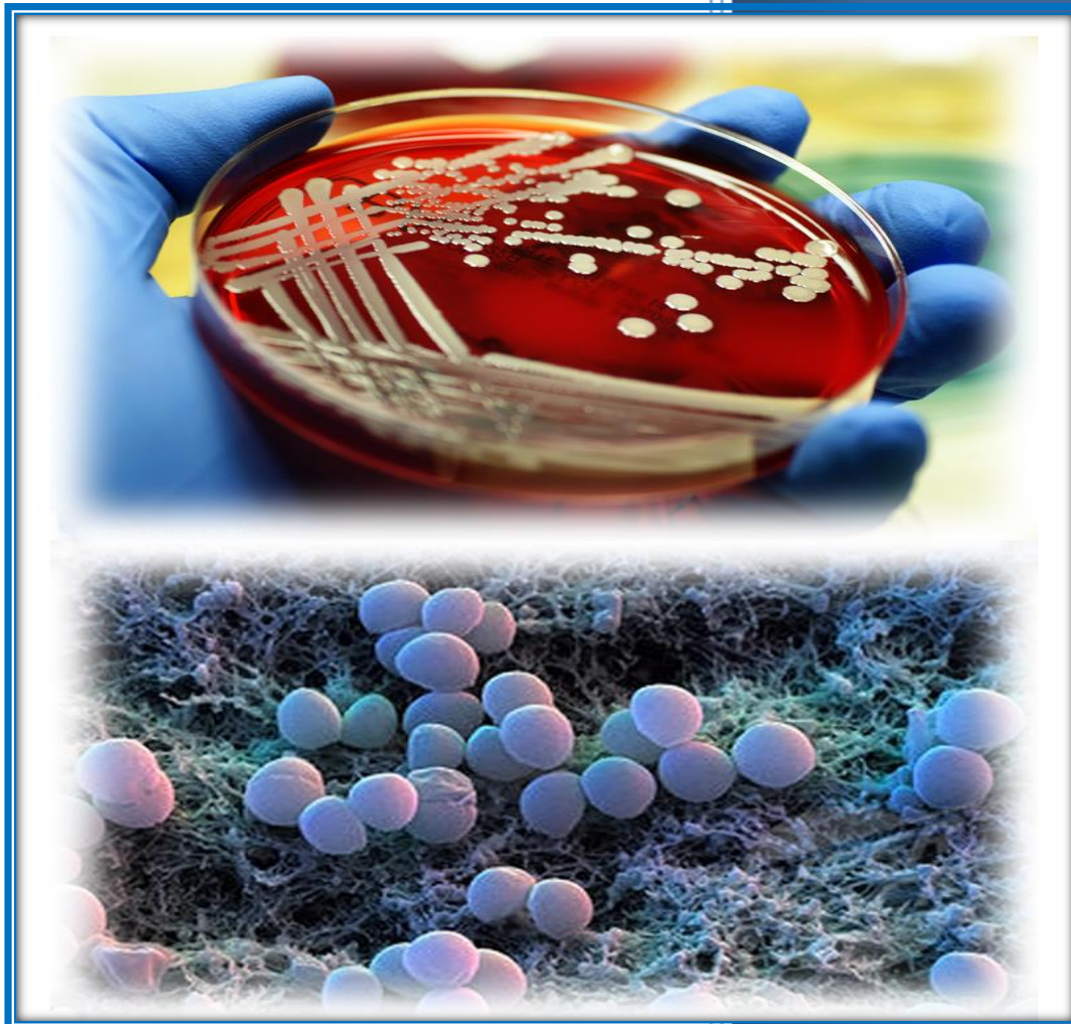


Verbeteren van de huidige moleculaire snel- diagnostiek voor MRSA in het UMC Utrecht



Afstudeerbegeleider school:

Dr. Jorg Brunner

Afstudeerbegeleider UMC Utrecht:

Dr. J.G. Kusters

Afstudeerplaats:

Afdeling Medische Microbiologie
UMC Utrecht

Afstudeerperiode:

11-11-2013 t/m 29-06-2014



Plaats, datum:

Utrecht, 21 Mei 2014

Student:

Arjan Cornelisse
1593707

Opleiding:

Life Sciences(Microbiologie)
Hogeschool Utrecht

Voorwoord

Als onderdeel van mijn HBO opleiding Life Sciences met als afstudeerrichting Medische Microbiologie heb ik mijn 7 maanden lange afstudeerstage gelopen in het Universitair Medische Centrum Utrecht. Tijdens deze stage heb ik onderzoek gedaan naar het verbeteren van de huidige moleculaire snel diagnostiek in het UMC Utrecht. Deze stage was echter niet mogelijk geweest zonder de volgende mensen.

Allereerst wil ik Dr. J.G. Kusters en Lotte van Belzen bedanken voor de begeleiding tijdens mijn stage en de begeleiding bij het maken van dit afstudeerverslag. Tevens wil ik de arts-microbiologen en analisten van de bacteriologie afdeling binnen het UMC Utrecht bedanken voor de hulp en begeleiding die ik van hun heb mogen ontvangen.

Als laatste wil ik de fabrikanten Copan, ITK en Medical Wire bedanken voor het leveren van de verschillende media die ik heb kunnen testen. Wanneer ik extra spullen of extra informatie nodig had is deze altijd netjes geleverd.

Ik wens u als lezer veel plezier bij het lezen van mijn afstudeerverslag.

Arjan Cornelisse

21 Mei 2014

Samenvatting

Staphylococcus aureus is een bacterie die zich vooral in de neus en op de huid bevindt. Wanneer de *S. aureus* niet meer gevoelig is voor Methicilline, één van de gebruikelijke antibiotica, noemen we de bacterie Methicilline Resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA). Er zijn in het UMC Utrecht twee verschillende sneltesten om MRSA aan te tonen, de GeneXpert MRSA en de GeneXpert MRSA/SA Nasal Compleet. Doel is te analyseren of een van deze twee testen kan vervallen door hem te vervangen door de andere test. Daarnaast is het binnen het UMC Utrecht noodzakelijk om voor elke test een aparte wattenstok af te nemen. In principe is het mogelijk om één afname op te nemen in een vloeibaar medium en hiermee meerdere testen te doen. De voordelen hiervan zijn dat er in de kliniek bij een patiënt minder monsters hoeven te worden genomen.

Doelstelling

Het doel is het verbeteren van de huidige moleculaire snel-diagnostiek voor MRSA in het UMC Utrecht.

Bij het onderzoek naar de GeneXpert MRSA/SA Nasal Compleet sneltest is onderzocht of de specificiteit en sensitiviteit vergelijkbaar zijn aan die van de GeneXpert MRSA sneltest. Verder is er bij het verminderen van het aantal swabs onderzocht wat het effect is van de verschillende media op bacterieconcentraties wanneer deze media langer blijven staan op kamertemperatuur en koelkasttemperatuur.

Uit de resultaten van de validatie van de GeneXpert MRSA/SA Nasal Compleet sneltest blijkt dat deze sneltest weliswaar specifiek, maar minder gevoelig is dan GeneXpert MRSA sneltest. Verder blijkt uit de resultaten dat van de drie verschillende media, het medium van Medical Wire het meest geschikt is.

Concluderend blijkt dat GeneXpert MRSA/SA Nasal Compleet sneltest specifiek is dan de GeneXpert MRSA sneltest zonder daadwerkelijk positieve patiënten te missen door een mindere gevoeligheid. Verder is het medium van Medical Wire het meest geschikt voor het vervangen van de droge wattenstokken die op dit moment in het UMC Utrecht worden gebruikt.

Summary

Staphylococcus aureus is a bacterium that lives mainly in the nose and on the skin. When *S. aureus* is no longer sensitive to Methicillin, the bacterium is called Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). Currently, there are two different rapid tests for the detection of MRSA in the UMC Utrecht, the GeneXpert MRSA and MRSA/SA the GeneXpert Nasal Complete. Purpose of this project is to investigate if one of these two tests can be replaced by the other. In addition it is necessary in our hospital, to obtain separate swabs for each test that has to be performed. In principle it is possible to obtain a single swab in liquid transfer medium and use this for multiple tests. The advantages are that in the clinic the number of swabs that have to be taken from a patient can be decreased.

Objective

The objective is to improve the current molecular fast diagnostics for MRSA in the UMC Utrecht.

It was tested if the specificity and sensitivity are comparable between the GeneXpert MRSA/SA Nasal Complete rapid test and the GeneXpert MRSA. Furthermore, to reduce the number of swabs, it was examined what the effect of different liquid transfer media was on bacterial concentrations, at both room temperature and refrigerator temperature.

The results of the GeneXpert MRSA/SA Nasal Complete rapid test shows that this rapid test is more specific but less sensitive than GeneXpert MRSA rapid test. In addition, the results of three different media, the medium of Medical Wire is best suited.

In conclusion, it appears that GeneXpert MRSA/SA Nasal Complete rapid test is more specific than the GeneXpert MRSA rapid test without actually missing MRSA positive patients due to its slightly reduced sensitivity. Also the medium of Medical Wire is best suited for replacing the dry swabs that are currently still used in the UMC Utrecht.

Gebruikte afkortingen

PBP2	Penicilline Bindende Proteïne-2
MRSA	Methicilline Resistente <i>Staphylococcus aureus</i>
MSA	Mannitol-zoutplaat
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
SCCmec	<i>Staphylococcal Cassette Chromosome mec</i>
SPA	<i>Staphylococcal protein A</i>
SPC	<i>Sample Processing Control</i>
TSS	Toxische-Shock Syndroom

Inhoudsopgave

Voorwoord	1
Samenvatting.....	2
Summary	3
Gebruikte afkortingen	4
1. Inleiding	7
Doelstelling.....	8
1.1. Staphylococcen.....	9
1.2. <i>Staphylococcus aureus</i>	10
1.3. Methicilline Resistente <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)	10
1.4. Methicilline.....	11
1.5. Resistentie	12
1.6. Staphylococcen Cassette Chromosoom <i>mec</i> (SCC <i>mec</i>)	12
1.6.1. Het <i>mecA</i> -gen	12
1.6.2. Het <i>mecC</i> -gen	13
1.7. GeneXpert	14
1.7.1 GeneXpert MRSA sneltest	14
1.7.2 GeneXpert MRSA/SA Nasal Compleet sneltest	15
2. Materiaal en Methode	16
2.1. Validatie MRSA/SA Nasal Compleet	16
2.1.1. Het inzetten van de sneltesten in de GeneXpert	16
2.1.2. Specificiteit van de GeneXpert MRSA/SA Nasal Compleet sneltest	17
2.1.3. Sensitiviteit van de GeneXpert MRSA en de GeneXpert MRSA/SA Nasal Compleet sneltest	18
2.2. Verminderen van het aantal swabs.....	19
2.2.1. De verschillende media	19
2.2.2. Een monocultuur	20
2.2.3. Een mengcultuur	21
3. Resultaten.....	22
3.1. Validatie MRSA/SA Nasal Compleet	22
3.1.1. Specificiteit	22
3.1.2. Sensitiviteit	23
3.1.3. Vergelijken van de sneltesten	25
3.2. Verminderen van het aantal swabs.....	26

3.2.1. Monoculturen.....	26
3.2.2. Mengcultuur	32
4. Conclusie en Discussie.....	35
4.1. Conclusie	35
4.1.1. Validatie van de GeneXpert MRSA/SA Nasal Compleet sneltest	35
4.1.2. Verminderen van het aantal swabs.....	35
4.1.3. Verbeteren van de huidige moleculaire snel diagnostiek voor MRSA in het UMC Utrecht	36
4.2. Discussie	36
4.2.1. Validatie van de GeneXpert MRSA/SA Nasal Compleet sneltest	36
4.2.2. Verminderen van het aantal swabs.....	37
5. Literatuur	38
6. Bijlagen	41
6.1. Bijlage 1: Resultaten van de sensitiviteit van beide sneltesten	41
6.2. Bijlage 2: 16 Positieve GeneXpert MRSA sneltest monsters	43
6.3. Bijlage 3: Resultaten van de monoculturen	44
6.4. Bijlage 4: Resultaten van de mengculturen.....	47

1. Inleiding

Elk mens draagt een grote hoeveelheid verschillende bacteriën bij zich. Deze bacteriën zijn zowel op de huid als dieper in het lichaam aanwezig. *Staphylococcus aureus* is een bacterie die zich vooral in de neus en op de huid bevindt. Deze bacterie is meestal onschuldig maar kan net zoals andere bacteriën infecties veroorzaken, bijvoorbeeld een steenpuist of een ontstoken wondje. Deze infecties genezen vaak vanzelf, maar soms is nodig de infectie te behandelen met antibiotica. Als de *Staphylococcus aureus* niet meer gevoelig is voor het gebruikelijke antibioticum Methicilline, noemen we de bacterie Methicilline Resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA). MRSA is vooral gevaarlijk voor mensen met een ernstig verminderde weerstand.

Een mogelijkheid om MRSA te detecteren is het gebruik van een sneltest. Het is voor de kliniek erg belangrijk om snel een uitslag te hebben of een patiënt wel of niet besmet is met MRSA. Wanneer een patiënt besmet is, dient deze namelijk geïsoleerd te worden om verdere verspreiding te voorkomen. Een dergelijke isolatie kost de kliniek een hoop extra tijd en geld, maar is ook voor de patiënt erg vervelend. Daarom wil men dan ook alleen écht positieve MRSA patiënten in isolatie houden

Op dit moment wordt er in het UMC Utrecht twee verschillende sneltesten gebruikt om MRSA aan te tonen. Verder wordt er altijd een kweek ingezet. De twee verschillende sneltesten zijn de GeneXpert MRSA en de GeneXpert MRSA/SA Nasal Compleet. Het voordeel van de GeneXpert MRSA sneltest is dat deze gevalideerd is voor meerdere afnamesites, bijvoorbeeld keel, neus en perineum. Het nadeel is dat er met deze test alleen de SCCmec cassette kan worden aangetoond. De GeneXpert MRSA sneltest maakt geen onderscheid tussen de cassettes met of zonder het *mecA*-gen en kan dus een monster dat eigenlijk negatief is voor het *mecA*-gen (dus geen MRSA), toch als positief uitslaan. Een fout positieve uitslag dus. De GeneXpert MRSA/SA Nasal Compleet sneltest heeft dit probleem niet. De GeneXpert MRSA/SA test namelijk niet alleen op de SCCmec-cassette, maar daarnaast ook op *Staphylococcal Protein A* (SPA), een gen wat specifiek is voor *Staphylococcus aureus*, en op het *mecA*-gen. Dit vermindert de kans op een fout positieve uitslag. Het nadeel aan deze test is dat deze door de producent alleen gevalideerd is voor een neus-swab.

De sneltest uitslagen worden altijd nog gevolgd door de kweek. De kweek is gouden standaard, maar duurt erg lang. Een kweek uitslag duurt minimaal drie dagen, terwijl de uitslag van de sneltest binnen een aantal uur bekend kan zijn. Maar doordat de kweek eerst een nacht in een groeimedium kan groeien is deze vaak iets gevoeliger dan de sneltesten. Een definitieve uitslag gaat dan ook pas uit als de kweek uitslag bekend is. Echter, wanneer een monster van een patiënt positief is in de sneltest, wordt deze patiënt uit voorzorg al wel in isolatie gelegd tot dat de kweekuitslag bekend is.

Verder wordt er op dit moment in het ziekenhuis gebruik gemaakt van verschillende soorten droge watten om monsterafname om de kweek en sneltest mee in te zetten. Een voorbeeld hiervan is de screening op MRSA. Hier moet voor zowel de kweek als de sneltesten aparte wattenstokken worden afgenomen. Een nadeel van deze watten is dat ze bij bijvoorbeeld bij het inzetten van sneltesten in de GeneXpert maar eenmalig gebruikt kunnen worden. Hierdoor moeten er bij patiënten, waarbij meerdere onderzoeken/testen moeten worden gedaan, meerdere droge watten afgenomen worden.

De mogelijkheid is er om meerdere testen te doen met één afnamesysteem. Deze afnamesystemen bestaan uit een wattenstok die na afname in een buisje met medium wordt afgebroken. Dit buisje wordt goed gevortexed voor het inzetten van verschillende testen om een homogene oplossing te krijgen. De voordelen hiervan zijn dat er in de kliniek bij een patiënt minder monsters kunnen worden afgenomen. Dit is minder belastend voor de patiënt. Verder is het ook voor het laboratorium een stuk makkelijker. Een voorbeeld hiervan is dat een sneltest kan mislukken. Hierdoor is er geen resultaat en de wat die voor het inzetten van deze sneltest is gebruikt is opgebruikt en kan dus niet meer worden gebruikt. Bij het gebruik van een medium kan een nieuwe sneltest worden ingezet zonder dat er een nieuwe swab moet worden afgenomen bij de patiënt.

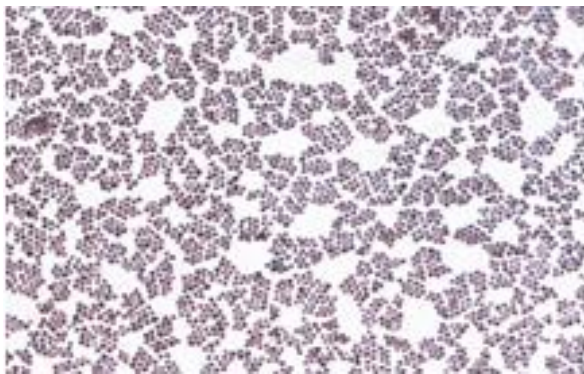
In dit onderzoek is de validatie van de GeneXpert MRSA/SA Nasal Compleet sneltest onderzocht zijn er drie media van verschillende fabrikanten getest op de manier die hierboven is beschreven. De verschillende fabrikanten zijn Copan, ITK en Medical Wire. De resultaten hiervan zijn vergeleken om te kijken welk medium het meest geschikt is voor het gebruik in het UMC Utrecht. Alle testresultaten zijn vergeleken met de standaard manieren van monsterafname/inzetten die op dit moment gebruikt worden in het UMC Utrecht. Deze standaard manieren zijn dus de gouden standaard.

Doelstelling

Het doel is het verbeteren van de huidige moleculaire snel-diagnostiek voor MRSA in het UMC Utrecht.

1.1. Staphylococcen

In 1884 werd het genus *Staphylococcus* voor het eerst beschreven door arts-microbioloog Rosenbach^[1]. Het genus *Staphylococcen* naam verwijst naar de grampositieve cocci die in een patroon groeien dat lijkt op een druiventros (in het grieks Staphyle), zoals weergegeven in figuur 1. De meeste *Staphylococcen* zijn 0,5 tot 1,5 µm in diameter groot. *Staphylococcen* groeien facultatief anaeroob, wat wil zeggen dat ze een voorkeur hebben om te groeien in een milieu waarbij zuurstof afwezig is maar kunnen ook onder normale omstandigheden blijven leven. Daarnaast kunnen ze blijven groeien in media met een hoge concentratie zoutgehalte en bij temperaturen variërend van 18 °C tot 40 °C. Ondanks dat *Staphylococcen* geen sporen kunnen vormen, zijn ze betrekkelijk resistent tegen uitdroging.



Figuur 1: Microscopisch beeld van *Staphylococcen* in een grampreparaat. De *Staphylococcen* zijn gram positief met een kenmerkende druiventrosligging.

Staphylococcen kunnen worden overgedragen via direct contact en kunnen makkelijk via stofdeeltjes door de lucht verspreid worden. Veel personen zijn drager van *Staphylococcus aureus*. Ongeveer 30 procent van de bevolking is altijd gekoloniseerd met *S. aureus*, maar dragen de bacteri e zonder ziektesymptomen. Daarnaast is 40 procent periodiek drager en de overige 30 procent is nooit drager.^[2]

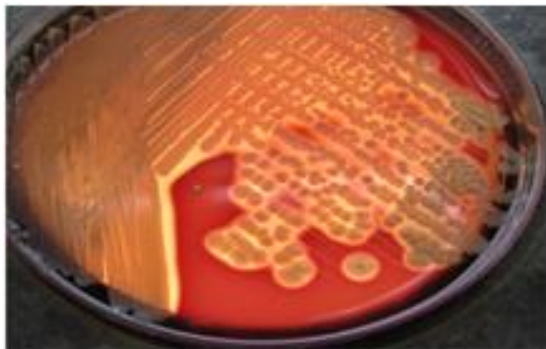
Staphylococcen zijn belangrijke ziekteverwekkers bij de mens, waardoor ze de verwekker zijn bij een breed spectrum van levensbedreigende systemische ziekte. Waaronder infecties van de huid, zachte weefsels, botten, urinewegen en opportunistische infecties vallen. De *Staphylococ* die het meest geassocieerd wordt met ziekten bij de mens is de *Staphylococcus aureus*.^{[3][4]}

Staphylococcus aureus is katalase positief, wat inhoudt dat het waterstofperoxide (H_2O_2) kan afbreken tot waterstof en zuurstof. De katalase test wordt kan worden gedaan om snel een verschil aan te kunnen tonen tussen *Staphylococcen* en *Streptococcen*, want *Streptococcen* kunnen H_2O_2 niet afbreken. Er kan ook een onderscheid gemaakt worden onderling de *Staphylococcen* species. Dit kan gedaan worden met behulp van een coagulase test.

1.2. *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus heeft als enige Staphylococ het zogenaamde proteïne A coagulase in zijn celwand. Hiermee kan *S. aureus* fibrinogeen omzetten in fibrine zodat plasma stolt. Dit is onder andere een manier om zich in het lichaam te beschermen tegen fagocytose.^[5] Met deze eigenschap kan op het lab, met behulp van de coagulase test, snel gekeken worden of de verdacht stam een *S. aureus* betreft. Daarnaast wordt een selectief medium, de mannitol-zoutplaat (MSA-plaat), gebruikt om *S. aureus* te kunnen identificeren. Deze MSA-platen bevatten een hoog zoutgehalte. Alleen *S. aureus* kan groeien op deze specifieke platen. Door de mannitol omzetting kleuren de kolonies van *S. aureus* geel.^[4]

Zoals eerder al vermeld is, groeit de *S. aureus* facultatief anaeroob. Ze groeien optimaal op een bloedagar bij lichaamstemperatuur. Op de bloedagar zijn ze herkenbaar als ronde, glanzende, geel tot goudkleurige kolonies, waar de bacterie ook zijn naam aan te danken heeft (aureus betekend in het Grieks goud). Daarnaast wordt *S. aureus* gekenmerkt door zijn β -hemolytische zone. β -hemolyse is een complete lysis van rode bloedcellen in de media rond en onder de kolonies.



Figuur 2: Kenmerkende groei van een *Staphylococcus aureus* op een bloedagarplaat met duidelijke β -hemolyse.

1.3. Methicilline Resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA)

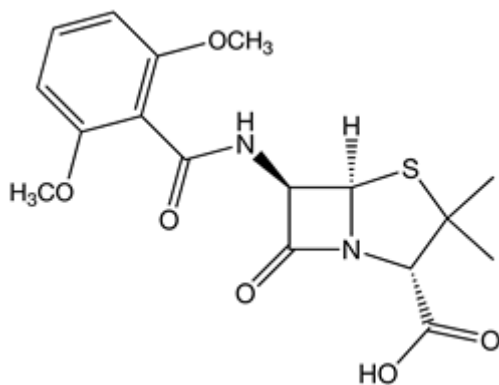
Methicilline Resistente *Staphylococcus aureus*, in het kort MRSA genoemd, is de vorm van *Staphylococcus aureus* die resistent is tegen Methicilline. De resistentie van de bacterie zorgt voor grote problemen, voornamelijk in de ziekenhuizen. De bacterie wordt bij veel contact met antibiotica minder gevoelig of geheel resistent tegen antibiotica. Doordat er in het ziekenhuizen meer antibiotica wordt gebruikt dan in een normale omgeving, ontwikkelt de bacterie sneller en gemakkelijker resistentie. Dit zorgt voor nosocomiale infecties. Dit is een infectie die ontstaan is door het verblijf in een ziekenhuis.^{[6][7]}

MRSA kan worden gedetecteerd met microbiologische methoden^[8] en deze kunnen worden ondersteund door moleculaire biologische technieken zoals *real-time* PCR. Bij microbiologische methoden wordt er bijvoorbeeld gebruik gemaakt van selectieve kweek media. Een voorbeeld daarvan is de oxacilline plaat. Deze plaat is selectief voor MRSA door de antibiotica die het bevat.^[2] Een voorbeeld van een *real-time* PCR techniek die in het UMC in Utrecht gebruikt wordt om MRSA te detecteren is de GeneXpert. Wel geldt de kweek als gouden standaard.

1.4. Methicilline

Methicilline is een bèta-lactam antibioticum van de penicilline-klasse. Methicilline werd ontwikkeld door Beecham in 1959.^[9] Men gebruikte het hoofdzakelijk om infecties tegen te gaan, veroorzaakt door gevoelige Gram-positieve bacteriën, voornamelijk bèta-lactamase producerende organismen zoals *Staphylococcus aureus* die resistent zijn tegen de meeste andere penicillines.^[9]

Het aangrijpingspunt van Methicilline en andere bèta-lactam antibiotica is het Penicilline Bindende Proteïne-2 (PBP2). PBP2 heeft een hoge affiniteit met voor bèta-lactam antibiotica en is betrokken bij de peptidoglycaansynthese van de celwand.^{[10][11]}

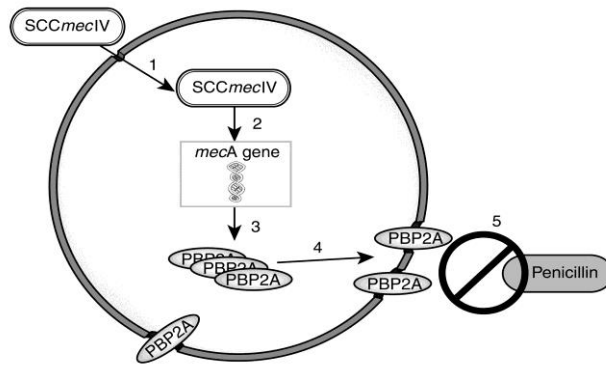


Figuur 3: De structuurformule van Methicilline:
(2R,5R,6R)-6-[(2,6-dimethoxybenzoyl)amino]- 3,3-dimethyl-7-oxo-4-thia-1-azabicyclo[3.2.0]heptaan-2-carboxylzuur.^[12]

Methicilline wordt tegenwoordig niet meer commercieel gemaakt omdat er tegenwoordig meer stabiele en soortgelijke penicillines, zoals oxacilline, flucloxacilline en dicloxacilline gebruikt worden in behandelingen. De term Methicilline-resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA) wordt echter nog wel gebruikt voor het beschrijven van *Staphylococcus aureus* stammen die resistent zijn tegen alle penicillines.

1.5. Resistentie

Een van de manieren waarop β -lactam antibiotica resistentie kan optreden is een mutatie in het gen van het Penicilline Bindende Proteïne (PBP2). Hierdoor verandert de aminozuur volgorde en dus ook het eiwit. Door deze verandering zullen antibiotica minder effectief kunnen binden aan de bacterie waardoor de celwand synthese niet effectief genoeg meer verstoord worden zoals weergegeven in figuur 4. Dit zorgt ervoor dat MRSA resistent wordt tegen Methicilline.^[13]



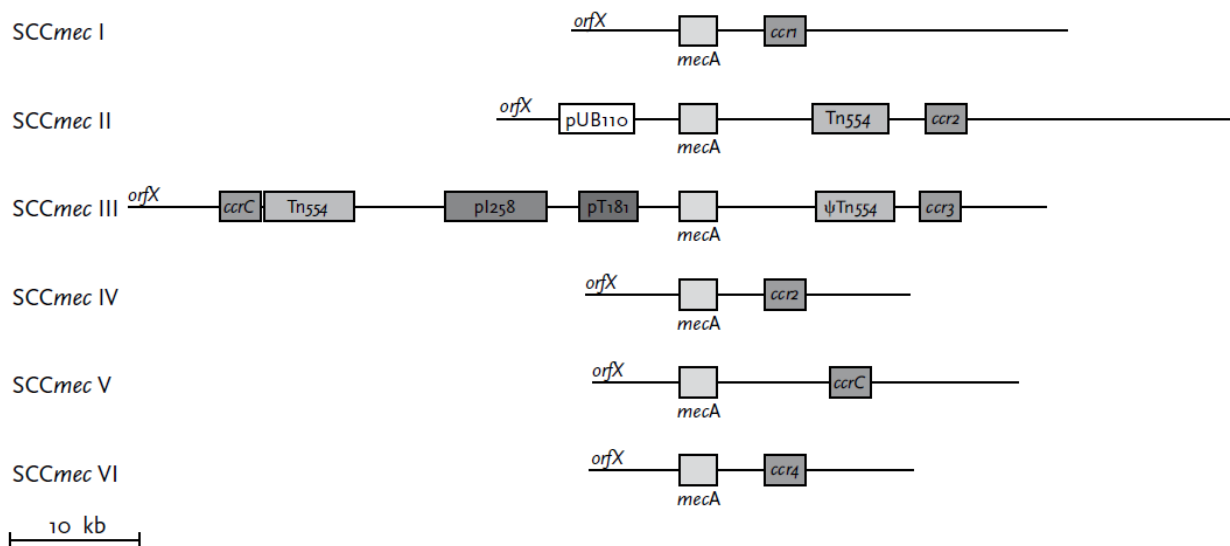
Figuur 4: Werking van het *mecA*-gen wat zorgt voor verandering van PBP2 wat zorgt voor resistentie tegen β -lactam antibiotica.^[14]

1.6. Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* (SCC*mec*)

1.6.1. Het *mecA*-gen

Eén van de belangrijkste oorzaken van resistentie tegen Methicilline en andere β -lactam antibiotica is het *mecA*-gen.^[7] Dit gen is onderdeel van het *Staphylococcal Cassette Chromosome mec*, ook wel het SCC*mec* genoemd. Het *mecA*-gen codeert voor de Penicilline Bindende Proteïnen 2 (PBP2). Er zijn zes SCC*mec*-types bekend en alle SCC*mec* elementen dragen genen die resistentie zijn tegen β -lactam antibiotica, zoals te zien is in figuur 5. SCC*mec*-typen I, IV, V en VI hebben alleen resistentiegenen tegen bèta-lactam antibiotica.

SCC*mec*-typen II en III hebben behalve resistentiegenen tegen bèta-lactam antibiotica, ook resistentiegenen tegen andere klassen antibiotica doordat deze SCC*mec*-typen ingebouwde plasmiden en/of transposons bevatten. SCC*mec*-typen I, II, III, IV en VI zijn geassocieerd met MRSA-isolaten die afkomstig zijn uit ziekenhuizen (*hospital acquired* MRSA), terwijl SCC*mec*-typen IV en V zijn geassocieerd met MRSA-isolaten die afkomstig zijn uit de open populatie (*community acquired* MRSA). SCC*mec*-type IV kan dus zowel in HA-MRSA- als in CA-MRSA-isolaten aanwezig zijn.^{[2][15]}



Figuur 5: Vereenvoudigde weergave van SCCmec-typen I t/m VI. Alle typen bevatten het *mecA*-gen maar onderling verschillen ze door andere genen.^[1]

1.6.2. Het *mecC*-gen

Het *mecA*_{LGA251}-gen, tegenwoordig het *mecC*-gen genoemd, is een voorbeeld van een ander gen wat net als het *mecA*-gen resistentie kan veroorzaken tegen β -lactam antibiotica. Het gen is net als het *mecA*-gen gelegen op het SCCmec-cassette. Genetisch gezien verschilt het gen echter wel van het *mecA* gen waardoor het *mecC*-gen vaak niet wordt opgepikt in de klassieke *mecA* PCR. In de kweek is het verschil te zien doordat het *mecA* oxacilline en cefoxitin resistent is, terwijl het overgrote deel van de *mecC* stammen resistent is tegen cefoxitin, maar gevoelig is voor oxacilline.^{[16][17]}

1.7. GeneXpert

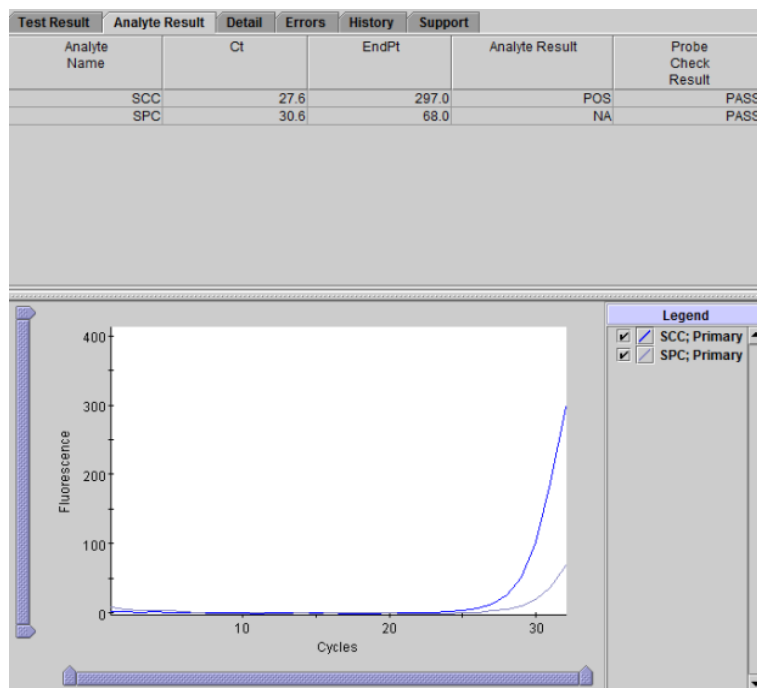
De GeneXpert van Cepheid® is een systeem wat zorgt voor een automatische monster zuivering, nucleïnezuur amplificatie en detectie van de targetsequentie in eenvoudige- of meervoudige monsters door middel van *real-time* PCR. De software van het systeem is zo gebouwd dat het zelf de DNA isolatie en *real-time* PCR kan uitvoeren en de resultaten kan beoordelen. Het systeem vereist het gebruik van disposable cartridges die de PCR-reagentia bevatten die nodig zijn. Een voorbeeld van een cartridge is te zien in figuur 6. Omdat de cartridges een gesloten systeem zijn nadat het monster is toegevoegd, wordt contaminatie voorkomen. Hieronder staan de twee in dit onderzoek gebruikte sneltesten beschreven.^[18]



Figuur 6: GeneXpert MRSA/SA Nasal Complete sneltest cartridge.

1.7.1 GeneXpert MRSA sneltest

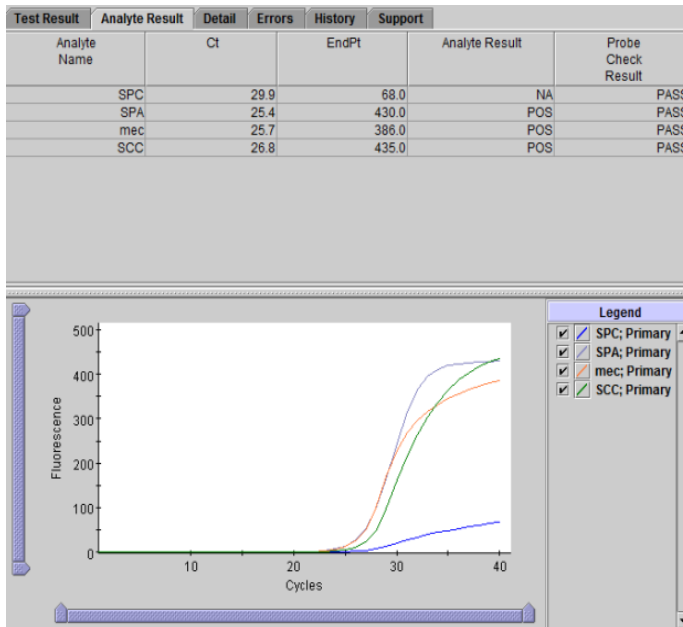
De GeneXpert MRSA sneltest test op het SCCmec cassette waar dus het *mecA*-gen op ligt. Wanneer deze cassette doormiddel van *real-time* PCR wordt aangetoond, zal de GeneXpert een positief resultaat voor MRSA afgeven. Een positief resultaat is weergegeven in figuur 7. Verder bevat het systeem een *Sample Processing Control* (SPC) controleren of de PCR goed gedraaid is en primers en probes goed gewerkt hebben.^[18]



Figuur 7: Een voorbeeld van een positief resultaat voor MRSA in de GeneXpert MRSA sneltest.

1.7.2 GeneXpert MRSA/SA Nasal Compleet sneltest

De GeneXpert MRSA/SA Nasal Compleet sneltest test naast het SCCmec en SPC ook nog op het *Staphylococcal protein A* (SPA). Dit is een eiwit wat specifiek is voor *S. aureus*. Daarnaast wordt ook getest op het *mecA*-gen. Het gen wat de resistentie van *S. aureus* veroorzaakt. Een MRSA/SA Nasal Compleet sneltest wordt pas positief afgeven voor MRSA wanneer zowel het SPA als het *mecA*-gen positief zijn. Een voorbeeld van een positief monster is te zien in figuur 8 hieronder.^[18]



Figuur 8: Een voorbeeld van een positief resultaat voor MRSA in de GeneXpert MRSA/SA Nasal Compleet sneltest.

2. Materiaal en Methode

2.1. Validatie MRSA/SA Nasal Compleet

Tabel 1: Gebruikte stammen in dit onderzoek.

Stam	Bacterie	Isolaatype	Nummer	Groei eisen
M1	Staphylococcus aureus	ATCC	29213	Aeroob
M2	Staphylococcus aureus	Klinisch	13-561350	Aeroob
M3	MRSA	Neqas	13-501095	Aeroob
M3	MRSA	Klinisch	13-597814	Aeroob
M4	MRSA	Klinisch	13-600403	Aeroob
M5	Staphylococcus epidermidis	ATCC	49134	Aeroob
M6	Enterococcus faecium	Klinisch	14-546669	Aeroob
M7	Streptococcus pneumoniae	Klinisch	14-548228	Aeroob
M8	Bacteroides fragilis	Klinisch	14-546530	Anaeroob

2.1.1. Het inzetten van de sneltesten in de GeneXpert

Voor het inzetten van de twee verschillende sneltesten in gebruik gemaakt van het standaard protocol op het lab wat hieronder is kort samengevat:

Inzetten van GeneXpert MRSA/SA Nasal Compleet en GeneXpert MRSA sneltest:

- Werk vanaf nu in de inzetkast (tafel 1)
- Maak de pakketjes met cartridges en reagents open
- Trek handschoenen aan. Vial S bevat bijtende materialen!
- Pipetteer 100µl monster in de S Vial
- Vortex de S Vial 10 seconden op de hoogste stand
- Doe het klepje van de cartridge omhoog
- Pipetteer de vloeistof met een steriele pastette over in opening de van de cartridge. Zorg dat alle vloeistof over wordt gepipetteerd met zo min mogelijk luchtbellen
- Doe het klepje van de cartridge dicht. Houd deze rechtop, niet om laten vallen!

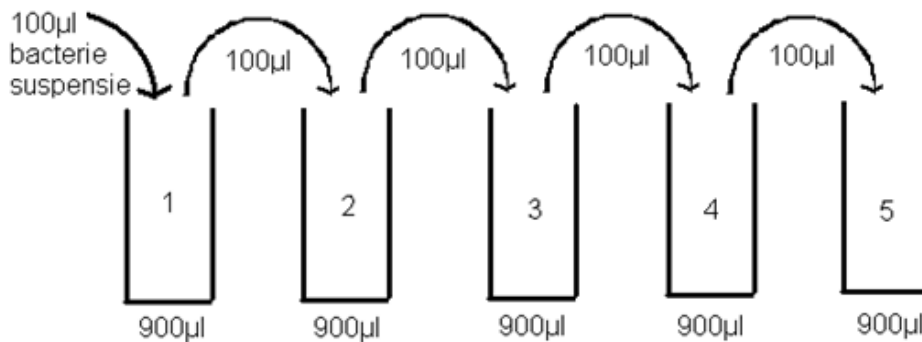
Invoeren in de GeneXpert:

- Log in op de GeneXpert met je eigen gebruikersnaam en wachtwoord
 - Klik op <Create test>
 - Scan de Sample ID barcode m.b.v. de barcode reader. Dit is de 2D code die op de sticker met het monsternummer zit. Rode "+" moet samenvallen met kruispunt op cartridge. Als je piep hoort dan is cartridge gescand. Lukt het scannen niet, klik dan op <manual entry> en voer vervolgens het monsternummer met de hand in. LET OP: gebruik geen apostrof bij <Sample ID>. Indien het een stam betreft dient er 'stam' achter het monsternummer getypt te worden
 - Scan de barcode op de cartridge m.b.v. barcode reader. Lukt het scannen niet, klik dan op <manual entry>. Voer achter elkaar de 2 lange nummers in die op de cartridge verticaal links naast de barcode staan
 - Op het scherm kan afgelezen worden welke module is geselecteerd. Dit kan aangepast worden bij <Select module>
 - Klik op <Start test>
 - Zet de cartridge in de module waarvan het groene lampje knippert
 - Duw het deurtje dicht zodanig dat lampje niet meer knippert
 - Indien nog een cartridge geanalyseerd moet worden, dient de procedure herhaald te worden.
- Een run duurt ongeveer 60 minuten. Tussendoor kan het resultaat gevolgd worden door <View results> aan te klikken. Via <View test> kan het gewenste monster bekeken worden.

2.1.2. Specificiteit van de GeneXpert MRSA/SA Nasal Compleet sneltest

Om de specificiteit te bepalen van de GeneXpert MRSA/SA Nasal Compleet sneltest werd een stam (M2) getest die bekend is met een *SCCmec*-cassette, maar geen *mecA*-gen bevat. Er werd verwacht dat de GeneXpert MRSA sneltest deze positief zou afgeven (fout positief) en de GeneXpert MRSA/SA deze als negatief zou afgeven. Ook werd er een stam (M3) getest waarvan bekend is dat deze positief is voor het *mecA* gen maar negatief is voor de *SCCmec*-cassette. Dit wil zeggen dat het een *Staphylococcus aureus* is met het *mecA* gen en dus een MRSA is, ondanks dat het *SCCmec*-cassette negatief in de PCR is.

Beide stammen, M2 en M3 (zie tabel 1) werden uitgevroren en opgekweekt op een TSA-agar door de platen 18-24 uur in een 37°C stoof te zetten. Van deze stammen werd vervolgens een oplossing gemaakt van 0.5 McFarland ($1,5 \times 10^8$ CFU/ml) door een losliggende kolonie aan te tikken met een wattenstok en deze uit te drukken in een PhoenixTM Inoculum Broth. Deze concentraties werden 10^3 keer door verdund in fysiologisch zout zoals weergegeven in figuur 9 en van deze verdunningen werd 100µl genomen en ingezet in de GeneXpert MRSA/SA Nasal compleet sneltest volgens het protocol dat hierboven is beschreven (2.1.1.). De resultaten van de GeneXpert MRSA sneltest van deze stammen waren al bekend, doordat de stammen eerder getest waren in de diagnostiek.



Figuur 9: Verdunningsreeks van de MRSA stammen. De 100µl bacteriesuspensie komt uit de oplossing van 0.5 McFarland.

2.1.3. Sensitiviteit van de GeneXpert MRSA en de GeneXpert MRSA/SA Nasal Compleet sneltest

Om de sensitiviteit de GeneXpert MRSA en GeneXpert MRSA/SA Nasal Compleet te bepalen werd er gekeken of er verschil is in de Ct-waarden tussen de twee verschillende sneltesten. Dit werd gedaan door de Ct-waarden van het *SCCmec* cassette met elkaar te vergelijken. Er werd gekeken of de GeneXpert MRSA/SA sneltest misschien iets minder gevoelig is dan de GeneXpert MRSA sneltest doordat deze op meerdere targets test.

Allereerst werd een oplossing gemaakt van 0,5 McFarland ($1,5 \cdot 10^8$ CFU/ml) van de twee verschillende MRSA stammen M3 en M4 (zie tabel 1). De verdunningsreeks werd op dezelfde manier gemaakt als bij het bepalen van de sensitiviteit van de beide sneltesten. Wel werd er door verdund tot een 10^5 verdunning. Vervolgens werd er 100µl van elke verdunning een GeneXpert MRSA sneltest en een GeneXpert MRSA/SA Nasal Compleet sneltest ingezet om de Ct-waarden te bepalen. De sneltest werd verder ingezet aan de hand van het protocol op het lab dat beschreven is bij punt 2.1.1. Ook werd er van de geteste verdunningen 100µl op de TSA platen gepipetteerd, uitgespateld met een drigalskispatel en 18-24 uur in een 37°C stoof gezet.

Van deze platen werd de volgende dag een telling gedaan. Met deze tellingen was het mogelijk om te kijken hoeveel er aan bacteriën precies in de verdunning heeft gezeten en welke concentratie er daadwerkelijk bij de Ct-waarden horen die uit de GeneXpert sneltesten zijn gekomen. Voor elke concentratie werd een aparte verdunningsreeks gemaakt. Vervolgens werd er met ijklijnen van de twee verschillende sneltesten en de bijbehorende formules berekend wat het verschil is tussen de twee sneltesten.

2.2. Verminderen van het aantal swabs

2.2.1. De verschillende media

2.2.1.1. Eswab (Copan)

De Eswab van Copan is een medium wat gebruik maakt van een Flocked swab voor de monsterafname, welke vervolgens wordt afgebroken in een buisje met 1ml *Liquid Amies*. De Flocked swab is gemaakt om meer bacteriën op te nemen en weer los te laten wanneer de swab in het medium wordt geplaatst. Vanuit dit medium kunnen verschillende testen worden ingezet, zoals een PCR of de originele kweek. Het medium kan, volgens de fabrikant, zowel aerobe als anaerobe bacteriën 48 uur in leven houden op zowel kamertemperatuur als koelkasttemperatuur voor het inzetten van de verschillende testen.^{[11][23]}



Figuur 10: De Eswab van Copan.

2.2.1.2. Puritan Liquid Amies Transport System (ITK)

De Puritan Liquid Amies Transport System van ITK is een medium wat er lijkt op het medium van Copan. De Puritan Liquid Amies Transport System maakt gebruik van de HydraFlock swab voor de monsterafname en ook deze wordt vervolgens afgebroken in het medium. Het medium, Modified Puritan Liquid Amies transport medium, zorgt ervoor dat zowel aerobe als anaerobe bacteriën in leven blijven om te gebruiken voor het inzetten van verschillende testen. Door de fabrikant wordt in de brochure niets vermeld over de manier van bewaren en hoelang de bacteriën in leven blijven in het medium.^[12]



Figuur 11: De Puritan Liquid Amies Transport System van ITK.

2.2.1.3. Sigma Transwab (Medical Wire)

Als laatste van de drie gekozen media, is er gekozen om de Sigma Transwab van ITK te testen. Ook dit medium maakt gebruik van een swab die na monsterafname wordt afgebroken in een buisje met 1 ml *Liquid Amies Transport Medium*. De swab is wel een stukje kleiner dan van de media van ITK en Copan. De fabrikant zegt dat het medium geschikt is voor zowel aerobe als anaerobe bacteriën en, 24 uur stabiel op kamertemperatuur en 48 uur stabiel op koelkasttemperatuur.^[13]

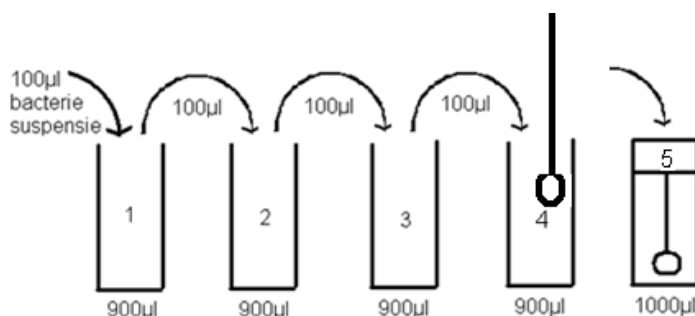


Figuur 12: De Sigma Transwab van Medial Wire.

2.2.2. Een monocultuur

Bij de drie verschillende media (Copan, ITK en Medical Wire) die gebruikt werden om te testen, werd onderzocht wat het verschil is tussen de concentratie bacteriën die na een bepaalde tijd na afname weer uit de swab/medium gehaald kunnen worden. Dit om te kijken of er groei/verlies is in bacterieaantallen en zo ja, hoeveel. Dit werd gedaan met de bacteriestammen M1, M4, M5, M6, M7 en M8 (zie tabel 1)

Alle stammen werden uitgevoren en opgekweekt op een TSA-agar door de platen 18-24 uur in een 37°C stoof te zetten. Stam M8 is echter een uitzondering. Van deze stam werden alle platen anaeroob ingezet. Vervolgens werd er van deze stammen een oplossing gemaakt van 0.5 McFarland ($1,5 \times 10^8$ CFU/ml) door een losliggende kolonie aan te tikken met een wattenstok en deze uit te drukken in een PhoenixTM Inoculum Broth. Deze werd vervolgens verder verdund zoals in figuur 13 met behulp van fysiologisch zout. In verdunning 4 werd vervolgens de wat gestopt uit het te testen medium(5) en deze is 20 seconden blijven staan. Hierna is de wat terug gestopt in het te testen medium en afgebroken. De dop erop gedraaid en toen goed gevortexed. Vervolgens werd op 0, 6, 24 en 48 uur, 10µl en 100µl genomen en op een plaat gepipetteerd, uitgespateld met een drigalskispatel op TSA platen en 18-24 uur in een 37°C stoof gezet (*Bacteroides fragilis* is anaeroob gezet). Een dag later werd door een telling gekeken wat de daadwerkelijke bacterieconcentratie in het medium is geweest. Deze werden vergeleken met de bacterie concentratie die op 0 uur in het medium heeft gezeten. De verschillen zijn in een tabel/grafiek weergegeven. Van een monster worden per te testen medium 2 media ingezet. Eén op kamertemperatuur en één in de koelkast.



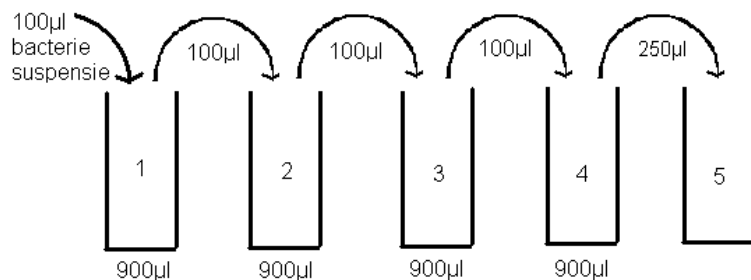
Figuur 13: Verdunningsreeks van de te testenstam. De 100µl bacteriesuspensie komt uit de oplossing van 0.5 McFarland.

2.2.3. Een mengcultuur

Nog een mogelijke invloed is als er meerdere bacteriën in het medium zitten, dat deze door elkaar worden overgroeid als het medium bijvoorbeeld een dag of langer blijft staan^{[23][24]}. Om te controleren of dit gebeurt en hoe vaak dit voorkomt werden er patiënten monsters nagemaakt (spiken) om de zelfde omstandigheden te krijgen. Nu maakt het niet uit als er één bacteriesoort in het medium zit, want positief blijft positief, maar het mag niet zo zijn dat als er meer dan één bacteriesoort in het medium zit, een bacteriesoort gemist wordt door bijvoorbeeld overgroeiing.

Dit werd vervolgens getest door meerdere bacteriën met dezelfde concentraties te mengen en na verschillende tijden (0, 6, 24 en 48 uur) te controleren of deze bacteriën nog terug te vinden waren op de plaat na uitplaten. De resultaten kunnen per medium verschillen en deze proef werd dus voor de verschillende te testen media uitgevoerd. Aan de hand van de resultaten is gezegd welk medium het meest geschikt is om bijvoorbeeld overgroeiing te voorkomen.

Van de stammen M4, M5, M6 en M7 (zie tabel 1) werd een 0,5 McFarland oplossing gemaakt net zoals bij het maken van de monoculturen. Elke te testen stam werd vervolgens verder verdund (figuur 14). Uit verdunning 4 werd vervolgens 250µl genomen en in een lege buis gepipetteerd. De laatste stap werd voor elke stam gedaan om een mengsel te krijgen. Hier werd vervolgens de wat uit het te testen medium in gestopt en deze is 20 seconden blijven staan. Vervolgens werd op 0, 6, 24 en 48 uur, 10µl en 100µl genomen en op een plaat gepipetteerd, uitgespateld met een drigalskisspatel en 18-24 uur in een 37°C stoof gezet. Een dag later werd er door een telling gekeken wat de daadwerkelijke bacterie concentratie in het medium is geweest. Deze werden vergeleken met de bacterie concentratie die op 0 uur in het medium heeft gezeten. De verschillen worden in een tabel/grafiek weergegeven. Van een monster werden per te testen medium 2 media ingezet. Eén op kamertemperatuur en één in de koelkast.



Figuur 14: Verdunningsreeks van de te testen stammen. De 100µl bacteriesuspensie komt uit de oplossing van 0.5 McFarland.

3. Resultaten

3.1. Validatie MRSA/SA Nasal Compleet

3.1.1. Specificiteit

In tabel 2 zijn twee verschillende MRSA stammen weergegeven (M2 en M3). De eerste stam (M3) met monster nummer 13-501095 is in de GeneXpert MRSA/SA Nasal Compleet sneltest positief voor MRSA doordat deze zowel het *mecA* gen als het SPA gen bevat. Dit wil zeggen dat het een *Staphylococcus aureus* is met het *mecA* gen en dus een MRSA is ondanks dat het SCC*mec* cassette negatief is. Met de gewone GeneXpert MRSA sneltest had deze stam als negatief uitgegaan. Een fout negatieve uitslag dus.

Tabel 2: Resultaten van twee verschillende stammen in de GeneXpert MRSA/SA Nasal Compleet sneltest.

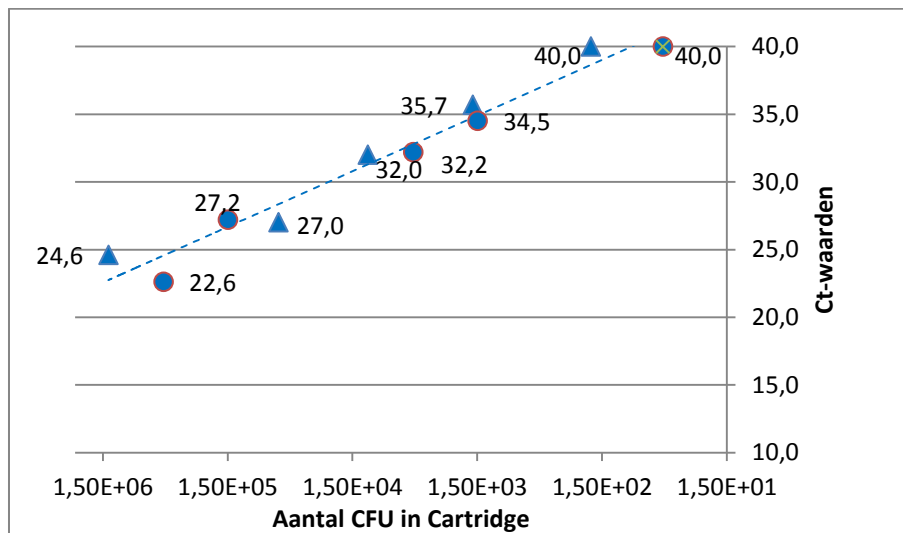
Monster	GeneXpert MRSA/SA Nasal Compleet	SPC ¹ Ct	SPA ² Ct	MecA ³ Ct	SCC ⁴ Ct	Opmerking
13-501095	Positief	35.1	29.1	29.4	0	Is <i>mecA</i> positief maar SCC negatief
13-561350	Negatief	0	25.8	0	27.7	Is <i>mecA</i> negatief maar SCC positief

¹Sample Processing Control; ²Staphylococcal protein A, eiwit specifiek voor SA; ³gen voor methicilline/oxacilline resistentie in *Staphylococcus* spp; ⁴Staphylococcal Cassette Chromosome *mec*. Dit bevat het *mecA*-gen in *S. aureus*.

De tweede stam (M2) met monster nummer 13-561350 is in de GeneXpert MRSA/SA Nasal Compleet sneltest negatief voor MRSA. Hier zijn zowel het SCC*mec* cassette als het SPA gen positief, waardoor het lijkt op een MRSA. Het *mecA* gen is echter negatief en dat wil zeggen dat deze stam een *Staphylococcus aureus* is en géén MRSA. Met de gewone GeneXpert MRSA sneltest had deze stam als positief uitgegaan. Een fout positieve uitslag dus.

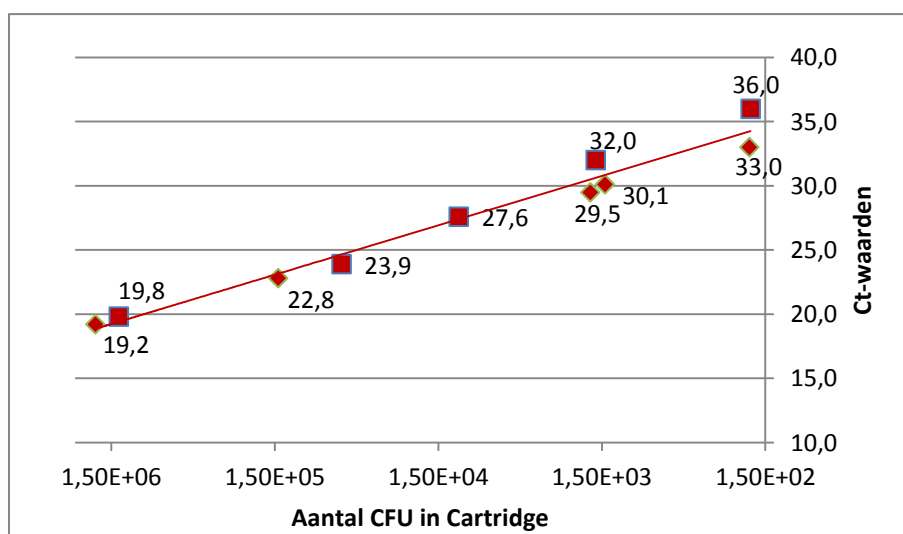
3.1.2. Sensitiviteit

In figuur 15 zijn de resultaten weergegeven die horen bij de verschillende concentraties MRSA die zijn getest met de GeneXpert MRSA/SA Nasal Compleet sneltest. Dit is van twee verschillende MRSA stammen gedaan. Van elke concentratie is een telling gedaan op plaat en de Ct-waarden gemeten met de GeneXpert. De resultaten hiervan zijn weergegeven in de tabellen 5 en 6 van bijlage 1. In figuur 15 is de weergave van de ijklijn met $y = -1.786\ln(x) + 47.968$ als bijbehorende formule.



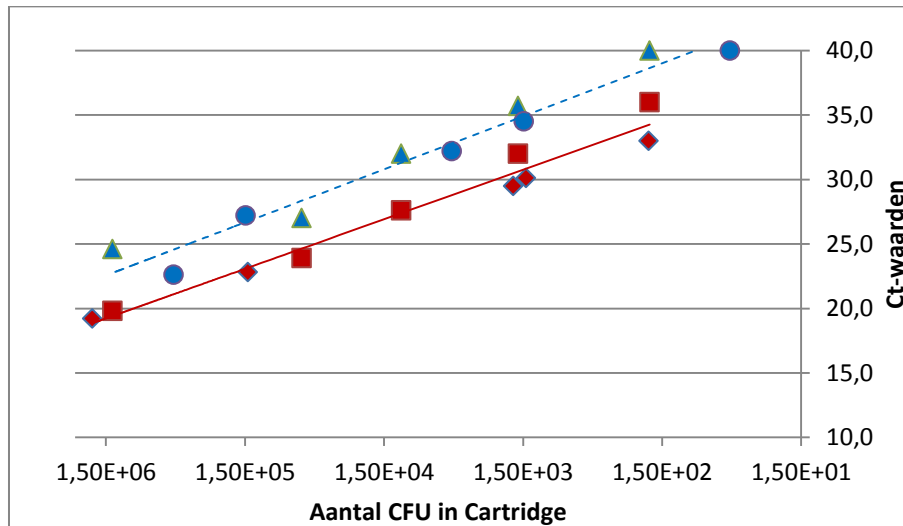
Figuur 15: Aantal CFU in Nasal Cartridge bij verschillende Ct-waarde. Weergave van de twee verschillende geteste MRSA stammen die zijn getest in de MRSA/SA Nasal Compleet sneltest. Hierin is het aantal CFU in de Cartridge op de x-as uitgezet tegen de Ct-waarden op de y-as.

In figuur 16 zijn de resultaten weergegeven die horen bij de verschillende concentraties MRSA die zijn getest met de GeneXpert MRSA sneltest. Dit is van twee verschillende MRSA stammen gedaan. Van elke concentratie is een telling gedaan op plaat en de Ct-waarden gemeten met de GeneXpert. De resultaten hiervan zijn weergegeven in de tabellen 7 en 8 van bijlage 1. In figuur 16 de weergave van de ijklijn met $y = -1.668\ln(x) + 42.963$ als bijbehorende formule.



Figuur 16: Aantal CFU in MRSA Cartridge bij verschillende Ct-waarden. Resultaten van de twee verschillende geteste MRSA stammen die zijn getest in de MRSA sneltest. Hierin is het aantal CFU in de Cartridge op de x-as uitgezet tegen de Ct-waarden op de y-as.

In figuur 17 is weergegeven wat het verschil is tussen de twee verschillende sneltesten door deze in één figuur neer te zetten. Hierin is duidelijk weergegeven dat de ijklijn van de MRSA sneltest een stuk lager ligt dan de ijklijn van de MRSA/SA Nasal Compleet sneltest, wat aangeeft dat de MRSA sneltest een stuk gevoeliger is dan de MRSA/SA Nasal Compleet sneltest.



Figuur 17: Aantal CFU in MRSA Cartridge bij verschillende Ct-waarden. Weergave van de twee verschillende geteste MRSA stammen in de twee verschillende sneltesten. Hierin is het aantal CFU in de Cartridge op de x-as uitgezet tegen de Ct-waarden op de y-as.

3.1.3. Vergelijken van de sneltesten

Vervolgens is er met de ijklijn van de GeneXpert MRSA sneltest ($-1.668\ln(x) + 42.963$) en de GeneXpert MRSA/SA Nasal Compleet sneltest ($-1.786\ln(x) + 47.968$) berekend wat het verschil is tussen de twee sneltesten. Hiervoor zijn 5 verschillende theoretische concentraties genomen zoals te zien in tabel 3. Dit zijn concentraties waarin die vallen binnen de gemaakte verdunningsreeksen. De theoretische concentraties zijn vervolgens ingevoerd als x in de formules van beide sneltesten om de bijbehorende Ct-waarden te berekenen. Vervolgens is tussen de berekende Ct-waarden het verschil berekend. Gemiddeld komt het verschil in Ct-waarden uit op 3,9 Ct's. De Ct-waarden van de GeneXpert MRSA/SA Nasal Compleet sneltest liggen gemiddeld dus 3,9 Ct's hoger.

Tabel 3: De berekende Ct-waarden bij de theoretische concentraties van de twee verschillende sneltesten en het berekende verschil tussen de Ct-waarden deze twee sneltesten.

Concentratie	Ct-waarde MRSA	Ct-waarde Nasal	Vershil
1.50E+06	19.2	22.6	3.3
1.50E+05	23.1	26.7	3.6
1.50E+04	26.9	30.8	3.9
1.50E+03	30.8	34.9	4.1
1.50E+02	34.6	39.0	4.4
	Gemiddelde		3.9

Met het berekende verschil is vervolgens gekeken wat dit betekent wanneer de sneltest in de diagnostiek gebruikt zou worden. Voor het vergelijken hiervan is gekeken naar klinische monsters uit de periode 1 April 2013 t/m 30 November 2013. In deze periode zijn 16 positieve MRSA monsters met de MRSA sneltest gedetecteerd. Bij een gemiddelde van 3,9 Ct-waarden hoger zouden met de MRSA/SA Nasal Compleet, vier monsters zijn gemist. De monsters zijn weergegeven in tabel 4. Andere monsters van deze patiënten waren zouden wel positief zijn geweest met de MRSA/SA Nasal Compleet, dus er zouden geen patiënten zijn gemist zoals te zien is in tabel 9 van bijlage 2.

Tabel 4: Monsters die zouden zijn gemist met de GeneXpert MRSA/SA Nasal Compleet sneltest wanneer er een gemiddeld Ct-waarde verschil van 3,9 zou zijn opgeteld bij de uitslag van de GeneXpert MRSA sneltest.

Monsternummer	Kweek uitslag	MRSA sneltest Uitslag	SCCmec Ct-waarden MRSA Sneltest	Berekende SCCmec Ct-waarden met de Nasal sneltest (+ 3.9)
13-572285-01	Negatief	Positief	36,0	39,9
13-563193-01	Positief	Positief	35,8	39,7
13-541498-01	Negatief	Positief	35,0	38,9
13-533133-01	Negatief	Positief	34,9	38,8

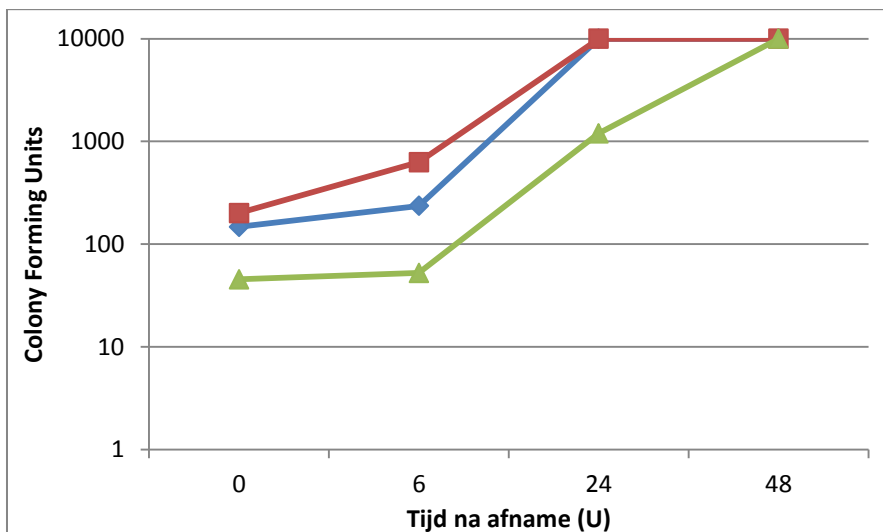
De monsters uit tabel 4 zouden zijn gemist doordat de *cut-off* waarde voor het SCCmec-cassette in de GeneXpert MRSA/SA Nasal Compleet sneltest is vastgesteld op Ct 38,0. Voor de GeneXpert MRSA sneltest is dit vastgesteld op Ct 36,0.

3.2. Verminderen van het aantal swabs

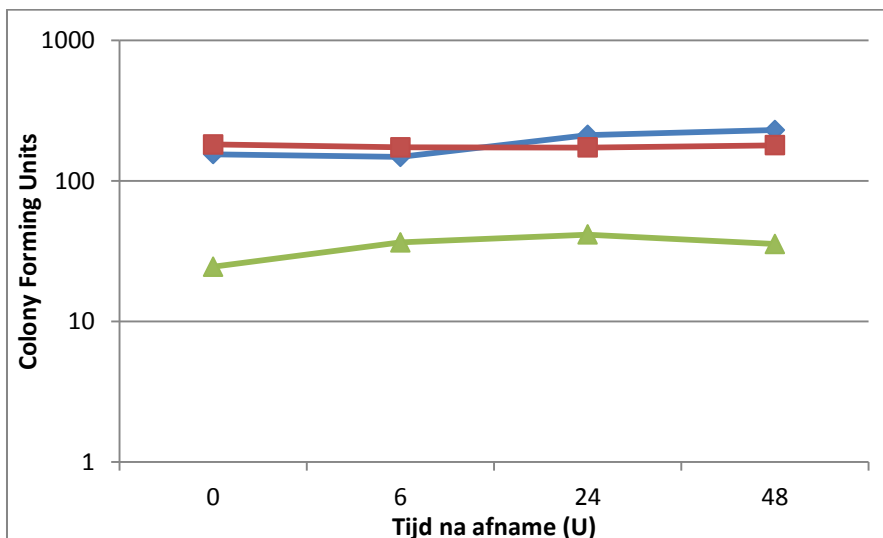
3.2.1. Monoculturen

3.2.1.1 *Staphylococcus aureus* (M1)

In de figuren 18 en 19 is het medium van Copan weergegeven in blauw, het medium van ITK in rood en het medium van Medical Wire groen. In figuur 18 is weergegeven dat *Staphylococcus aureus* op kamertemperatuur verder groeit in alle drie de verschillende media. Wanneer de media in de koelkast bewaart worden (figuur 19), is weergegeven dat de bacterieconcentratie gelijk blijft aan de concentratie die gelijk na afname (tijdstip 0) in de verschillende media is gestopt. Exacte data horend bij deze figuren zijn weergegeven in tabel 10 van bijlage 3.



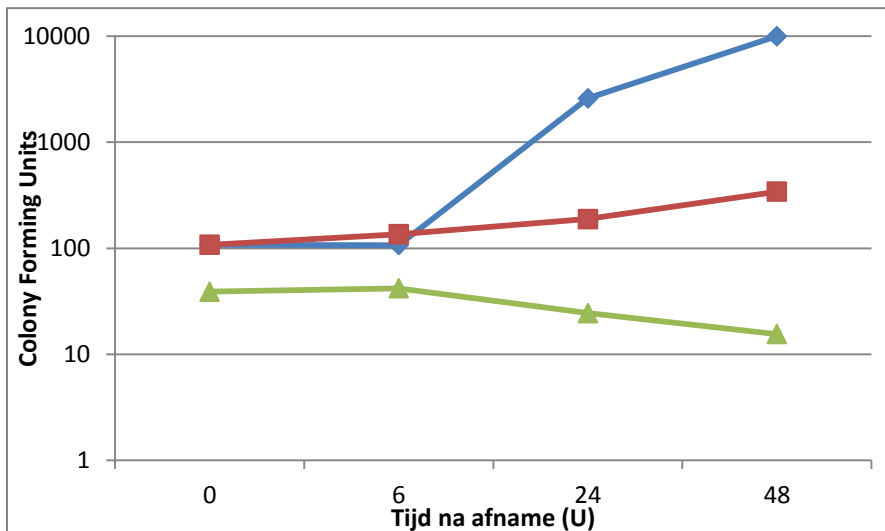
Figuur 18: Effect van het kamertemperatuur op het aantal CFU in het medium. Resultaten van de *Staphylococcus aureus* in de media van Copan, ITK en Medical Wire wanneer deze worden bewaard bij kamertemperatuur. Hierin is de tijd na afname in uren op de x-as uitgezet tegen het aantal CFU op de y-as.



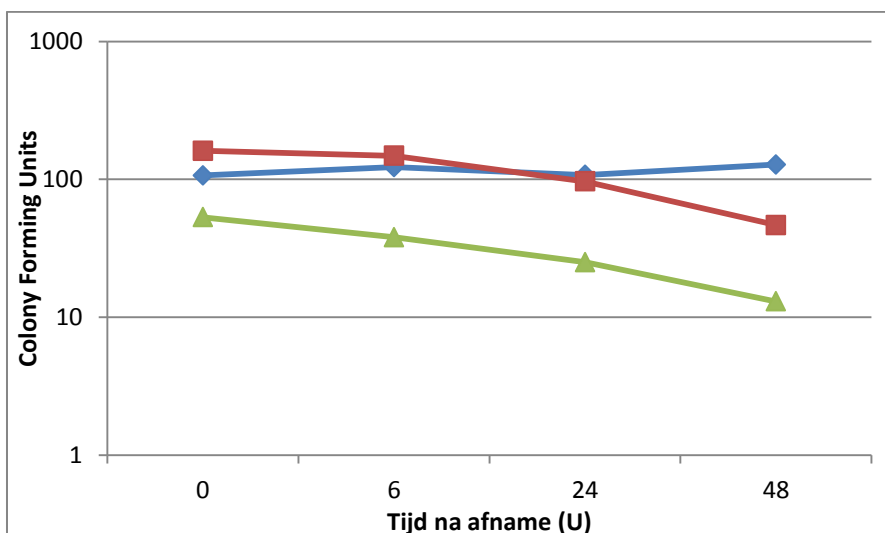
Figuur 19: Effect van koelkasttemperatuur op het aantal CFU in het medium. Resultaten van de *Staphylococcus aureus* in de media van Copan, ITK en Medical Wire wanneer deze worden bewaard bij koelkasttemperatuur. Hierin is de tijd na afname in uren op de x-as uitgezet tegen het aantal CFU op de y-as.

3.2.1.2. *Staphylococcus epidermidis* (M5)

In de figuren 20 en 21 is het medium van Copan weergegeven in blauw, het medium van ITK in rood en het medium van Medical Wire groen. In figuur 20 is weergegeven dat *Staphylococcus epidermidis* op kamertemperatuur verder groeit in het medium van Copan. Ook in het medium van ITK groeit de bacterie iets verder, terwijl de bacterieconcentratie in het medium van Medical Wire iets afneemt. Als de media in de koelkast bewaard zijn (figuur 21), is te zien dat de bacterieconcentratie gelijk blijft bij het medium van Copan, maar afneemt bij de andere twee media naar mate de media langer in de koelkast staan. Exacte data horend bij deze figuren zijn weergegeven in tabel 11 van bijlage 3.



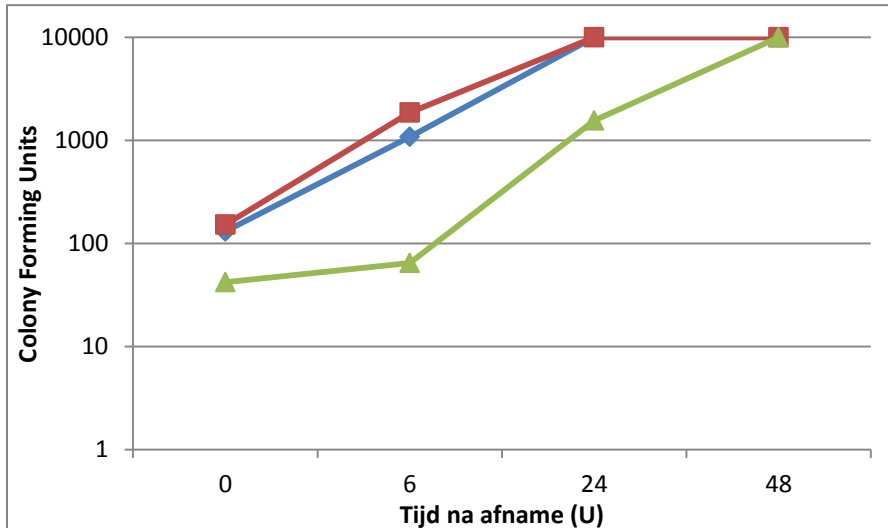
Figuur 20: Effect van het kamertemperatuur op het aantal CFU in het medium. Resultaten van de *Staphylococcus epidermidis* in de media van Copan, ITK en Medical Wire wanneer deze worden bewaard bij kamertemperatuur. Hierin is de tijd na afname in uren op de x-as uitgezet tegen het aantal CFU op de y-as.



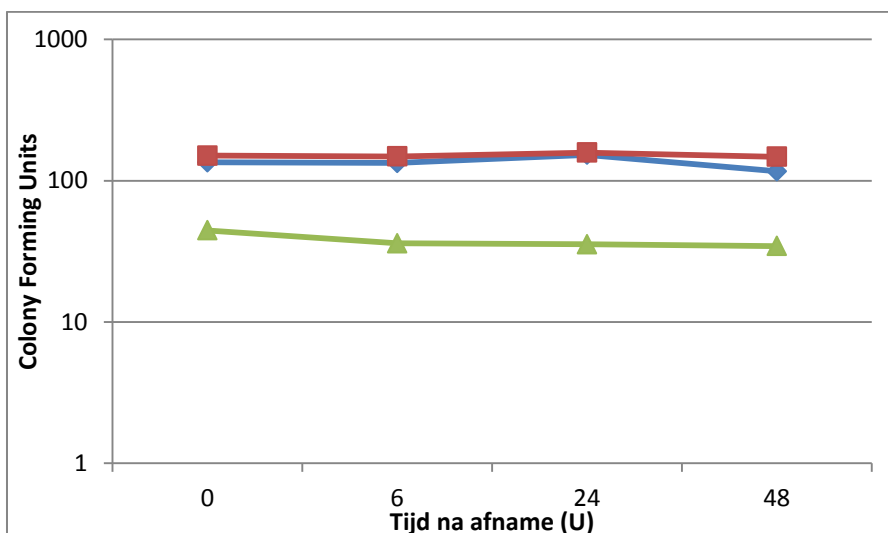
Figuur 21: Effect van koelkasttemperatuur op het aantal CFU in het medium. Resultaten van de *Staphylococcus epidermidis* in de media van Copan, ITK en Medical Wire wanneer deze worden bewaard bij koelkasttemperatuur. Hierin is de tijd na afname in uren op de x-as uitgezet tegen het aantal CFU op de y-as.

3.2.1.3. *Enterococcus faecium* (M6)

Voor *Enterococcus faecium* geldt eigenlijk hetzelfde als voor de *S. aureus*. In figuren 22 en 23 is het medium van Copan weergegeven in blauw, het medium van ITK in rood en het medium van Medical Wire groen. In figuur 22 is weergegeven dat *Enterococcus faecium* op kamertemperatuur verder groeit in alle drie de verschillende media. Wanneer de media in de koelkast bewaard zijn, is te zien dat de concentratie gelijk blijft aan de concentratie die gelijk na afname (tijdstip 0) in de verschillende media is gestopt (figuur 23). Exacte data horend bij deze figuren zijn weergegeven in tabel 12 van bijlage 3.



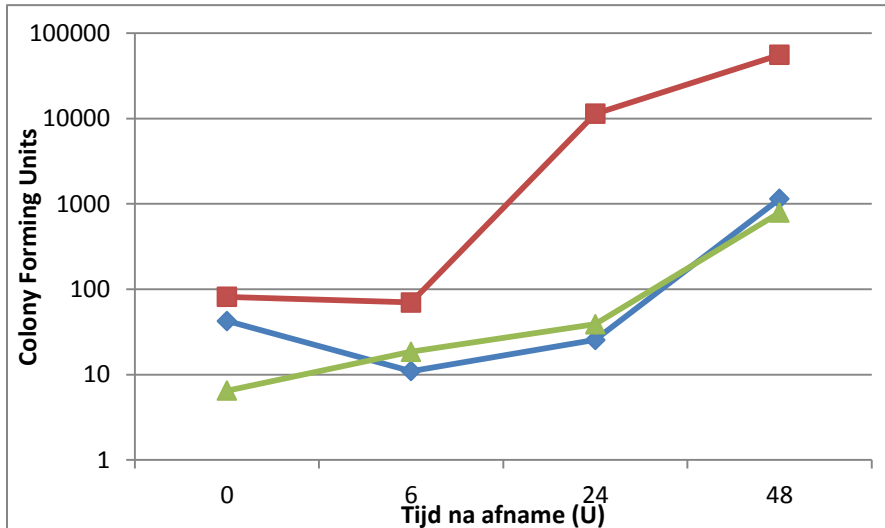
Figuur 22: Effect van het kamertemperatuur op het aantal CFU in het medium. Resultaten van de *Enterococcus faecium* in de media van Copan, ITK en Medical Wire wanneer deze worden bewaard bij kamertemperatuur. Hierin is de tijd na afname in uren op de x-as uitgezet tegen het aantal CFU op de y-as.



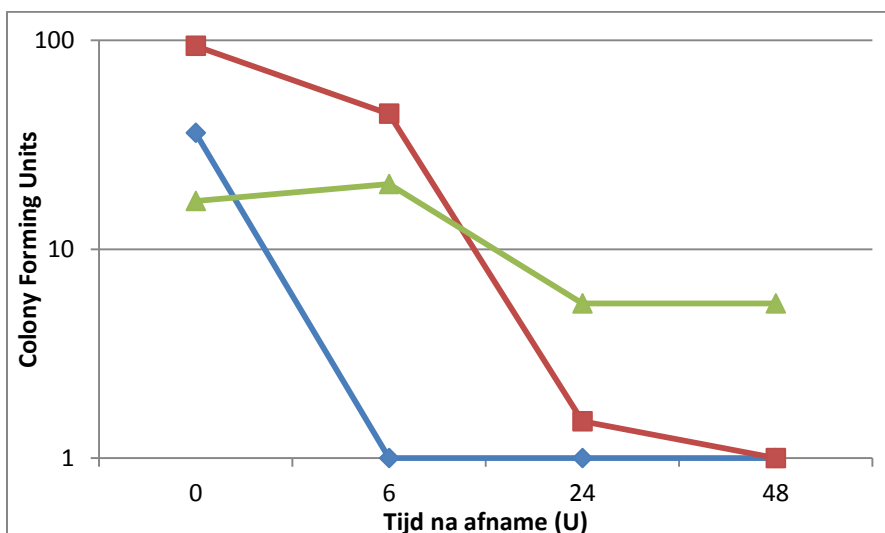
Figuur 23: Effect van koelkasttemperatuur op het aantal CFU in het medium. Resultaten van de *Enterococcus faecium* in de media van Copan, ITK en Medical Wire wanneer deze worden bewaard bij koelkasttemperatuur. Hierin is de tijd na afname in uren op de x-as uitgezet tegen het aantal CFU op de y-as.

3.2.1.4. *Streptococcus pneumoniae* (M7)

In de figuren 24 en 25 is het medium van Copan weergegeven in blauw, het medium van ITK in rood en het medium van Medical Wire groen. Bij de *Streptococcus pneumoniae* is in figuur 24 te zien dat wanneer de media bij kamertemperatuur worden opgeslagen, de bacterieconcentratie bij alle drie de verschillende media toeneemt (figuur 25). Echter bij het bewaren in de koelkast (figuur 25) neemt de bacterieconcentratie bij alle media af. Bij de media van Copan (na 6 uur) en ITK (na 48 uur) is de *Streptococcus pneumoniae* zelfs helemaal niet meer terug te zien op de plaat. Exacte data horend bij deze figuren zijn weergegeven in tabel 13 van bijlage 3.



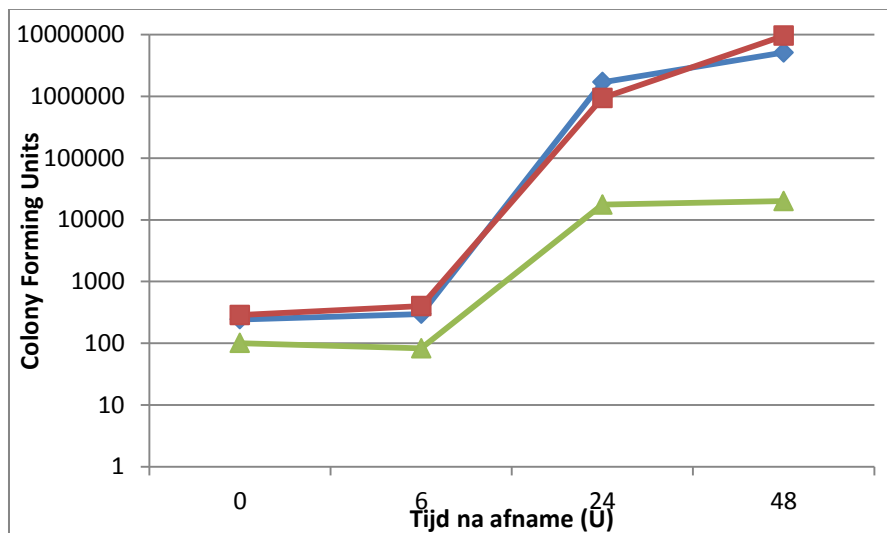
Figuur 24: Effect van het kamertemperatuur op het aantal CFU in het medium. Resultaten van de *Streptococcus pneumoniae* in de media van Copan, ITK en Medical Wire wanneer deze worden bewaard bij kamertemperatuur. Hierin is de tijd na afname in uren op de x-as uitgezet tegen het aantal CFU op de y-as.



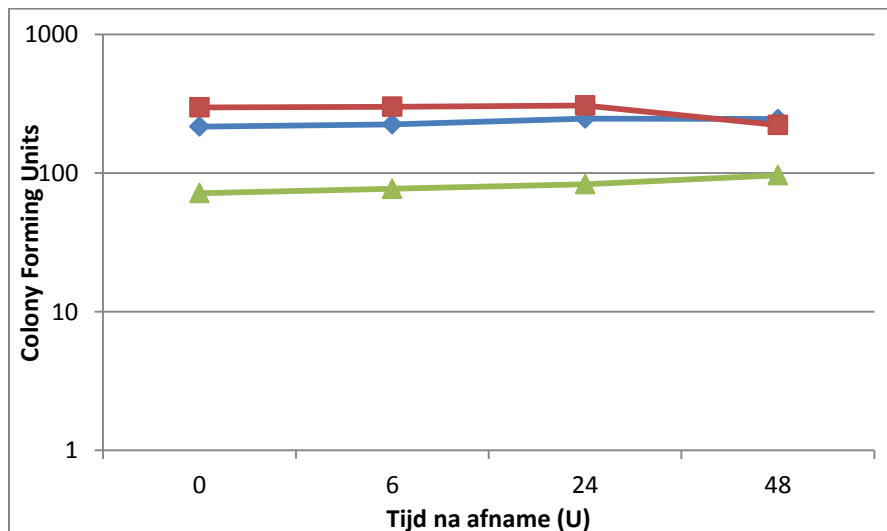
Figuur 25: Effect van koelkasttemperatuur op het aantal CFU in het medium. Resultaten van de *Streptococcus pneumoniae* in de media van Copan, ITK en Medical Wire wanneer deze worden bewaard bij koelkasttemperatuur. Hierin is de tijd na afname in uren op de x-as uitgezet tegen het aantal CFU op de y-as.

3.2.1.5. MRSA (M4)

In de figuren 26 en 27 is het medium van Copan weergegeven in blauw, het medium van ITK in rood en het medium van Medical Wire groen. In figuur 26 is weergegeven dat de MRSA, net als de gevoelige *Staphylococcus aureus*, op kamertemperatuur verder groeit in alle drie de verschillende media. Wanneer de media in de koelkast bewaart zijn is te zien dat de concentratie gelijk blijft aan de concentratie die gelijk na afname (tijdstip 0) in de verschillende media is gestopt (figuur 27). Exacte data horend bij deze figuren zijn weergegeven in tabel 14 van bijlage 3.



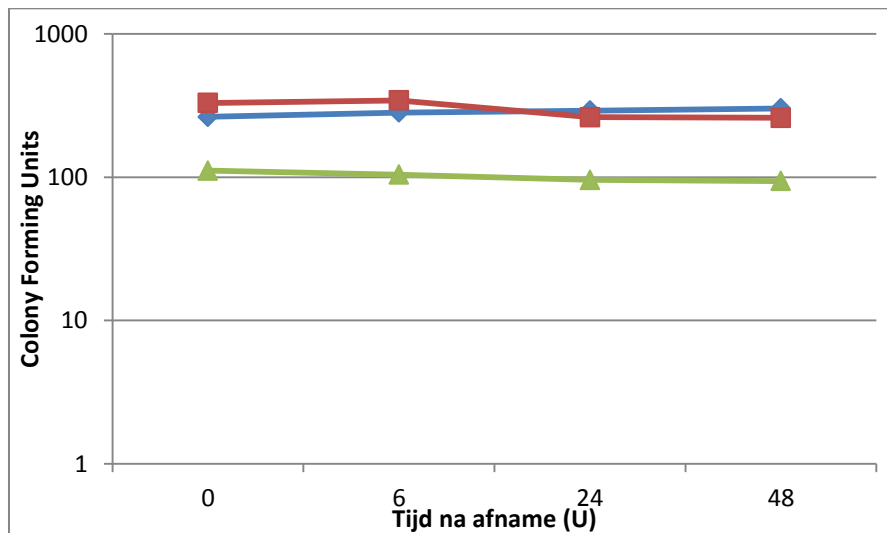
Figuur 26: Effect van het kamertemperatuur op het aantal CFU in het medium. Resultaten van de MRSA in de media van Copan, ITK en Medical Wire wanneer deze worden bewaard bij kamertemperatuur. Hierin is de tijd na afname in uren op de x-as uitgezet tegen het aantal CFU op de y-as.



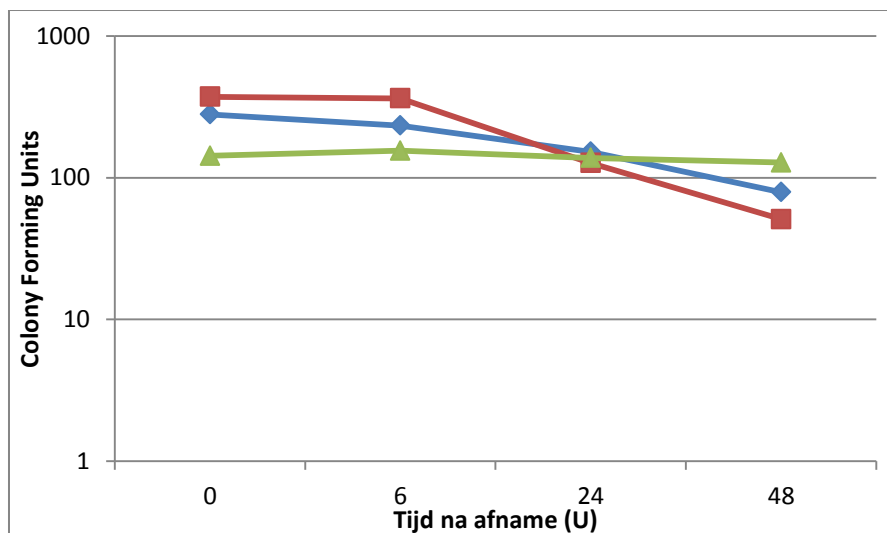
Figuur 27: Effect van koelkasttemperatuur op het aantal CFU in het medium. Resultaten van de MRSA in de media van Copan, ITK en Medical Wire wanneer deze worden bewaard bij koelkasttemperatuur. Hierin is de tijd na afname in uren op de x-as uitgezet tegen het aantal CFU op de y-as.

3.2.1.6. *Bacteroides fragilis* (M8)

In de figuren 28 en 29 is het medium van Copan weergegeven in blauw, het medium van ITK in rood en het medium van Medical Wire groen. *Bacteroides fragilis* is als laatste stam getest als monocultuur. In figuur 28 is weergegeven dat de *Bacteroides fragilis* op kamertemperatuur een gelijke concentratie houdt naarmate deze langere tijd in de verschillende media blijft staan. Wanneer de verschillende media met *Bacteroides fragilis* zijn bewaard in de koelkast neemt de bacterieconcentratie iets af bij het medium van Copan en ITK, maar blijft gelijk in het medium van Medical Wire (figuur 29). Exacte data horend bij deze figuren zijn weergegeven in tabel 15 van bijlage 3.



Figuur 28: Effect van het kamertemperatuur op het aantal CFU in het medium. Resultaten van de *Bacteroides fragilis* in de media van Copan, ITK en Medical Wire wanneer deze worden bewaard bij kamertemperatuur. Hierin is de tijd na afname in uren op de x-as uitgezet tegen het aantal CFU op de y-as.

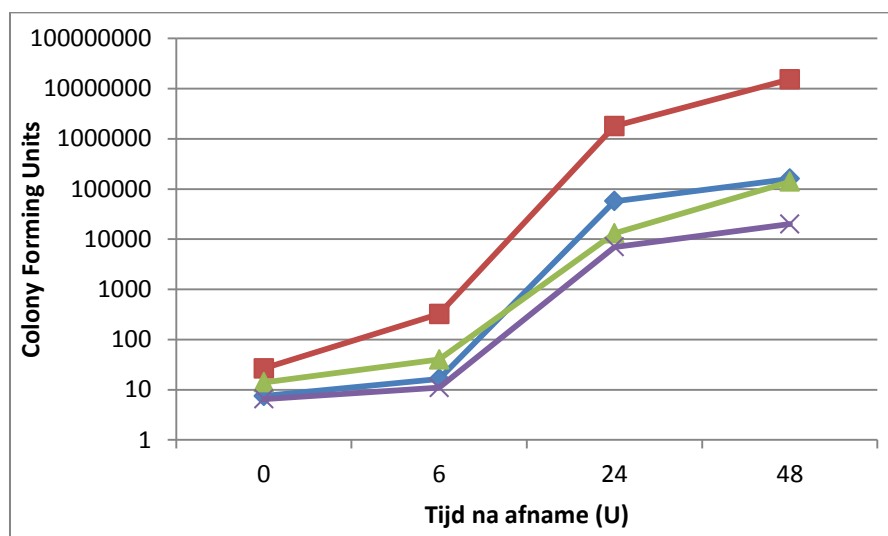


Figuur 29: Effect van koelkasttemperatuur op het aantal CFU in het medium. Resultaten van de *Bacteroides fragilis* in de media van Copan, ITK en Medical Wire wanneer deze worden bewaard bij koelkasttemperatuur. Hierin is de tijd na afname in uren op de x-as uitgezet tegen het aantal CFU op de y-as.

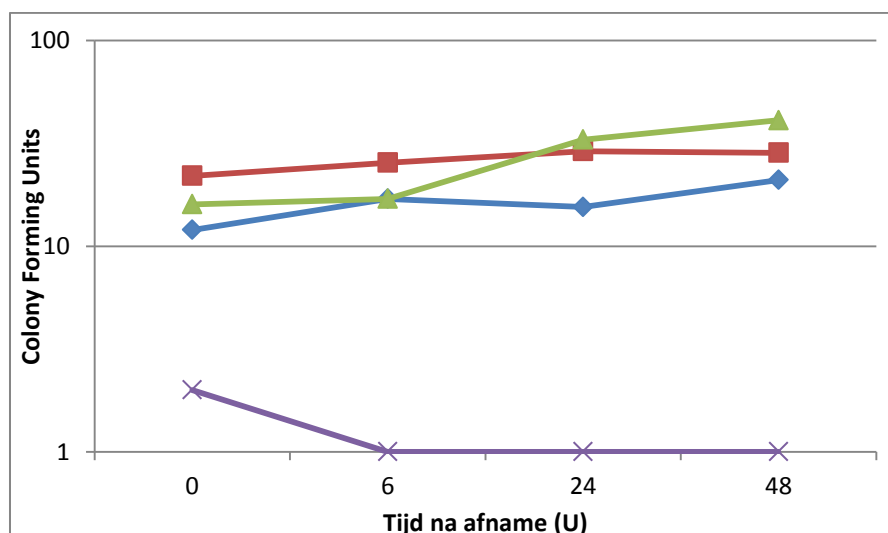
3.2.2. Mengcultuur

3.2.2.1. Medium van Copan

In de figuren 30 en 31 is de MRSA in blauw, de *E. faecium* in rood, de *S. epidermidis* in groen en de *S. pneumoniae* in het paars weergegeven. In figuur 30 is weergegeven wat de vier verschillende bacteriestammen doen in het medium van Copan. Bij kamertemperatuur is weergegeven dat elke bacteriestam een toenemende bacterieconcentratie heeft. Wanneer het medium bij koelkasttemperatuur is bewaard is dit echter niet het geval (figuur 31). Hier is te zien dat de bacterieconcentratie van de MRSA, *Enterococcus faecium* en *Staphylococcus epidermidis* vrijwel gelijk blijft aan de oorspronkelijke concentratie. De bacterieconcentratie van de *Streptococcus pneumoniae* neemt echter snel af en is na 6 uur niet meer te zien op de plaat. Exacte data horend bij deze figuren zijn weergegeven in tabellen 16, 17, 18 en 19 van bijlage 4.



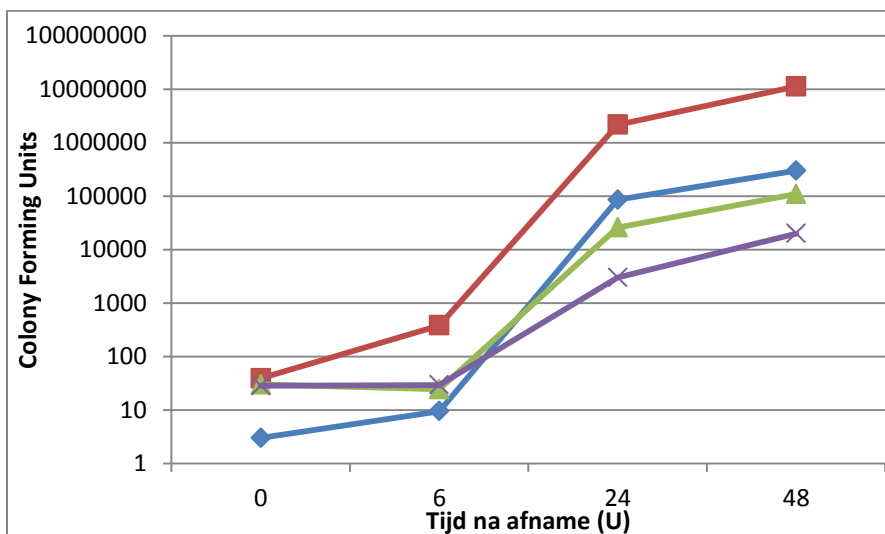
Figuur 30: Effect van kamertemperatuur op het aantal CFU van een mengcultuur in de Eswab (Copan). Resultaten van de vier verschillende bacteriesoorten in het medium van Copan wanneer deze wordt bewaard bij kamertemperatuur. Hierin is de tijd na afname in uren op de x-as uitgezet tegen het aantal CFU op de y-as.



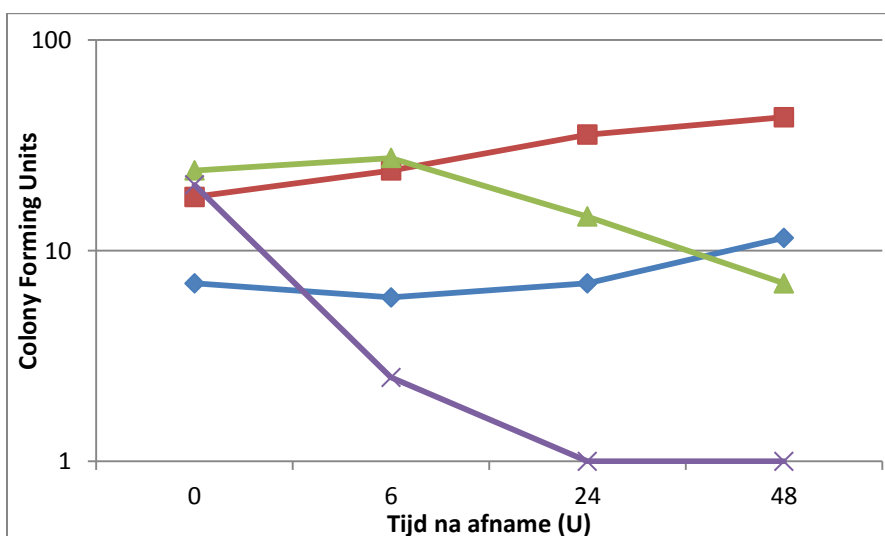
Figuur 31: Effect van koelkasttemperatuur op het aantal CFU van een mengcultuur in de Eswab (Copan). Resultaten van de vier verschillende bacteriesoorten in het medium van Copan wanneer deze wordt bewaard bij koelkasttemperatuur. Hierin is de tijd na afname in uren op de x-as uitgezet tegen het aantal CFU op de y-as.

3.2.2.2. Medium van ITK

In de figuren 32 en 33 is de MRSA in blauw, de *E. faecium* in rood, de *S. epidermidis* in groen en de *S. pneumoniae* in het paars weergegeven. Hier is echter het medium van ITK weergegeven. Bij kamertemperatuur (figuur 32) is weergegeven dat elke bacteriestam een toenemende bacterieconcentratie heeft. Wanneer het medium bij koelkasttemperatuur is bewaard (figuur 33), is dit echter niet het geval. Hier is weergegeven dat de bacterieconcentratie van de MRSA iets toeneemt vergeleken met de oorspronkelijke concentratie en de bacterieconcentratie van de *Enterococcus faecium* vrijwel gelijk blijft aan de oorspronkelijke concentratie. De bacterieconcentratie van de *Staphylococcus epidermidis* en de *Streptococcus pneumoniae* neemt snel af. De *Streptococcus pneumoniae* is na 24 uur niet meer te zien op de plaat. Exacte data horend bij deze figuren zijn weergegeven in tabellen 16, 17, 18 en 19 van bijlage 4.



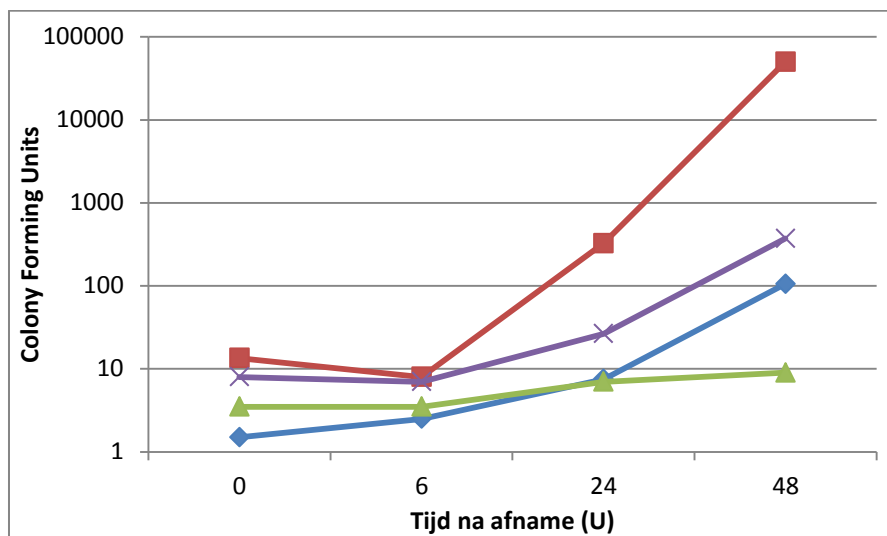
Figuur 32: Effect van kamertemperatuur op het aantal CFU van een mengcultuur in de Puritan Liquid Amies Transport System (ITK). Resultaten van de vier verschillende bacteriesoorten in het medium van ITK wanneer deze wordt bewaard bij kamertemperatuur. Hierin is de tijd na afname in uren op de x-as uitgezet tegen het aantal CFU op de y-as.



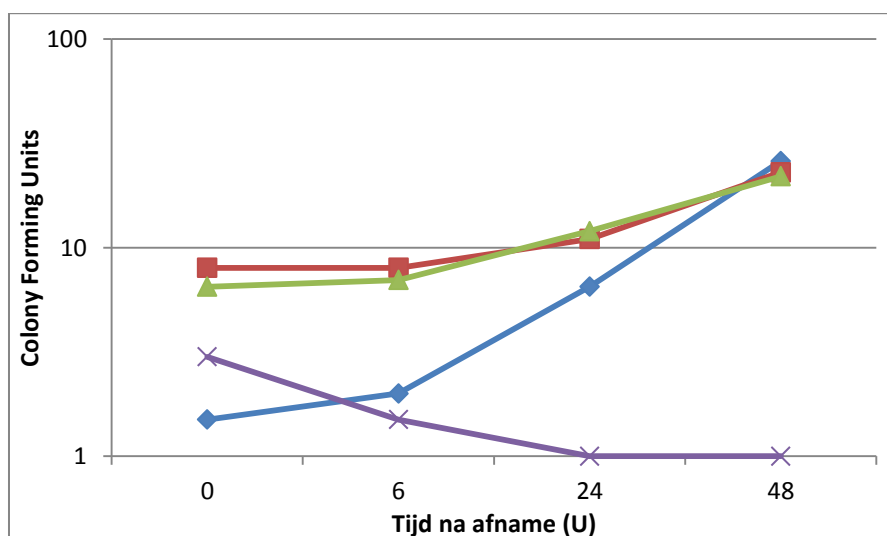
Figuur 33: Effect van koelkasttemperatuur op het aantal CFU van een mengcultuur in de Puritan Liquid Amies Transport System (ITK). Resultaten van de vier verschillende bacteriesoorten in het medium van ITK wanneer deze wordt bewaard bij koelkasttemperatuur. Hierin is de tijd na afname in uren op de x-as uitgezet tegen het aantal CFU op de y-as.

3.2.2.3. Medium van Medical Wire

Als laatste weergegeven zijn de vier verschillende bacteriestammen in het medium van Medical Wire. In de figuren 34 en 35 is de MRSA in blauw, de *E. faecium* in rood, de *S. epidermidis* in groen en de *S. pneumoniae* in het paars weergegeven. Bij kamertemperatuur (figuur 34) is weergegeven dat elke bacteriestam een toenemende bacterieconcentratie heeft. Wanneer het medium bij koelkasttemperatuur is bewaard is dit niet het geval (figuur 35). Hier is weergegeven dat de bacterieconcentratie van de MRSA, *Enterococcus faecium* en de *Staphylococcus epidermidis* iets toeneemt vergeleken met de oorspronkelijke concentratie. De bacterieconcentratie van en de *Streptococcus pneumoniae* neemt echter wel af en de *Streptococcus pneumoniae* is na 24 uur niet meer te zien op de plaat. Exacte data horend bij deze figuren zijn weergegeven in tabellen 16, 17, 18 en 19 van bijlage 4.



Figuur 34: Effect van kamertemperatuur op het aantal CFU van een mengcultuur in de Sigma Transwab (Medical Wire). Resultaten van de vier verschillende bacteriesoorten in het medium van Medical Wire wanneer deze wordt bewaard bij kamertemperatuur. Hierin is de tijd na afname in uren op de x-as uitgezet tegen het aantal CFU op de y-as.



Figuur 35: Effect van koelkasttemperatuur op het aantal CFU van een mengcultuur in de Sigma Transwab (Medical Wire). Resultaten van de vier verschillende bacteriesoorten in het medium van Medical Wire wanneer deze wordt bewaard bij koelkasttemperatuur. Hierin is de tijd na afname in uren op de x-as uitgezet tegen het aantal CFU op de y-as.

4. Conclusie en Discussie

4.1. Conclusie

4.1.1. Validatie van de GeneXpert MRSA/SA Nasal Compleet sneltest

4.1.1.1. Specificiteit

De specificiteit van de GeneXpert MRSA/SA Nasal Compleet sneltest is beter dan de specificiteit van de GeneXpert MRSA sneltest zoals weergegeven in tabel 2. Dit maakt de kans op fout positieve en fout negatieve uitslagen kleiner. Dit komt doordat de GeneXpert MRSA/SA Nasal Compleet sneltest op meer parameters test.

4.1.1.2. Sensitiviteit

De absolute sensitiviteit van de GeneXpert MRSA/SA Nasal Compleet sneltest is gemiddeld 3,9 Ct-waarden minder dan de absolute sensitiviteit van de GeneXpert MRSA sneltest die op dit moment gebruikt wordt (tabel 3). Hierdoor bestaat de kans dat er monsters worden gemist (tabel 4). Klinisch blijkt dat bij meerdere monsters van een patiënt, andere monsters wel positief zijn (tabel 9 van bijlage 2). Dit komt doordat de GeneXpert MRSA/SA Nasal Compleet sneltest op 4 verschillende parameters test, in plaats van 2 parameters zoals de GeneXpert MRSA sneltest doet.

4.1.2. Verminderen van het aantal swabs

4.1.2.1. Monocultuur

Uit de resultaten van het testen van één bacteriestam in drie verschillende media is te concluderen dat de media op elke bacteriesoort een andere invloed hebben. Duidelijk is het verschil te zien van het bewaren van de media op kamertemperatuur en op koelkasttemperatuur. De resultaten van de media die bij een temperatuur in de koelkast hebben gestaan laten zien dat deze media de bacterieconcentratie niet sterk beïnvloeden. Dit geldt echter niet voor de *Streptococcus pneumoniae*. Deze heeft bij een temperatuur in de koelkast moeite om in leven te blijven en de concentratie neemt dan ook bij alle drie de media af. Bij de media van Copan en ITK groeit deze na respectievelijk 6 en 48 uur helemaal niet meer (figuur 25).

4.1.2.2. Mengcultuur

De resultaten van het testen van een mengcultuur in de verschillende media lijken erg op de resultaten van de monocultuur. Wanneer de media zijn bewaard bij kamertemperatuur groeien de geteste bacteriesoorten door. Bij het medium van Medical Wire gebeurt dit minder snel dan bij de media van Copan en ITK. Voor de koelkasttemperatuur komen de resultaten overeen met de resultaten in de monoculturen dus is er geen remming ontstaan door overgroeiing van andere bacteriesoorten.

4.1.2.3. Vergelijken van de media

Van de drie verschillende media is het Medium van Medical Wire het meest geschikt omdat de bacterieconcentraties van de verschillende bacteriestammen in dit medium zowel bij kamertemperatuur als bij koelkasttemperatuur het meest representatief blijft. Wel is de wat voor de monsterafname van dit medium kleiner wat ervoor zorgt dat er bij de monsterafname minder bacteriën worden opgenomen.

4.1.3. Verbeteren van de huidige moleculaire snel diagnostiek voor MRSA in het UMC Utrecht

Kort samengevat is gebleken dat GeneXpert MRSA/SA Nasal Compleet sneltest specifiek is dan de GeneXpert MRSA sneltest zonder daadwerkelijk positieve patiënten te missen door een mindere gevoeligheid. Verder is het medium van Medical Wire het meest geschikt voor het vervangen van de droge wattenstokken die op dit moment nog in het UMC Utrecht worden gebruikt.

4.2. Discussie

Voor het verbeteren van de moleculaire snel diagnostiek voor MRSA in het UMC Utrecht is gekeken naar de validatie van de GeneXpert MRSA/SA Nasal Compleet sneltest en het vergelijken van drie verschillende media om het aantal swabs in het UMC te kunnen verminderen. Tevens moet het medium kunnen dienen als back up wanneer een eerder ingezette test mislukt.

4.2.1. Validatie van de GeneXpert MRSA/SA Nasal Compleet sneltest

De resultaten van het testen van de GeneXpert MRSA/SA Nasal Compleet sneltest op de specificiteit en de sensitiviteit laten zien dat de test geschikt is om te gebruiken als sneltest voor MRSA. De specificiteit is een stuk beter dan die van de GeneXpert MRSA sneltest wat de kans op zowel fout-positieve als fout-negatieve uitslagen verkleint. Verder is door het testen van de sensitiviteit van de GeneXpert MRSA/SA Nasal Compleet sneltest met twee verschillende stammen, aangetoond dat er een gemiddeld verschil van 3,9 Ct-waarden zit tussen GeneXpert MRSA/SA Nasal Compleet sneltest en de GeneXpert MRSA sneltest (tabel 3). De MRSA/SA Nasal Compleet sneltest is dus een stuk minder gevoelig. Hierdoor bestaat de kans dat er monsters worden gemist. Klinisch blijkt dat bij meerdere monsters van een patiënt, andere monsters wel positief zijn. Echter, wanneer er een patiënt getest wordt met een hele lage concentratie MRSA, is er dus wel degelijk een mogelijkheid dat deze in de GeneXpert MRSA/SA Nasal Compleet sneltest wordt gemist. Wel blijft de standaard kweek voor MRSA altijd de gouden standaard.

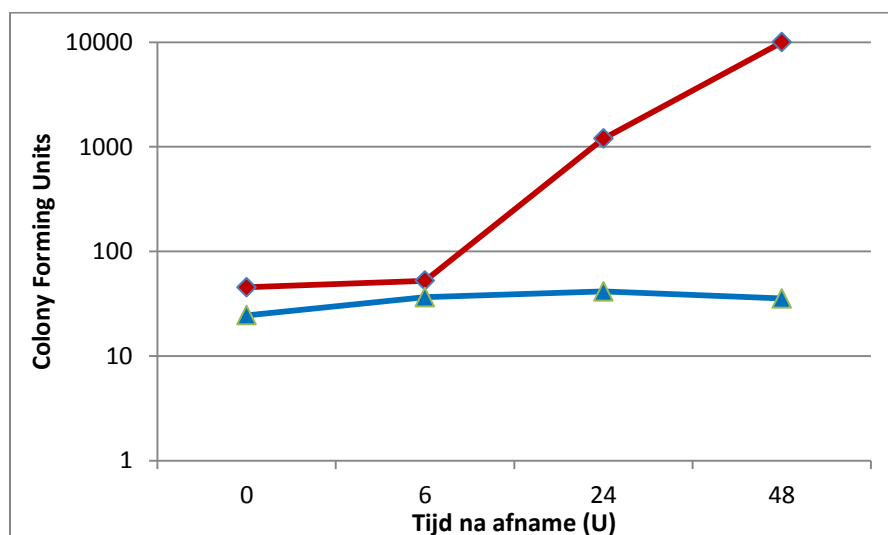
Tabel 3 geeft ook weer dat hoe lager de concentratie MRSA in de sneltesten, des te groter het verschil in Ct-waarden wordt. Rond de *cut-off* waarden van beide sneltesten zit er een berekend verschil tussen van minimaal 4,4 Ct's. Dit heeft echter geen effect op het aantal monster dat zou zijn gemist met de GeneXpert MRSA/SA Nasal Compleet sneltest.

De kans is aanwezig dat dit twee uitzonderlijke stammen zijn geweest waardoor er, wanneer er meer stammen zouden zijn getest, er mogelijk een ander resultaat uit zou zijn gekomen.

Verder heeft Cepheid®, de producent van de sneltesten aangegeven dit jaar nog met een verbeterde versie te komen van de GeneXpert MRSA sneltest. In deze test wordt getest op het SPA-gen, SCCmec-cassette en het *MecA* gen, maar ook op het *MecC*-gen. Dit gen kan ook de resistentie tegen Methicilline veroorzaken. Deze test zal dan uiteraard wel helemaal opnieuw gevalideerd moeten worden.

4.2.2. Verminderen van het aantal swabs

Uit de resultaten komt naar voren dat van de drie verschillende geteste media, het medium van Medical Wire het meest geschikt om te gebruiken als medium voor het vervangen van de droge wattenstokken. Dit omdat de bacterieconcentraties het meest representatief blijven aan de originele bacterieconcentraties die in het medium zijn gestopt. Wel laten de resultaten duidelijk zien dat er een groot verschil is of het monster na afname op kamertemperatuur of koelkasttemperatuur wordt bewaard. In figuur 36, waarin de kamertemperatuur in het rood en de koelkasttemperatuur in blauw is weergegeven, is duidelijk het verschil weergegeven van een *S. aureus* die is bewaard op zowel kamertemperatuur als koelkasttemperatuur. De *S. aureus* groeit op kamertemperatuur gewoon verder in het medium. Hiermee wordt het risico gelopen dat eventuele slecht groeiende bacteriën in het monster worden gemist.



Figuur 36: Sigma Transwab (Medical Wire). Resultaten van een *S. aureus* stam die is bewaard op kamertemperatuur en op koelkasttemperatuur. Hierin is de tijd na afname in uren op de x-as uitgezet tegen het aantal CFU op de y-as.

Om het medium verder in de diagnostiek te kunnen gaan invoeren moeten er nog wel een aantal testen worden uitgevoerd. Er moet onder andere gekeken worden naar de gevoeligheid van het medium ten opzichte van de droge wat die tot nu toe in de kliniek en op het lab wordt en of het medium effect heeft op de verschillende PCR's die op dit moment op het lab worden gebruikt. Verder moet er gekeken worden wat de beste manier is om het medium te gebruiken voor de kweek. Voor het inzetten van de kweek kan bijvoorbeeld de wat uit het medium zelf gebruikt worden, maar ook een gewone öze.

5. Literatuur

1. Sharon Peacock.

Staphylococcus aureus

Principles and Practice of Clinical Bacteriology; ISBN-13 978-0-470-84976-7, Copyright 2006, p73

2. R.H. Deurenberg, C. Vink, S. Sebastian, M.W.M. Wassenberg, E.E. Stobberingh.

Directe en snelle detectie van Methicilline resistente *Staphylococcus aureus*(MRSA)

Nederlands tijdschrift voor Medische Microbiologie, 15^e jaargang, September 2007, Num. 3.

<http://www.nvmm.nl/system/files/2007,%20nummer%203-15e%20jaargang,%20september%202007.pdf>

3. Patrick R. Murray, Ken S. Rosenthal et al.

Bacterie, 2008. In: *Medical Microbiologie 6E*. ISBN13: 9780323054706, pp 4.

4. Hogeschool Utrecht, Medische Microbiologie, Hoorcollege 2, 2012-2013

<https://cursussen.sharepoint.hu.nl/fnt/19/TLSC-MMB15V-09/>

5. José Eilers.

MRSA. Detectie in patiënten materiaal en typering van het SCCmec element

VU medisch centrum, November 2006 – Juni 2007

<http://www.hbo-kennisbank.nl/nl/page/hborecord.view/?uploadId=utrechthogeschool%3Aoi%3Arepository.samenmaken.nl%3Ampid%3A35597>

6. Vysakh P. R. and Jeya M.

A Comparative Analysis of Community Acquired and Hospital Acquired Methicillin Resistant *Staphylococcus Aureus*

Journal of Clinical and Diagnostic Research, Jul 2013; 7(7): 1339-1342

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3749631/>

7. Enno Stürenburg

Rapid detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* directly from clinical samples: methods, effectiveness and cost considerations

German Medical Science; 2009; 7; Doc06

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2716550/>

8. D. M. Wolk et al.

Rapid Detection of *Staphylococcus aureus* and Methicillin-Resistant *S. aureus* (MRSA) in Wound Specimens and Blood Cultures: Multicenter Preclinical Evaluation of the Cepheid Xpert MRSA/SA Skin and Soft Tissue and Blood Culture Assays

J. Clin. Microbiol. March 2009 vol. 47 no. 3 823-826

<http://jcm.asm.org/content/47/3/823.full>

9. Emily A. Morell, BA and Daniel M. Balkin, BA.

Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus*: A Pervasive Pathogen Highlights the Need for New Antimicrobial Development

The Yale Journal of Biology and Medicine, Dec 2010; 83(4) 223-233

10. A.G. Vonk en C.M.J.E. Vandenbroucke-Grauls.

Methicilline resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA) in de gemeenschap

Ned Tijdschr Geneesk. 2007 februari, in print verschenen in week 7, 2007

11. Hong Fang and Göran Hedin.

Rapid Screening and Identification of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* from Clinical Samples by Selective-Broth and Real-Time PCR Assay

J Clin Microbiol. 2006 February; 44(2): 675.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC165274/>

12. T.Blom.

Detectie van MRSA, het mecA gen en overige resistente stammen in diervoeder

Avans Hogeschool Breda Academie voor Technologie, Gezondheid en Milieu, 2008 juni.

13. A Huletsky, et al.

New Real-Time PCR Assay for Rapid Detection of Methicillin- Resistant *Staphylococcus aureus* Directly from Specimens Containing a Mixture of Staphylococci

Journal of Clinical Microbiology, May 2004, vol. 42, no.5, p1875-1884.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC404602/>

14. Anthony L. Marcotte and Marc A. Trzeciak.

Community-acquired Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: An Emerging Pathogen in Orthopaedics

Journal of American Academy of Orthopaedic Surgeons, February 2008, p98-106.

<http://www.jaaos.org/content/16/2/98/F2.expansion>

15. James V. Rago et al.

Detection and analysis of *Staphylococcus aureus* isolates found in ambulances in the Chicago metropolitan area

American Journal of Infection Control; Volume 40, Issue 3, April 2012, Pages 201–205

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0196655311011758>

16. Gavin K. Paterson, Ewan M. Harrison, and Mark A. Holmes.

The emergence of mecC methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

Trends in Microbiology, January 2014, Vol. 22, No. 1.

[http://www.cell.com/trends/microbiology/pdf/S0966-842X\(13\)00226-6.pdf](http://www.cell.com/trends/microbiology/pdf/S0966-842X(13)00226-6.pdf)

17. Fernando García-Garrote et al.

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying the *mecC* gene: emergence in Spain and report of a fatal case of bacteraemia

J. Antimicrob. Chemother. (2014) 69 (1): 45-50

<http://jac.oxfordjournals.org/content/69/1/45.long>

18. Cepheid®. In Vitro Diagnostic Medical Device.

GeneXpert Dx System Operator Manual. 301-0189, Rev. E May 2013

19. Copan Italia.

Brochure Eswab™. Geleverd met de swabs. Maart 2014.

http://www.copanitalia.com/K82B_LBM_Brochure_web.pdf

20. V. Saegeman et al.

Clinical evaluation of the Copan ESwab for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* detection and culture of wounds

European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases; August 2011, Volume 30, Issue 8, pp 943-949

<http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs10096-011-1178-1>

21. PURITAN MEDICAL PRODUCTS CO.

Brochure Puritan Diagnostics collection and transport systems. Geleverd met de swabs. Maart 2014.

<http://cdn.thomasnet.com/ccp/20052597/178004.pdf>

22. MWE Medical Wire.

Brochure Sigma Transwab, the new generation of preanalytics. Geleverd met de swabs. Maart 2014.

<http://www.frank-diagn.hu/muszerkepek/sigma---the-new-generation-of-transport-swabs.pdf>

23. Kenneth G. Van Horn,* Carol D. Audette, Denise Sebeck, and Kelly A. Tuckert†.

Comparison of the Copan ESwab System with Two Amies Agar Swab Transport Systems for Maintenance of Microorganism Viability

J Clin Microbiol. 2008 May; 46(5): 1655–1658.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2395074/>

24. Nabeel Rishmawi, et al.

Survival of Fastidious and Nonfastidious Aerobic Bacteria in Three Bacterial Transport Swab Systems

J Clin Microbiol. Apr 2007; 45(4): 1278–1283.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1865815/>

6. Bijlagen

6.1. Bijlage 1: Resultaten van de sensitiviteit van beide sneltesten

De tabellen in deze bijlagen horen bij de test die is uitgevoerd om te kijken naar de sensitiviteit van de twee verschillende MRSA sneltesten.

GeneXpert MRSA/SA Nasal Compleet sneltest

Tabel 5 en 6: De concentraties met de bijbehorende Ct-waarden uit de GeneXpert MRSA/SA Nasal Compleet sneltest van de twee verschillende MRSA stammen. Alle concentraties zijn weergegeven in CFU/ml.

Meting			Theoretische	Geteld op de 1.00E+04	Aantal CFU in cartridge in	Nasal	Nasal	Nasal	Nasal
Stam	McFarland	Verdunning	concentratie in de cartridge	verdunningsplaat	de bij behorende concentratie	SPC Ct	SCC	SPA	mecA
1	0.51	1.00E+01	1.50E+06	1352	1.35E+06	0	24.6	23.2	23.4
1	0.49	1.00E+02	1.50E+05	587	5.87E+04	0	27	25.5	25.9
1	0.51	1.00E+03	1.50E+04	1128	1.13E+04	37.7	32	31.2	31.2
1	0.45	1.00E+04	1.50E+03	1632	1.63E+03	34.3	35.7	33.9	33.9
1	0.49	1.00E+05	1.50E+02	1848	1.85E+02	32.9	40	39.8	39.7

Meting			Theoretische	Geteld op de 1.00E+04	Aantal CFU in cartridge in	Nasal	Nasal	Nasal	Nasal
Stam	McFarland	Verdunning	concentratie in de cartridge	verdunningsplaat	de bij behorende concentratie	SPC Ct	SCC	SPA	mecA
2	0.53	1.00E+01	1.50E+06	489	4.89E+05	0	22.6	21.2	21.3
2	0.51	1.00E+02	1.50E+05	1488	1.49E+05	0	27.2	25.8	26.1
2	0.53	1.00E+03	1.50E+04	489	4.89E+03	33.6	32.2	31.1	31.4
2	0.51	1.00E+04	1.50E+03	1488	1.49E+03	34.3	34.5	33.3	33.9
2	0.53	1.00E+05	1.50E+02	489	4.89E+01	31.8	40	39.6	39.4

GeneXpert MRSA sneltest

Tabel 7 en 8: De concentraties met de bijbehorende Ct-waarden uit de GeneXpert MRSA sneltest van de twee verschillende MRSA stammen. Alle concentraties zijn weergegeven in CFU/ml.

Meting Stam	McFarland	Verdunning	Theoretische concentratie in de cartridge	Geteld op de 1.00E+04 verdunningsplaat	Aantal CFU in cartridge in de bij behorende concentratie	MRSA SPC Ct	MRSA SCC
1	0.51	1.00E+01	1.50E+06	1352	1.35E+06	0.0	19.8
1	0.49	1.00E+02	1.50E+05	587	5.87E+04	0.0	23.9
1	0.51	1.00E+03	1.50E+04	1128	1.13E+04	30.7	27.6
1	0.45	1.00E+04	1.50E+03	1632	1.63E+03	31.9	32.0
1	0.49	1.00E+05	1.50E+02	1848	1.85E+02	30.9	36.0

Meting Stam	McFarland	Verdunning	Theoretische concentratie in de cartridge	Geteld op de 1.00E+04 verdunningsplaat	Aantal CFU in cartridge in de bij behorende concentratie	MRSA SPC Ct	MRSA SCC
2	0.5	1.00E+01	1.50E+06	1880	1.88E+06	0.0	19.2
2	0.52	1.00E+02	1.50E+05	1430	1.43E+05	0.0	22.8
2	0.53	1.00E+03	1.50E+04	1768	1.77E+03	31.9	29.5
2	0.52	1.00E+04	1.50E+03	1432	1.43E+03	31.1	30.1
2	0.5	1.00E+05	1.50E+02	188	1.88E+02	31.2	33.0

6.2. Bijlage 2: 16 Positieve GeneXpert MRSA sneltest monsters

In de tabel in deze bijlage zijn alle MRSA positieve monsters uit de periode 1 April 2013 t/m 30 November 2013.

Tabel 9: De 16 positieve MRSA monsters die met de MRSA sneltest zijn gedetecteerd. (1), (2), (3) en (4) vallen buiten de afkapwaarden van de GeneXpert MRSA/SA Nasal Compleet sneltest waardoor deze als negatief zou zijn afgegeven. Andere monsters van deze patiënten zouden wel positief zijn geweest met de MRSA/SA Nasal Compleet.

Patiënt is MRSA	Monsternummer	Afnamesite	Kweek uitslag	MRSA sneltest Uitslag	SCCmec Ct-waarden MRSA Sneltest	Berekende SCCmec Ct-waarden met de Nasal sneltest (+ 3.9)	Opmerking
Negatief	13-611803-01	Neus	Negatief	Positief	33.0	36.9	
	13-611802-01	Keel	Negatief	Negatief	0.0	0	
	13-611804-01	Perineum	Negatief	Negatief	0.0	0	
Negatief	13-603170-01	Neus	Negatief	Positief	33.1	37	
	13-603167-01	Keel	Niet ingezet	Negatief	0.0	0	
Positief	13-599859stam2	Onbekend	Positief	Positief	25.7	29.6	Is van een stam gedaan
Negatief	13-572287-01	Neus	Negatief	Negatief	0.0	0	
	13-572286-01	Keel	Negatief	Negatief	0.0	0	
	13-572285-01	Perineum	Negatief	Positief	36.0	39.9(1)	Gemist met de Nasal
Positief	13-563194-01	Neus	Positief	Positief	19.8	23.7	
	13-563193-01	Keel	Positief	Positief	35.8	39.7(2)	Gemist met de Nasal
	13-563195-01	Perineum	Positief	Positief	32.3	36.2	
Onbekend	13-551481-01	Neus	Niet ingezet	Positief	29.5	33.4	Geen kweek van gedaan
	13-551482-01	Keel	Niet ingezet	Positief	31.2	35.1	Geen kweek van gedaan
	13-551479-01	Perineum	Niet ingezet	Negatief	36.4	40.3	Geen kweek van gedaan
Negatief	13-543845-01	Neus	Negatief	Positief	32.6	36.5	
	13-543846-01	Keel	Negatief	Positief	27.9	31.8	
	13-543846-02	Perineum	Negatief	Negatief	40.0	43.9	
Negatief	13-541498-01	Neus	Negatief	Positief	35.0	38.9(3)	Gemist met de Nasal
	13-541497-01	Keel	Negatief	Negatief	0.0	0	
	13-541499-01	Perineum	Negatief	Error	Error	/	Error in de MRSA sneltest
Positief	13-533132-01	Neus	Positief	Positief	23.2	27.1	
	13-533131-01	Keel	Positief	Positief	25.9	29.8	
	13-533133-01	Perineum	Negatief	Positief	34.9	38.8(4)	Gemist met de Nasal
	13-533134-01	Diversen	Niet ingezet	Positief	26.9	30.8	

6.3. Bijlage 3: Resultaten van de monoculturen

In deze bijlage de geteste bacteriestammen in als monocultuur in de drie verschillende media.

Tabel 10: Aantal getelde Staphylococcus aureus kolonies op de plaat bij de tijdstippen 0, 6, 24 en 48 uur. De telling bij 10µl is vermenigvuldigd en gemiddeld met de telling van 100µl. De in het rood weergegeven getallen is een schatting omdat deze platen helemaal dicht gegroeid waren.

Kamertemperatuur		Tijd na	Telling Copan				Telling ITK				Telling Medical Wire			
Bacteriesoort	McFarland	afname (u)	100µl	10µl	10 x 10µl	Gemiddelde	100µl	10µl	10 x 10µl	Gemiddelde	100µl	10µl	10 x 10µl	Gemiddelde
S. aureus	0.46	0	165	13	130	147.5	192	21	210	201	41	5	50	45.5
		6	222	25	250	236	267	99	990	628.5	55	5	50	52.5
		24	10000	10000	10000	10000	10000	1000	10000	10000	1184	121	1210	1197
		48	10000	10000	10000	10000	10000	1000	10000	10000	10000	1000	10000	10000
Koelkast		Tijd na	Telling Eswab				Telling ITK				Telling Medical Wire			
Bacteriesoort	McFarland	afname (u)	100µl	10µl	10 x 10µl	Gemiddelde	100µl	10µl	10 x 10µl	Gemiddelde	100µl	10µl	10 x 10µl	Gemiddelde
S. aureus	0.46	0	139	17	170	154.5	163	20	200	181.5	29	2	20	24.5
		6	146	15	150	148	186	16	160	173	33	4	40	36.5
		24	224	20	200	212	175	17	170	172.5	43	4	40	41.5
		48	209	25	250	229.5	168	19	190	179	51	2	20	35.5

Tabel 11: Aantal getelde Staphylococcus epidermidis kolonies op de plaat bij de tijdstippen 0, 6, 24 en 48 uur. De telling bij 10µl is vermenigvuldigd en gemiddeld met de telling van 100µl. De in het rood weergegeven getallen is een schatting omdat deze platen helemaal dicht gegroeid waren.

Kamertemperatuur		Tijd na	Telling Copan				Telling ITK				Telling Medical Wire			
Bacteriesoort	McFarland	afname (u)	100µl	10µl	10 x 10µl	Gemiddelde	100µl	10µl	10 x 10µl	Gemiddelde	100µl	10µl	10 x 10µl	Gemiddelde
S. epidermidis	0.55	0	96	12	120	108	106	11	110	108	38	4	40	39
		6	114	10	100	107	141	13	130	135.5	34	5	50	42
		24	2016	317	3170	2593	188	19	190	189	29	2	20	24.5
		48	10000	10000	10000	10000	364	32	320	342	21	1	10	15.5
Koelkast		Tijd na	Telling Eswab				Telling ITK				Telling Medical Wire			
Bacteriesoort	McFarland	afname (u)	100µl	10µl	10 x 10µl	Gemiddelde	100µl	10µl	10 x 10µl	Gemiddelde	100µl	10µl	10 x 10µl	Gemiddelde
S. epidermidis	0.55	0	113	10	100	106.5	142	18	180	161	26	8	80	53
		6	125	12	120	122.5	146	15	150	148	26	5	50	38
		24	125	9	90	107.5	103	9	90	96.5	20	3	30	25
		48	126	13	130	128	43	5	50	46.5	16	1	10	13

Tabel 12: Aantal getelde Enterococcus faecium kolonies op de plaat bij de tijdstippen 0, 6, 24 en 48 uur. De telling bij 10µl is vermenigvuldigd en gemiddeld met de telling van 100µl. De in het rood weergegeven getallen is een schatting omdat deze platen helemaal dicht gegroeid waren.

Kamertemperatuur Bacteriesoort	McFarland	Tijd na afname (u)	Telling Copan				Telling ITK				Telling Medical Wire			
			100µl	10µl	10 x 10µl	Gemiddelde	100µl	10µl	10 x 10µl	Gemiddelde	100µl	10µl	10 x 10µl	Gemiddelde
E. faecium	0.48	0	141	12	120	130.5	165	14	140	152.5	44	4	40	42
		6	968	119	1190	1079	1936	179	1790	1863	69	6	60	64.5
		24	10000	1000	10000	10000	10000	1000	10000	10000	1528	158	1580	1554
		48	10000	1000	10000	10000	10000	1000	10000	10000	10000	1000	10000	10000
Koelkast Bacteriesoort	McFarland	Tijd na afname (u)	Telling Eswab				Telling ITK				Telling Medical Wire			
			100µl	10µl	10 x 10µl	Gemiddelde	100µl	10µl	10 x 10µl	Gemiddelde	100µl	10µl	10 x 10µl	Gemiddelde
E. faecium	0.48	0	130	14	140	135	151	15	150	150.5	49	4	40	44.5
		6	147	12	120	133.5	147	15	150	148.5	32	4	40	36
		24	155	15	150	152.5	146	17	170	158	51	2	20	35.5
		48	123	11	110	116.5	146	15	150	148	29	4	40	34.5

Tabel 13: Aantal getelde Streptococcus pneumoniae kolonies op de plaat bij de tijdstippen 0, 6, 24 en 48 uur. De telling bij 10µl is vermenigvuldigd en gemiddeld met de telling van 100µl. De in het rood weergegeven getallen zijn berekent vanaf een 100x verdunning.

Kamertemperatuur Bacteriesoort	McFarland	Tijd na afname (u)	Telling Copan				Telling ITK				Telling Medical Wire			
			100µl	10µl	10 x 10µl	Gemiddelde	100µl	10µl	10 x 10µl	Gemiddelde	100µl	10µl	10 x 10µl	Gemiddelde
S. pneumoniae	0.5	0	45	4	40	42.5	83	8	80	81.5	13	0	0	6.5
		6	2	2	20	11	80	6	60	70	7	3	30	18.5
		24	11	4	40	25.5	11100	1168	11680	11390	28	5	50	39
		48	1052	124	1240	1146	55700	5570	55700	55700	790	79	790	790
Koelkast Bacteriesoort	McFarland	Tijd na afname (u)	Telling Eswab				Telling ITK				Telling Medical Wire			
			100µl	10µl	10 x 10µl	Gemiddelde	100µl	10µl	10 x 10µl	Gemiddelde	100µl	10µl	10 x 10µl	Gemiddelde
S. pneumoniae	0.5	0	32	4	40	36	78	11	110	94	14	2	20	17
		6	2	0	0	1	49	4	40	44.5	21	2	20	20.5
		24	0	0	0	0	3	0	0	1.5	1	1	10	5.5
		48	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	10	5.5

Tabel 14: Aantal getelde MRSA kolonies op de plaat bij de tijdstippen 0, 6, 24 en 48 uur. De telling bij 10µl is vermenigvuldigd en gemiddeld met de telling van 100µl. De in het rood weergegeven getallen zijn berekend vanaf een 1000x verdunning.

Kamertemperatuur Bacteriesoort	McFarland	Tijd na afname (u)	Telling Copan				Telling ITK				Telling Medical Wire			
			100µl	10µl	10 x 10µl	Gemiddelde	100µl	10µl	10 x 10µl	Gemiddelde	100µl	10µl	10 x 10µl	Gemiddelde
MRSA	0.55	0	268	22	220	244	292	28	280	286	91	11	110	100.5
		6	336	26	260	298	368	43	430	399	105	6	60	82.5
		24	1688000	168800	1688000	1688000	936000	93600	936000	936000	17600	1760	17600	17600
		48	5080000	508000	5080000	5080000	9520000	952000	9520000	9520000	20000	2000	20000	20000
Koelkast Bacteriesoort	McFarland	Tijd na afname (u)	Telling Eswab				Telling ITK				Telling Medical Wire			
			100µl	10µl	10 x 10µl	Gemiddelde	100µl	10µl	10 x 10µl	Gemiddelde	100µl	10µl	10 x 10µl	Gemiddelde
MRSA	0.55	0	222	21	210	216	285	31	310	297.5	83	6	60	71.5
		6	219	23	230	224.5	312	29	290	301	74	8	80	77
		24	224	27	270	247	254	36	360	307	76	9	90	83
		48	250	24	240	245	244	20	200	222	83	11	110	96.5

Tabel 15: Aantal getelde Bacteroides fragilis kolonies op de plaat bij de tijdstippen 0, 6, 24 en 48 uur. De telling bij 10µl is vermenigvuldigd en gemiddeld met de telling van 100µl.

Kamertemperatuur Bacteriesoort	McFarland	Tijd na afname (u)	Telling Copan				Telling ITK				Telling Medical Wire			
			100µl	10µl	10 x 10µl	Gemiddelde	100µl	10µl	10 x 10µl	Gemiddelde	100µl	10µl	10 x 10µl	Gemiddelde
B. fragilis	0.45	0	236	29	290	263	328	33	330	329	92	13	130	111
		6	284	28	280	282	326	36	360	343	98	11	110	104
		24	292	29	290	291	264	26	260	262	111	8	80	95.5
		48	284	32	320	302	248	27	270	259	88	10	100	94
Koelkast Bacteriesoort	McFarland	Tijd na afname (u)	Telling Eswab				Telling ITK				Telling Medical Wire			
			100µl	10µl	10 x 10µl	Gemiddelde	100µl	10µl	10 x 10µl	Gemiddelde	100µl	10µl	10 x 10µl	Gemiddelde
B. fragilis	0.45	0	259	30	300	279.5	364	38	380	372	125	16	160	142.5
		6	276	19	190	233	356	37	370	363	140	17	170	155
		24	144	16	160	152	124	13	130	127	136	14	140	138
		48	98	6	60	79	62	4	40	51	106	15	150	128

6.4. Bijlage 4: Resultaten van de mengculturen

In deze bijlage de geteste bacteriestammen in als monocultuur in de drie verschillende media.

Tabel 16: Aantal getelde MRSA kolonies op de plaat bij de tijdstippen 0, 6, 24 en 48 uur. De telling bij 10µl is vermenigvuldigd en gemiddeld met de telling van 100µl. De in het rood weergegeven getallen zijn berekend vanaf een 1000x verdunning.

Kamertemperatuur	Bacteriesoort	McFarland	Tijd na afname (u)	Telling Copan				Telling ITK				Telling Medical Wire			
				100µl	10µl	10 x 10µl	Gemiddelde	100µl	10µl	10 x 10µl	Gemiddelde	100µl	10µl	10 x 10µl	Gemiddelde
MRSA	0.5		0	5	1	10	7.5	6	0	0	3	3	0	0	1.5
			6	13	2	20	16.5	9	1	10	9.5	5	0	0	2.5
			24	57000	5700	57000	57000	86000	8600	86000	86000	5	1	10	7.5
			48	160000	16000	160000	160000	300000	30000	300000	300000	81	13	130	105.5
Koelkast	Bacteriesoort	McFarland	Tijd na afname (u)	Telling Copan				Telling ITK				Telling Medical Wire			
				100µl	10µl	10 x 10µl	Gemiddelde	100µl	10µl	10 x 10µl	Gemiddelde	100µl	10µl	10 x 10µl	Gemiddelde
MRSA	0.5		0	4	2	20	12	4	1	10	7	3	0	0	1.5
			6	4	3	30	17	2	1	10	6	4	0	0	2
			24	11	2	20	15.5	4	1	10	7	3	1	10	6.5
			48	12	3	30	21	3	2	20	11.5	22	3	30	26

Tabel 17: Aantal getelde Enterococcus faecium kolonies op de plaat bij de tijdstippen 0, 6, 24 en 48 uur. De telling bij 10µl is vermenigvuldigd en gemiddeld met de telling van 100µl. De in het rood weergegeven getallen zijn berekend vanaf een 1000x verdunning.

Kamertemperatuur	Bacteriesoort	McFarland	Tijd na afname (u)	Telling Copan				Telling ITK				Telling Medical Wire			
				100µl	10µl	10 x 10µl	Gemiddelde	100µl	10µl	10 x 10µl	Gemiddelde	100µl	10µl	10 x 10µl	Gemiddelde
E. faecium	0.46		0	23	3	30	26.5	38	4	40	39	7	2	20	13.5
			6	216	43	430	323	416	35	350	383	6	1	10	8
			24	1784000	178400	1784000	1784000	2184000	218400	2184000	2184000	262	39	390	326
			48	15280000	1528000	15280000	15280000	11280000	1128000	11280000	11280000	50000	5000	50000	50000
Koelkast	Bacteriesoort	McFarland	Tijd na afname (u)	Telling Copan				Telling ITK				Telling Medical Wire			
				100µl	10µl	10 x 10µl	Gemiddelde	100µl	10µl	10 x 10µl	Gemiddelde	100µl	10µl	10 x 10µl	Gemiddelde
E. faecium	0.46		0	24	2	20	22	26	1	10	18	6	1	10	8
			6	21	3	30	25.5	28	2	20	24	6	1	10	8
			24	28	3	30	29	41	3	30	35.5	12	1	10	11
			48	27	3	30	28.5	36	5	50	43	26	2	20	23

Tabel 18: Aantal getelde Staphylococcus epidermidis kolonies op de plaat bij de tijdstippen 0, 6, 24 en 48 uur. De telling bij 10µl is vermenigvuldigd en gemiddeld met de telling van 100µl. De in het rood weergegeven getallen zijn berekend vanaf een 1000x verdunning.

Kamertemperatuur Bacteriesoort	McFarland	Tijd na afname (u)	Telling Copan				Telling ITK				Telling Medical Wire			
			100µl	10µl	10 x 10µl	Gemiddelde	100µl	10µl	10 x 10µl	Gemiddelde	100µl	10µl	10 x 10µl	Gemiddelde
S. epidermidis	0.51	0	18	1	10	14	20	4	40	30	7	0	0	3.5
		6	30	5	50	40	29	2	20	24.5	7	0	0	3.5
		24	13000	1300	13000	13000	26000	2600	26000	26000	4	1	10	7
		48	140000	14000	140000	140000	110000	11000	110000	110000	8	1	10	9
Koelkast Bacteriesoort	McFarland	Tijd na afname (u)	Telling Copan				Telling ITK				Telling Medical Wire			
			100µl	10µl	10 x 10µl	Gemiddelde	100µl	10µl	10 x 10µl	Gemiddelde	100µl	10µl	10 x 10µl	Gemiddelde
S. epidermidis	0.51	0	22	1	10	16	28	2	20	24	3	1	10	6.5
		6	14	2	20	17	25	3	30	27.5	4	1	10	7
		24	26	4	40	33	9	2	20	14.5	4	2	20	12
		48	32	5	50	41	4	1	10	7	24	2	20	22

Tabel 19: Aantal getelde Streptococcus pneumoniae kolonies op de plaat bij de tijdstippen 0, 6, 24 en 48 uur. De telling bij 10µl is vermenigvuldigd en gemiddeld met de telling van 100µl. De in het rood weergegeven getallen zijn berekend vanaf een 1000x verdunning.

Kamertemperatuur Bacteriesoort	McFarland	Tijd na afname (u)	Telling Copan				Telling ITK				Telling Medical Wire			
			100µl	10µl	10 x 10µl	Gemiddelde	100µl	10µl	10 x 10µl	Gemiddelde	100µl	10µl	10 x 10µl	Gemiddelde
S. pneumoniae	0.45	0	13	0	0	6.5	17	4	40	28.5	6	1	10	8
		6	12	1	10	11	19	4	40	29.5	4	1	10	7
		24	7000	700	7000	7000	3000	300	3000	3000	13	4	40	26.5
		48	20000	2000	20000	20000	20000	2000	20000	20000	353	39	390	371.5
Koelkast Bacteriesoort	McFarland	Tijd na afname (u)	Telling Copan				Telling ITK				Telling Medical Wire			
			100µl	10µl	10 x 10µl	Gemiddelde	100µl	10µl	10 x 10µl	Gemiddelde	100µl	10µl	10 x 10µl	Gemiddelde
S. pneumoniae	0.45	0	4	0	0	2	21	2	20	20.5	6	0	0	3
		6	2	0	0	1	5	0	0	2.5	3	0	0	1.5
		24	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1
		48	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1

