk behoren tot de epidemische nosocomiale klonen ST8-SCCmec IV en ST5-SCCmec IV of II.

Bij de mens worden iets vaker dan in voorgaande jaren MRSA stammen van het diergeassocieerde ST398-type gedetecteerd. Deze stammen zijn voornamelijk afkomstig van Vlaanderen, en worden vaak geïsoleerd bij personen in contact met landbouwdieren zoals kwekers van varkens of kalveren en dierenartsen. MRSA ST398 stammen worden sporadisch gevonden in Belgische ziekenhuizen.

Er worden eveneens MSSA ST398 stammen gedetecteerd, vaak bij personen die niet in contact komen met landbouwdieren.

Referenties

Anonyme. Le *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (MRSA) en médecine vétérinaire : situation actuelle Folia Veterinaria 2008 volume 1. Disponible à l'adresse suivante <http://www.cbip-vet.be/fr/frinfos/frfolia/08FVF1b.pdf>

Anonyme. *Staphylococcus aureus* méticillino-résistant associé à l'élevage. Folia Pharmacotherapeutica. 2008 volume 8. Disponible à l'adresse suivante <http://www.cbip.be/PDF/Folia/2008/P35F08E.pdf>

Denis O, Deplano A, Nonhoff C, De Ryck R, de Mendonça R, Rottiers S, Vanhoof R, Struelens MJ. National surveillance of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Belgian hospitals indicates rapid diversification of epidemic clones. *Antimicrob. Agents Chemother* 2004 (48):3625-3629.

Denis O, Deplano A, De Beenhouwer H, Hallin M, Huysmans G, Garrino MG, Glupczynski Y, Malaviolle X, Vergison A, Struelens MJ. Polyclonal emergence and importation of community-acquired methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains harbouring Panton-Valentine leukocidin genes in Belgium. *J. Antimicrob. Chemother* 2005 (56):1103-1106.

Denis O, Deplano A, Nonhoff C, Hallin M, De Ryck R, Vanhoof R, de Mendonça R, Struelens MJ. In Vitro activities of ceftazidime, tigecycline, daptomycin and 19 other antimicrobials against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains from a national survey of Belgian Hospitals. *Antimicrob. Agents Chemother* 2006 (50):2680-2685

Denis O, Suetens C, Hallin M, Catry B, Ramboer I, Dispas M, Willems G, Gordts B, Butaye P, Struelens MJ. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 in swine farm personnel, Belgium. *Emerg Infect Dis*. 2009 (15):1098-101.

Denis O., Jans B., Deplano A., Nonhoff C., De Ryck R., Suetens C., Struelens M.J. Epidemiology of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) among residents of nursing homes in Belgium. *J. Antimicrob. Chemother* 2009 doi:10.1093/jac/dkp345.

Deplano A, Witte W, van Leeuwen WJ, Brun Y, Struelens MJ. Clonal dissemination of epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Belgium and neighboring countries. *Clin Microbiol Infect* 2000 (6):239-245.

Deplano A C, Nonhoff, S, Roisin, A.R, Larsen, J, Larsen, O, Denis. Presence of *mecA* homologue (*mecC*) gene in Belgian hospitals. *Staphylococcus aureus*. 23rd European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Berlin, 27-30 April 2013.

Deplano A., S. Vandendriessche, C. Nonhoff, S. Roisin, R. de Mendonça, O. Denis. Distinct reservoir and clinical pattern of methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* CC398 in Belgium. 10 th International Meeting on Microbial Epidemiological Markers. Paris, 2-5 October 2013

Garcia-Graells C., Antoine J., J Larsen J., Catry B., Skov R., Denis O. Livestock veterinarians at high risk of acquiring methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398. *Epidemiol. Infect.* 2012 140:383-9.

- Hallin M, Deplano A, Denis O, De Mendonça R, De Ryck R, Struelens MJ. Validation of pulsed-field gel electrophoresis and *spa* typing for long term, nation-wide epidemiological surveillance studies of *Staphylococcus aureus* infections. *J. Clin. Microbiol* 2007 (45): 127-133.
- Hallin M, Denis O, Deplano A, de Mendonca R, De Ryck R, Rottiers S, Struelens MJ. Genetic relatedness between methicillin-susceptible and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: results of a national survey. *J. Antimicrob. Chemother* 2007 (59): 465-472.
- Naessens R, Ronsyn M, Druwé P, Denis O, Ieven M, Jeurissen A. Central nervous system invasion by community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: case report and review of the literature. *J Med Microbiol* 2009 (58):1247-51.
- Nemati M, Hermans K, Lipinska U, Denis O, Deplano A, Struelens MJ, Devriese LA, Pasmans F, Haesebrouck F. Antimicrobial resistance of old and recent *Staphylococcus aureus* isolates from poultry: first detection of livestock-associated methicillin-resistant strain ST398. *Antimicrob Agents Chemother* 2008 (52): 3817-3819.
- Vancraeynest D, Haesebrouck F, Deplano A, Denis O, Godard C, Wildemaue C, Hermans K. International dissemination of a high virulence rabbit *Staphylococcus aureus* clone. *J. Vet. Med* 2006 (53): 418-422.
- Vandendriessche S., M. Hallin, B. Catry, B. Jans, A. Deplano, C. Nonhoff, S. Roisin, R. De Mendonça, M.J. Struelens, O. Denis. Previous healthcare exposure is the main antecedent for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carriage on hospital admission in Belgium. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2012 31:2283-92.
- Van den Eede A, Martens A, Lipinska U, Struelens MJ, Deplano A, Denis O, Haesebrouck F, Gasthuys F, Hermans K. High occurrence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 in equine nasal samples. *Vet. Microbiol* 2009 (133):138-44.
- Vandendriessche S., K. Kadlec, S. Schwarz, O. Denis. Methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* ST398-t571 harbouring the macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance gene *erm(T)* in Belgian hospitals. *J Antimicrob Chemother* 2011 (66): 2455-2459.
- Vandendriessche S. W. Vanderhaeghen, J. Larsen, R. de Mendonça, M. Hallin, P. Butaye, K. Hermans, F. Haesebrouck, O. Denis. High genetic diversity of methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* (MSSA) from humans and animals on livestock farms and presence of SCC*mec* remnant DNA in MSSA CC398. 10 th International Meeting on Microbial Epidemiological Markers. Paris, 2-5 October 2013