

# Screening for bærertilstand af Vancomycin Resistente Enterokokker (VRE)

## **Anbefalinger**

Screening for Vancomycin Resistente Enterokokker (VRE) udføres på rektalpodning eller fæcesprøve. Hvis patienten har stomi, tages podning derfra.

For at opnå den højeste sensitivitet ved dyrkningsbaseret screening anbefales opformering i en selektiv VRE opformeringsbouillon natten over efterfulgt af udsåning på selektiv kromogen plade eller anden selektiv vancomycin-holdig plade. Fund af VRE bekræftes med resistensbestemmelse for vancomycin og evt. teicoplanin og PCR for glycopeptidresistensgener (*van*).

Direkte undersøgelse for *vanA* og *vanB* gen ved genotypiske metoder på prøvemateriale (evt. efter opformering) kan bruges til hurtig diagnostik. Påvisning af *vanA* genet har en meget højere positiv prædiktiv værdi end påvisning af *vanB* genet, hvorfor det anbefales at tilstedeværelse af *vanB* VRE altid konfirmeres ved dyrkning.

Vancomycin variable enterokokker (VVE) bærer *vanA* gen komplekset, men er fænotypisk vancomycin følsomme. VVE incidensen er stigende i Danmark, og bærertilstand med VVE kan kun detekteres med molekylærbiologiske metoder.

## **Baggrund**

*Enterococcus faecium* og *Enterococcus faecalis* er årsag til de fleste kliniske enterokok infektioner. Erhvervet resistens mod vancomycin og andre glycopeptidantibiotika ses i stigende grad i *E. faecium* og *E. faecalis*. Vancomycin resistensgener (*van*) medfører ændringer i cellevægsforstadier som nedsætter bindingsevnen for glykopeptider. Der findes flere vancomycin resistensgener, men *vanA* og *vanB* er de hyppigst forekommende og begge er overførbare. *E. gallinarum* og *E. casseliflavus* derimod, er naturligt vancomycin resistente, og bærer det kromosomale *vanC* gen, men udgør sjældent et infektionshygiejnemæssigt problem.

VanA VRE er vancomycin resistente (MIC >64 mg/L) og teicoplanin resistente (MIC >16 mg/L), mens *vanB* VRE er vancomycin resistente (variabel MIC, 4 - 32 mg/L), men teicoplanin følsomme (MIC ≤ 2 mg/L)(1). *vanB* VRE med vancomycin MIC som er lavere end de kliniske brydepunkter (såkaldte low-MIC VRE) forekommer (2).

Enterokokker er en del af tarmfloraen, og rektalpodning eller fæcesprøve anbefales derfor som screening for VRE bærertilstand. VRE bærertilstand er ofte langvarig, dvs. flere måneder (3). Der findes ingen behandling for VRE bærertilstand.

Ved hospitalsudbrud er det vist, at fund af VRE i kliniske isolater kun identificerer en lille del af de VRE positive patienter. Ved screening findes mindst 10 gange flere VRE positive patienter (4;5).

Mens *vanA* gen komplekset kun er beskrevet i enterokokker, kan *vanB* også bæres af anaerobe bakterier (6;7). Derfor er den positive prædiktive værdi af *vanB* påvist direkte på fækalit prøvemateriale meget lav (8).

Enterokokker som bærer et ikke-funktionalt *vanA* gen kompleks er fænotypisk vancomycin følsomme. Disse såkaldte vancomycin variable enterokokker (VVE) er de seneste år beskrevet i flere forskellige lande, bl.a. Danmark (9;10) og mange forskellige tilgrundliggende molekylære

mekanismer er beskrevet. Detektionen af VVE er klinisk relevant, da reversion til en vancomycin resistent fænotype er beskrevet både *in vitro* og *in vivo* efter eksposition for vancomycin (10-13). Bæretilstand med VVE kan kun diagnosticeres med molekylærbiologiske metoder, dvs. PCR for *vanA* genet direkte på prøvemateriale eller efter uselektiv opformering. Fremdyrkning af VVE er laboratoriemæssigt arbejdskrævende og bygger på uselektiv dyrkning og molekylærbiologisk undersøgelse af vancomycin følsomme enterokokker for *vanA*.

### **Prøvetagning og transport**

Der tages rektal podning (kulpodepind i Stuarts transportmedium eller flocced swab i tilhørende, fx Amies, transport medium). Ved stomi podes fra stomi. Alternativt kan podedepind dyppes i fæcesprøve.

### **Dyrkningsbaseret screening**

Opformering natten over (18 timer) i vækstmedie suppleret med vancomycin øger sensitiviteten af undersøgelsen (14). Der anbefales vancomycin koncentration på 4 mg/L for at sikre vækst af *vanB* positive stammer med lavt vancomycin MIC. Samtidig tilsætning af aztreonam (fx 60 mg/L) hæmmer vækst af gram negative stave.

Flere studier af kromogene plader viser høj specificitet og sensitivitet (14-16), men *vanB* positive stammer med lav vancomycin MIC kan blive hæmmet (17). Som alternativ til kromogen plade kan anden vancomycin-holdig agarplade anvendes eller agarplade med vancomycin disk.

Vækst af VRE-lignende kolonier på kromogen eller anden selektiv plade konfirmeres med speciesidentifikation, og resistensbestemmelse for vancomycin og eventuelt også teicoplanin. Påvisning af resistensgener med PCR kan udføres lokalt eller på referencelaboratorium.

### **Selektiv dyrkning for VRE**

#### 1. Opformering i opformeringsbouillon:

Der kan fx bruges BHI med Vancomycin 4 mg/l og 60 mg/l Aztreonam. Har laboratoriet ikke et specifikt opformeringsmedie på lager kan fx en oksebouillon eller serumbouillon hvor man tilsætter vancomycin i form af disk til den ønskede koncentration anvendes.

Ved brug af kulpodepinde overføres denne i opformeringsbouillon og bliver medinkuberet. Flocced swab rystes nogle gange i opformeringsbouillon og sættes tilbage i transportmediet, alternativt tages 100µl af det flydende transportmedie. Inkuberes ved 35° C atm natten over (18 timer).

#### 2. Udsåning fra opformeringsbouillon:

Udsåning på kromogen VRE plade eller anden vancomycin-holdig selektiv plade.

Efter grundig omrystning tages 100µl af opformeringsbouillon og sættes på den selektive agar og spredes med en steril podenål. Inkuberes ved 35° C atm og aflæses efter 1. og 2. døgn.

#### 3. Aflæsning:

Ved vækst af VRE-lignende kolonier udføres species identifikation (fx med MALDI-TOF). Ved førstegangsfund af VRE bekræftes resultatet med resistensbestemmelse for vancomycin og eventuelt teicoplanin og resistensgen påvises med specifik PCR.

### **Dyrkning mhp. VVE**

Hvis man ønsker at undersøge *vanA*-positive prøver, hvor der ved selektiv dyrkning ikke er fundet VRE, for VVE kan efterfølgende metode bruges:

Erfaringer har vist, at opformering i medier som fremmer vækst af enterokokker gør det nemmere at isolere forskellige enterokok-isolater efterfølgende. Der kan fx bruges TSB opformeringsbouillon indeholdende 2,5 % NaCl, 3,5 mg/L ceftioxin og 20 mg/L aztreonam (se [DANRES-M metodedokument "Screening for MRSA bærertilstand"](#)). Alternativt kan der fx bruges Enterococcosel Broth™ (Becton Dickinson) tilsat ampicillin 4 mg/L.

For tilsætning af prøvemateriale til opformeringsmediet og udsåning fra opformeringsmediet på plade (der bruges fx 5% blodplade, evt. med ampicillin disk) bruges samme mængder og metoder som ovenfor beskrevet for selektiv dyrkning for VRE.

Fra den uselektive plade laves efter overnat inkubation isoleringer fra mindst 3 forskellige enterokok-lignende enkeltkolonier (hvis der er forskellige kolonimorfologier, vælges mindst én af hver). På renkultur af disse isoleringer laves PCR for *vanA*. Hvis *vanA* genet detekteres, udføres fra pågældende isolat resistensbestemmelse for vancomycin og evt. teicoplanin. Hvis det ikke lykkes at detektere VRE, kan man køre PCR for *vanA* på et skrab fra den uselektive udsåning for at vurdere, om der skal laves flere forsøg med enkeltkolonier.

### **Genotypiske metoder**

Genotypiske metoder bygger på direkte påvisning af resistensgenerne *vanA* og *vanB*. Der findes flere kommercielle assays eller in-house metoder. For forskellige assays og i forskellige settings er der beskrevet sensitivitet på 60-95% (18-21). Opformering natten over inden molekylærbiologisk analyse kan bruges til at øge sensitiviteten (8;22).

## Referencer

- (1) Werner G, Coque TM, Hammerum AM, Hope R, Hryniewicz W, Johnson A, et al. Emergence and spread of vancomycin resistance among enterococci in Europe. *Euro Surveill* 2008 Nov 20;13(47).
- (2) Grabsch EA, Chua K, Xie S, Byrne J, Ballard SA, Ward PB, et al. Improved detection of vanB2-containing enterococcus faecium with vancomycin susceptibility by Etest using oxgall supplementation. *J Clin Microbiol* 2008 Jun;46(6):1961-4.
- (3) Byers KE, Anglim AM, Anneski CJ, Farr BM. Duration of colonization with vancomycin-resistant Enterococcus. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2002 Apr;23(4):207-11.
- (4) Calfee DP. Methicillin-resistant Staphylococcus aureus and vancomycin-resistant enterococci, and other Gram-positives in healthcare. *Curr Opin Infect Dis* 2012 Aug;25(4):385-94.
- (5) Mascini EM, Bonten MJ. Vancomycin-resistant enterococci: consequences for therapy and infection control. *Clin Microbiol Infect* 2005 Jul;11 Suppl 4:43-56.
- (6) Ballard SA, Pertile KK, Lim M, Johnson PD, Grayson ML. Molecular characterization of vanB elements in naturally occurring gut anaerobes. *Antimicrob Agents Chemother* 2005 May;49(5):1688-94.
- (7) Graham M, Ballard SA, Grabsch EA, Johnson PD, Grayson ML. High rates of fecal carriage of nonenterococcal vanB in both children and adults. *Antimicrob Agents Chemother* 2008 Mar;52(3):1195-7.
- (8) Werner G, Serr A, Schutt S, Schneider C, Klare I, Witte W, et al. Comparison of direct cultivation on a selective solid medium, polymerase chain reaction from an enrichment broth, and the BD GeneOhm VanR Assay for identification of vancomycin-resistant enterococci in screening specimens. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2011 Aug;70(4):512-21.
- (9) The Danish Integrated Antimicrobial Resistance Monitoring and Research Programme (DANMAP). DANMAP 2017 - Use of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from food animals, food and humans in Denmark. <https://www.danmap.org/-/media/arkiv/projekt-sites/danmap/danmap-reports/danmap-2017/danmap2017.pdf?la=en>. Tilgået 09-01-2019.
- (10) Hansen TA, Pedersen M, Nielsen LG, Ma C, Søres L, Worning P, et al. Emergence of a vancomycin-variable Enterococcus faecium ST1421 strain containing a deletion in vanX. *J Antimicrob Chemother* 2018 Nov;73(11):2936-2940.
- (11) Sivertsen A, Pedersen T, Larssen KW, Bergh K, Ronning TG, Radtke A, et al. A Silenced vanA Gene Cluster on a Transferable Plasmid Caused an Outbreak of Vancomycin-Variable Enterococci. *Antimicrob Agents Chemother* 2016 Jul;60(7):4119-27.
- (12) Szakacs TA, Kalan L, McConnell MJ, Eshaghi A, Shahinas D, McGeer A, et al. Outbreak of vancomycin-susceptible Enterococcus faecium containing the wild-type vanA gene. *J Clin Microbiol* 2014 May;52(5):1682-6.

- (13) Thaker MN, Kalan L, Waglechner N, Eshaghi A, Patel SN, Poutanen S, et al. Vancomycin-variable enterococci can give rise to constitutive resistance during antibiotic therapy. *Antimicrob Agents Chemother* 2015 Mar;59(3):1405-10.
- (14) Kuch A, Stefaniuk E, Ozorowski T, Hryniewicz W. New selective and differential chromogenic agar medium, chromID VRE, for screening vancomycin-resistant Enterococcus species. *J Microbiol Methods* 2009 Apr;77(1):124-6.
- (15) Peltroche-Llacsahuanga H, Top J, Weber-Heynemann J, Lutticken R, Haase G. Comparison of two chromogenic media for selective isolation of vancomycin-resistant enterococci from stool specimens. *J Clin Microbiol* 2009 Dec;47(12):4113-6.
- (16) Delmas J, Robin F, Schweitzer C, Lesens O, Bonnet R. Evaluation of a new chromogenic medium, ChromID VRE, for detection of vancomycin-resistant Enterococci in stool samples and rectal swabs. *J Clin Microbiol* 2007 Aug;45(8):2731-3.
- (17) Adler H, Oezcan S, Frei R. Vancomycin-resistant Enterococci of vanB genotype may pose problems for screening with highly selective media. *J Clin Microbiol* 2010 Jun;48(6):2323.
- (18) Mak A, Miller MA, Chong G, Monczak Y. Comparison of PCR and culture for screening of vancomycin-resistant Enterococci: highly disparate results for vanA and vanB. *J Clin Microbiol* 2009 Dec;47(12):4136-7.
- (19) Marner ES, Wolk DM, Carr J, Hewitt C, Dominguez LL, Kovacs T, et al. Diagnostic accuracy of the Cepheid GeneXpert vanA/vanB assay ver. 1.0 to detect the vanA and vanB vancomycin resistance genes in Enterococcus from perianal specimens. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2011 Apr;69(4):382-9.
- (20) Zabicka D, Strzelecki J, Wozniak A, Strzelecki P, Sadowy E, Kuch A, et al. Efficiency of the Cepheid Xpert vanA/vanB assay for screening of colonization with vancomycin-resistant enterococci during hospital outbreak. *Antonie Van Leeuwenhoek* 2012 Mar;101(3):671-5.
- (21) Holzknrecht BJ, Hansen DS, Nielsen L, Kailow A, Jarlov JO. Screening for vancomycin-resistant enterococci with Xpert(R) vanA/vanB: diagnostic accuracy and impact on infection control decision making. *New Microbes New Infect* 2017 Mar;16:54-9.
- (22) Fang H, Nord CE, Ullberg M. Screening for vancomycin-resistant enterococci: results of a survey in Stockholm. *APMIS* 2010 May;118(5):413-7.

**Forfattere af 1. version:**

Barbara Holzknrecht, KMA Herlev, barbara.juliane.holzknrecht@regionh.dk  
Pia Littauer, KMA Hvidovre, Pia.Jeanette.Littauer@regionh.dk  
Dennis Schrøder Hansen, KMA Herlev, dennis.schroeder.hansen.01@regionh.dk

Version 3, januar 2019