

Kan het uitspuiten van een oor leiden tot otitis externa met *Pseudomonas aeruginosa*?

Genotypering van *Pseudomonas aeruginosa* stammen, uit medisch instrumentarium en otitis externa isolaten, met behulp van Diversilab®



Daniëlle Wijshake
Isala klinieken Zwolle
Juni 2011

Is it possible that cross contamination of *Pseudomonas aeruginosa* from the ear syringe to the patient is the cause of otitis externa?

Genotyping *Pseudomonas aeruginosa* strains from medical instruments and isolates of otitis externals, with the Diversilab® system.

Kan het uitspuiten van een oor leiden tot otitis externa met *Pseudomonas aeruginosa*?

Genotypering van *Pseudomonas aeruginosa* stammen, uit medisch instrumentarium en otitis externa isolaten, met behulp van Diversilab

Begeleiding

Mw. M.J. Bruins, researchmedewerker
Dr. G.J.H.M. Ruijs, arts-microbioloog
Drs. S. de Vries-van Rossum, ziekenhuishygiënist
Mw. A.M. Willems, bacteriologisch analist
Mw. I. Kamphuis, moleculair analist
Dr. R.G.J. Klein Overmeen, huisarts

Isala klinieken
Laboratorium voor Medische
Microbiologie en Infectieziekten
Stilobadstraat 3
8021 AM Zwolle

Hogeschool Utrecht
Faculteit Natuur en Techniek
Afdeling Life sciences and Chemistry
Medische Microbiologie
F.C. Dondersstraat 65
3572 JE Utrecht



Afstudeerjaar: 2011

Daniëlle Wijshake

Handtekening eindverantwoordelijke:

Dr. G.J.H.M. Ruijs, arts-microbioloog

Foto omslag: Vernauwing van de externe gehoorgang bij een otitis externa
Bron foto: <http://disseminamus.files.wordpress.com/2008/10/mayo-clinic.jpg>

Samenvatting

Het oor is opgebouwd uit het buitenoor, het middenoor en het binnenoor. Het buitenoor wordt onderverdeeld in de oorschelp en de uitwendige (externe) gehoorgang.

Wanneer de bescherming van het cerumen en de bescherming van de intacte huid wegvallen in de externe gehoorgang, door bijvoorbeeld een beschadiging van de huid of een verstoring van de zuurgraad, is er een verhoogde kans op het krijgen van een infectie. Een infectie van de externe gehoorgang noemt men een otitis externa.

Otitis externa is onder te verdelen in een acute, een chronische of een maligne infectie.

In de huisartspraktijken in Nederland wordt bij ongeveer 14 op de 1000 patiënten per jaar een acute otitis externa beschreven. Een otitis externa wordt in de meeste gevallen veroorzaakt door *Pseudomonas aeruginosa*. *Pseudomonas aeruginosa* komt voor in oppervlaktewater, het riool en in de grond. Deze bacterie kan goed in een vochtige omgeving overleven en zich vermenigvuldigen, zo ook in het laagje water dat vaak achterblijft in een oorspuut. De oorzaak van een otitis externa is vaak het contact met verontreinigd water. Andere oorzaken zijn bijvoorbeeld het gebruik van cosmetische producten of het hebben van een huidaandoening zoals eczeem.

Wanneer een patiënt oorklachten heeft zal de huisarts in de meeste gevallen met behulp van een otoscoop het oor onderzoeken en indien nodig het oor reinigen met een oorspuut.

Begin januari 2010 constateerde huisarts Dr. R.G.J. Klein Overmeen het ontstaan van otitis externa enkele weken na cerumenlavage bij zijn patiënten. Hij heeft hierop afstrijken afgenomen van het instrumentarium en opgestuurd naar het Laboratorium voor Medische Microbiologie en Infectieziekten (LMMI). Uit de kweken bleek dat de oorspuut besmet was met *Pseudomonas aeruginosa*, veroorzaker van de otitis externa. Vanaf dit moment zijn alle *Pseudomonas aeruginosa* isolaten uit oorkweken bewaard op het LMMI bij -85°C.

Aan 17 huisartspraktijken in de regio, de KNO afdeling en de lokale huisartsenpost is een bezoek gebracht. Tijdens deze bezoeken zijn afstrijken afgenomen van het instrumentarium dat gebruikt wordt bij het onderzoeken en uitspuiten van het oor. Daarnaast zijn vragen gesteld, aan de aanwezige doktersassistente en de arts, over het gebruik en de reiniging van de instrumenten.

Wanneer er uit de kweken, afgenomen van het instrumentarium, een *Pseudomonas aeruginosa* werd geïsoleerd, werd dit isolaat samen met de bewaarde isolaten afkomstig van patiënten uit deze zelfde praktijk, in duplo getypeerd.

Voor de typering van de *Pseudomonas aeruginosa* isolaten werd gebruik gemaakt van de *Pseudomonas* kit van Diversilab® (bioMérieux). Het DiversiLab® DNA fingerprinting systeem is gebaseerd op rep-PCR (repetitive sequence-based Polymerase Chain Reaction). Het principe van rep-PCR is het amplificeren van de non-coding repeated sequences (niet coderende repetitieve sequenties in het genoom). Deze non-coding repeated sequences komen voor in het gehele genoom van een bacterie. Zo ontstaat er een, voor de stam uniek, bandenpatroon. Isolaten die volgens het Diversilab®-systeem overeenkwamen werden ter bevestiging opgestuurd naar de afdeling Moleculaire Epidemiologie van het VUMC Amsterdam voor AFLP typering. Het discriminerend vermogen van het Diversilab® systeem blijkt namelijk onvoldoende te zijn. In vier huisartspraktijken is zowel met Diversilab® als met AFLP een overeenkomst gevonden, tussen isolaten geïsoleerd uit het instrumentarium in de huisartspraktijk en isolaten geïsoleerd uit oren van patiënten, of van patiënten onderling. Hieruit concluderen we dat er mogelijk overdracht plaatsvindt vanuit het instrumentarium naar het oor van de patiënt. Aan de hand van deze resultaten zijn in samenwerking met de afdeling Hygiëne en Infectiepreventie van de Isala klinieken aanbevelingen opgesteld voor de huisartspraktijken. In deze aanbevelingen wordt beschreven hoe het instrumentarium gebruikt en gereinigd dient te worden.

Abstract

The ear consists of the outer-ear, middle-ear and the inner-ear. The outer-ear is divided into the auricle and the external auditory canal. Under normal circumstances the outer-ear is protected by the epithelium and the production of earwax (cerumen). Damaged epithelium or changing the pH-value of the cerumen may decrease resistance to infections in the external auditory canal. Infection of the external auditory canal is called otitis externa.

Otitis externa can be acute, chronic or malign.

In the Netherlands otitis externa has an incidence of 14 cases per 1000 patients yearly. In most cases otitis externa is caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *Pseudomonas aeruginosa* can be isolated from surface water, sewer and soil. *Pseudomonas aeruginosa* can survive well in a humid environment, like the remaining water in an ear syringe after use. Contact with contaminated water gives an enlarged risk of otitis externa. The use of cosmetic products or systemic conditions such as eczema may also decrease the resistance to infections.

When examining the outer ear, a general practitioner will use an otoscope and if necessary an ear syringe to clean the external auditory canal. Begin January 2010, a general practitioner Dr. R.G.J. Klein Overmeen, contacted the Laboratory of Clinical Microbiology and Infections Diseases (LMMI). He established how often his patients get an otitis externa after cleaning the ears by using an ear syringe. He presumed that the ear syringe was contaminated with *Pseudomonas aeruginosa*, which causes otitis externa. Samples taken from the ear syringe were positive for *Pseudomonas aeruginosa*.

From February 2010, all *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from otitis external cases were collected and frozen at the LMMI.

We visited 17 general practices, the otorhinolaryngology department and the Huisartsenpost (emergency care by general practitioners during evenings, nights, weekends and public holidays). During each visit we took a few samples of the instruments used for examining and cleaning the outer ear, and we asked the medical receptionist a few questions about using and cleaning the instruments.

If we isolated *Pseudomonas aeruginosa* from an instrument, we compared this strain with the strains collected from the patients of this particular general practice. For typing the strains we used the Diversilab® system *Pseudomonas kit* (BioMérieux). The Diversilab® system is based on rep-PCR (repetitive sequence-based Polymerase Chain Reaction). The principle of rep-PCR is amplification of the non-coding fragments in the genome of the bacterium. These fragments are widespread in the genome, and unique for each strain, so for each strain a unique fingerprint is formed.

Similar strains, according to the Diversilab® results, were sent to the department Molecular Epidemiology at the VUMC Amsterdam, for AFLP typing. AFLP typing was used to confirm the results of Diversilab®.

In four general practices we found similarity between strains of patients and strains isolated from the instruments, or similarity between strains of different patients.

We concluded there is a possibility of cross contamination from the instruments to the patient. In cooperation with the department of Hygiene and Infection prevention of the Isala klinieken we formulated some recommendations about how to use and how to clean the instruments after use in a general practice.

Afkortingenlijst

AFLP	Amplification Fragment Length Polymorphism
AST	Antimicrobial Susceptibility Testing
ATCC	American Type Culture Collection
CHOC	Chocolate agar + PolyViteX
CLED	Cysteine Lactose Electrolyte Deficient agar
COS	Columbia-agar + 5% Schapenbloed
CSA	Centrale Sterilisatie afdeling
DNA	Deoxyribonucleic acid
dNTP	Deoxyribonucleotide Triphosphate
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic Acid
ID	Identification
kDa	kilo Dalton
KNO	Keel-, Neus-, en Oorheelkunde
LMMI	Laboratorium voor Medische Microbiologie en Infectieziekten
MD	Microbial DNA
MDRPA	Multidrug-Resistant <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
MLST	Multilocus sequence typing
N/A	Not Available (niet beschikbaar)
NaCl	Natriumchloride
NICU	Neonatale Intensive Care Unit
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>P. cepacia</i>	<i>Pseudomonas cepacia</i>
pH	pondus Hydrogenium (zuurgraad)
PPMO	Potentieel Pathogene Micro-organismen
RCF	Relative Centrifugal Force
Rep-PCR	Repetitive extragenic palindromic-Polymerase Chain Reaction
Rpm	Revolutions per minute
SAC	Columbia-agar + 5% schapenbloed + Aztreonam en Colistine
SDS	Sodium Dodecyl Sulphate
SKML	Stichting Kwaliteitsbewaking Medische Laboratoriumdiagnostiek
WIP	Werkgroep Infectie Preventie

Inhoudsopgave

SAMENVATTING.....	3
ABSTRACT	4
AFKORTINGENLIJST	5
INHOUDSOPGAVE	6
1. INLEIDING	8
1.1. ANATOMIE VAN HET BUITENoor.	8
1.2. OTITIS EXTERNA.....	8
1.2.1. <i>Acuut</i>	9
1.2.2. <i>Chronisch</i>	9
1.2.3. <i>Maligne</i>	10
1.3. EPIDEMIOLOGIE.....	10
1.4. OORZAAK ACUTE OTITIS EXTERNA.	10
1.5. NORMALE FLORA EN VERSTOORDE FLORA.	10
1.6. PSEUDOMONAS AERUGINOSA.	11
1.7. WAAROM PSEUDOMONAS AERUGINOSA EEN OTITIS EXTERNA VEROORZAAKT.....	11
1.8. DIAGNOSTIEK.....	12
1.9. BEHANDELING.....	12
1.9.1. <i>Acuut en chronisch</i>	12
1.9.2. <i>Maligne</i>	13
1.10. SCHOONMAAK VAN INSTRUMENTARIUM IN DE HUISARTSPRAKTIJK.....	13
1.11. ONDERZOEKSOPZET.	14
2. IDENTIFICATIE EN TYPERINGSMETHODE	15
2.1. KWEEK.....	15
2.2. VITEK®2.	15
2.3. DNA-EXTRACTIE.....	15
2.4. REP-PCR.	16
2.5. ELEKTROFORESE.	16
2.6. ANALYSE.....	18
2.7. DISCRIMINEREND VERMOGEN DIVERSILAB® PSEUDOMONAS KIT.	18
2.8. AFLP.	18
3. MATERIAAL EN METHODE	20
3.1. VERZAMELEN PSEUDOMONAS AERUGINOSA-ISOLATEN UIT OORKWEKEN.	20
3.2. BEZOEK AAN HUISARTSPRAKTIJKEN, KNO-AFDELING EN DE HUISARTSENPOST.	20
3.2.1. <i>Afstrijken afgenomen van instrumentarium</i>	20
3.2.2. <i>Vragenlijst</i>	20
3.3. GENOTYPERING EN EPIDEMIOLOGIE.	21
3.3.1. <i>Isolaten gebruikt voor typering met behulp van Diversilab®</i>	21
3.3.2. <i>Achtergrond patiënten en frequentie van otitis na lavage</i>	21
3.4. TYPERING MET BEHULP VAN DIVERSILAB®.....	21
3.4.1. <i>Benodigdheden extractie en typering</i>	21
3.4.2. <i>Extractie van DNA met behulp van kolomfiltering</i>	21
3.4.3. <i>Rep-PCR</i>	22
3.4.4. <i>Gel-elektroforese</i>	23
3.4.5. <i>Agilent® 2100 bioanalyser</i>	23
3.4.6. <i>Inijken Diversilab</i>	24
3.4.7. <i>Onderscheidend vermogen van de Diversilab® Pseudomonas kit</i>	24
3.4.8. <i>Verduunningsreeks</i>	24
3.4.9. <i>Wanneer worden isolaten als identiek beschouwd</i>	25
3.5. AFLP VUMC.	25
4. RESULTATEN.....	27
4.1. VERZAMELEN PSEUDOMONAS AERUGINOSA-ISOLATEN UIT OORKWEKEN.	27

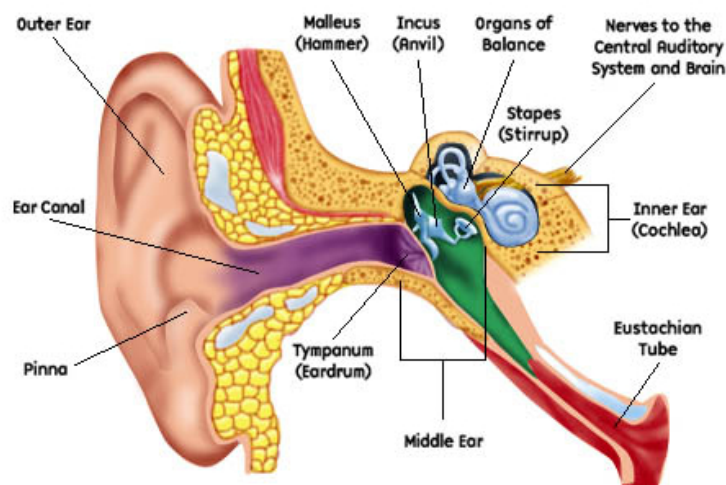


4.2. BEZOEK AAN HUISARTSPRAKTIJKEN, KNO-AFDELING EN DE HUISARTSENPOST.	27
4.2.1. Kweken afgenomen van instrumentarium.	27
4.2.2. Vragenlijst.	29
4.2.3. KNO afdeling en de Huisartsenpost.	30
4.3. GENOTYPERING EN EPIDEMIOLOGIE.	31
4.3.1 Isolaten gebruikt voor typering met behulp van Diversilab®.	31
4.3.2. Achtergrond patiënten en frequentie van otitis na cerumenlavage.	31
4.4. TYPERING MET BEHULP VAN DIVERSILAB®.	32
4.4.1. Inijken Diversilab.	32
4.4.2. Onderscheidend vermogen van de Diversilab® Pseudomonas kit.	32
4.4.3. Verdunningsreeks.	33
4.4.4. ATCC vergelijking.	35
4.4.5. Resultaten Diversilab®.	36
4.5. AFLP VUMC.	37
4.5.1. AFLP Resultaten.	38
4.5.2. Reproduceerbaarheid AFLP.	38
4.6. ADVIEZEN EN AANBEVELINGEN.	38
4.7. SAMENVATTING RESULTATEN.	38
5. DISCUSSIE.	40
5.1. EERDER UITGEVOERD ONDERZOEK.	40
5.2. VERZAMELEN PSEUDOMONAS AERUGINOSA-ISOLATEN UIT OORKWEKEN.	40
5.3. BEZOEK AAN HUISARTSENPRAKTIJKEN, KNO AFDELING EN DE HUISARTSENPOST.	40
5.3.1. Afstrijken afgenomen.	40
5.3.2. KNO afdeling en de Huisartsenpost.	41
5.3.3. Vragenlijst.	41
5.3.4. Achtergrond patiënten en frequentie van otitis na cerumenlavage.	42
5.4. TYPERING MET BEHULP VAN DIVERSILAB®.	42
5.4.1. RAPD en Rep-PCR.	42
5.4.2. Discriminerend vermogen Diversilab® Pseudomonas kit.	43
5.4.3. Verdunningsreeks.	43
5.4.4. Literatuur over het discriminerend vermogen van het Diversilab® systeem.	43
5.4.5. Diversilab® resultaten.	44
5.5. AFLP VUMC.	44
5.5.1. Discriminerend vermogen AFLP.	44
5.5.2. AFLP resultaten.	45
5.5.3. Reproduceerbaarheid AFLP.	45
6. CONCLUSIE.	46
LITERATUURLIJST.	47
FIGURENLIJST.	49
NAWOORD.	50
BIJLAGE 1; VRAGENLIJST BIJ BEZOEK AAN HUISARTSENPRAKTIJK.	51
BIJLAGE 2: INIJKEN DIVERSILAB®.	52
BIJLAGE 3; ALLE SOORTEN MICRO-ORGANISMEN GEÏSOLEERD UIT DE AFGENOMEN KWEKEN.	53
BIJLAGE 4; RESULTATEN DIVERSILAB®.	54
BIJLAGE 5; AFLP RESULTATEN.	58
BIJLAGE 6; AANBEVELINGEN.	62
BIJLAGE 7; ANTWOORDEN UIT DE HUISARTSENPRAKTIJK, KNO-AFDELING EN HUISARTSENPOST.	66

1. Inleiding

1.1. Anatomie van het buitenoor.

Het oor is opgebouwd uit het buitenoor, het middenoor en het binnenoor. Het buitenoor wordt onderverdeeld in de oorschelp en de uitwendige (externe) gehoorgang. Aan het eind van de externe gehoorgang bevindt zich het trommelvlies, het trommelvlies scheidt het buiten- en middenoor van elkaar (figuur 1). De externe gehoorgang zorgt er voor dat trillingen (geluid) die worden opgevangen door de oorschelp, naar het trommelvlies geleid worden. De externe gehoorgang is ongeveer twee en halve centimeter lang en licht gebogen, deze is met huid bekleed. In de externe gehoorgang bevinden zich ongeveer 1000 tot 2000 klieren die oorsmeer (cerumen) produceren.¹ Cerumen is een lipideproduct van de apocriene klieren en de talgklieren in de externe gehoorgang. Cerumen is een mengsel van talg, haartjes en keratine.² Cerumen heeft normaal gesproken een pH-waarde van 5 tot 5,7. Omdat cerumen zuur is heeft het een bactericide (bacteriedodende) werking. Bij het verstoren van deze zuurgraad is de kans op het krijgen van een infectie verhoogd.³ Cerumen heeft namelijk als functie het beschermen van de gehoorgang tegen bacteriën en ander vuil.¹ De epitheellaag van de externe gehoorgang wordt langzaam vanaf het trommelvlies richting de uitgang van de externe gehoorgang vernieuwd, en transporteert zo het cerumen (inclusief al het vuil) mee naar het uitwendige oor.⁴ Daarnaast zorgt het kaakgewricht er voor dat bij gapen, en het maken van kauwbewegingen zoals praten, de korreltjes cerumen naar de uitgang van de gehoorgang worden getransporteerd.²



Figuur 1; anatomie van het oor, met buitenoor, middenoor en binnenoor.

1.2. Otitis externa.

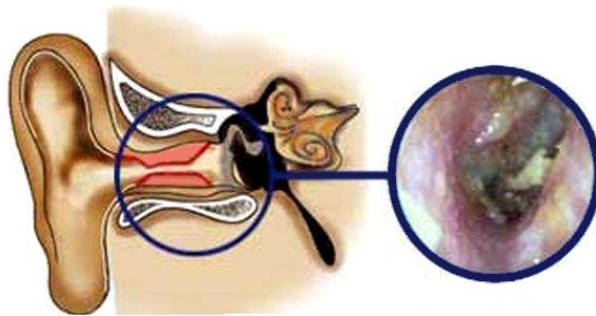
Wanneer de bescherming van het cerumen en de bescherming van de intacte huid wegvallen in de externe gehoorgang, door bijvoorbeeld een beschadiging van de huid of een verstoring van de zuurgraad, is er een verhoogde kans op het krijgen van een infectie.⁵ Een infectie van de externe gehoorgang noemt men een otitis externa. Otitis externa is een ontsteking van de

huid in de externe gehoorgang waarbij het trommelvlies gewoonlijk gespaard blijft.⁶ Vaak is er sprake van een bacteriële infectie of een schimmelinfectie. Naast beschadiging van de gehoorgang kan er ook sprake zijn van andere factoren die de kans op het krijgen van een otitis externa verhogen. Deze factoren zijn bijvoorbeeld het hebben van diabetes, anemie en huidaandoeningen als eczeem en psoriasis. Door dit soort aandoeningen wordt de bescherming van het externe oor verminderd.⁷ Het blootstellen aan water geeft een verhoogd risico, een infectie na bijvoorbeeld zwemmen in verontreinigd water staat ook wel bekend als een 'zwemmersoor'. Wanneer het oor in contact komt met water wordt de pH waarde van het cerumen verhoogd waardoor de beschermende werking wegvalt. Otitis externa is onder te verdelen in een acute, een chronische of een maligne infectie.

1.2.1. Acuut.

Wanneer er voor het eerst sprake is van een otitis externa spreekt men van een acute otitis externa. De voornaamste symptomen van een acute otitis externa zijn pijn, jeuk en gehoorverlies. Bij onderzoek van het oor, met behulp van een otoscoop, zal worden waargenomen dat de externe gehoorgang rood en gezwollen is (figuur 2). Het omhoog trekken van het externe oor, bij de oorschelp, zal pijnlijk zijn, dit in tegenstelling tot otitis media, waarbij het midden oor ontstoken is en tractie aan het externe oor niet of nauwelijks pijnlijk zal zijn.⁵

Een acute otitis externa is weer onder te verdelen in drie categorieën mild, matig en ernstig. Het begin van de infectie zal mild verlopen, er zullen klachten zijn van jeuk en een verdikking van de externe gehoorgang. Wanneer de milde vorm overgaat in de matige vorm zal de pijn en gevoeligheid bij aanraking van het oor toenemen. Als deze matige vorm vervolgens weer overgaat in de ernstige vorm zal de jeuk, de pijn en de gevoeligheid bij het aanraken van het oor sterk toenemen. De externe gehoorgang zal meer opzwellen en roder worden. De afscheiding die het oor produceert zal van in de milde fase (zo goed als) helder, naar in de ernstige fase purulent, worden. In deze ernstige fase ziet men vaak dat koorts en opgezette lymfeklieren een rol gaan spelen.⁵



Figuur 2; vernauwing van de gehoorgang.

1.2.2. Chronisch.

Er wordt gesproken van een chronische otitis externa als een acute otitis externa niet volledig geneest.⁵ De infectie zal, in mindere mate, drie maanden of langer aanhouden. Hierbij is vaak de pijn minder, maar zullen er meer klachten zijn van jeuk. Bij onderzoek zal blijken dat de huid in de externe gehoorgang erg droog en geschilderd is, en er niet of nauwelijks cerumen aanwezig is.⁵

1.2.3. Maligne.

Een maligne (necrotiserende) otitis externa wordt in de meeste gevallen veroorzaakt door de bacterie *Pseudomonas aeruginosa*. Een maligne otitis externa wordt vaak beschreven bij patiënten met diabetes mellitus, of immuungecompromitteerden zoals patiënten met HIV/AIDS of patiënten die onder behandeling zijn van chemotherapeutica.⁷ Een maligne otitis externa wordt gekenmerkt door ernstige zwelling van de externe gehoorgang en (vaak) het omliggende weefsel. De infectie kenmerkt zich vooral door de snelle uitbreiding in de weke delen rondom het geïnfecteerde oor en zorgt hierbij voor necrose van het kraakbeen en bot van de uitwendige gehoorgang.⁷ *Pseudomonas aeruginosa* is hiertoe in staat door het uitscheiden van bepaalde enzymen.⁵ Enzymen die deze virulente stammen produceren zijn lytische enzymen zoals endotoxine, collagenase en elastase. Door de productie van deze lytische enzymen kan de infectie invasief worden en omliggend weefsel aantasten.⁷ Door uitbreiding in de weke delen kunnen hersenzenuwen aangetast worden en kan de bacterie de bloedbaan binnen treden waardoor er sepsis optreedt.⁸ Door deze gevolgen kent een maligne otitis externa een hoge mortaliteit en is op tijd behandelen met de juiste medicatie noodzakelijk.

1.3. Epidemiologie.

In de huisartspraktijken in Nederland wordt bij ongeveer 14 op de 1000 patiënten per jaar een acute otitis externa beschreven. In de zomermaanden komt acute otitis externa vaker voor dan in de wintermaanden. Dit is vooral te wijten aan de hogere temperaturen in de zomer maanden en het vaker in aanraking komen met water (denk hierbij vooral aan zwemmen). Chronische otitis externa komt een stuk minder vaak voor, exacte cijfers hiervan zijn niet bekend.³ Maligne otitis externa komt maar zelden voor.

1.4. Oorzaak acute otitis externa.

Een verstoring van de pH-waarde van het cerumen kan leiden tot een acute otitis externa. Deze zuurgraad kan bijvoorbeeld verstoord worden door het gebruik van shampoo en andere zeepproducten. Ook is bekend dat frequent contact met water (zwemmen) een verhoogd risico geeft. Andere oorzaken van een otitis externa is het afsluiten van de gehoorgang door bijvoorbeeld een oordopje (van een koptelefoon) of hoorapparaat. Afsluiting van de gehoorgang zorgt voor een hogere vochtigheid in het oor en kan zorgen voor irritatie van de gehoorgang. Ook het peuteren in oren of het reinigen met een wattendrager kan de externe gehoorgang beschadigen.³ Verder is bekend dat haargroei, het gebruik van cosmetische producten en allergische reacties een oorzaak kunnen zijn voor het ontstaan van een otitis externa.¹

1.5. Normale flora en verstoorde flora.

Bij gezonde personen bestaat de commensale flora in de externe gehoorgang voornamelijk uit Gram-positieve bacteriën. Men vindt hier vooral stafylokokken als *Staphylococcus auricularis* en *Staphylococcus epidermidis*. Zelden vindt men in deze commensale flora Gram-negatieve staven of schimmels.³ De meeste infecties in de externe gehoorgang worden veroorzaakt door bacteriën. *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Haemophilus influenzae* en andere Gram-negatieve bacteriën kunnen een otitis externa veroorzaken, maar over het algemeen wordt de infectie veroorzaakt door een *Pseudomonas aeruginosa*.³⁻⁹ Wanneer er sprake is van

een gist- of schimmelinfectie wordt deze over het algemeen veroorzaakt door een *Candida albicans* of een *Aspergillus*. Gist- en schimmelinfecties komen een stuk minder frequent voor, slecht in 10% van de gevallen is er sprake van een gist- of schimmelinfectie.³

1.6. *Pseudomonas aeruginosa*.

Pseudomonas aeruginosa is een van de 140 species uit het genus *Pseudomonas*. *Pseudomonas aeruginosa* komt voor in oppervlaktewater, het riool en in de grond. Deze bacterie kan goed in een vochtige omgeving overleven en zich daar vermenigvuldigen. Voorbeelden van deze vochtige omgevingen zijn badkamers, patiëntenkamers of op nat instrumentarium.

Pseudomonas aeruginosa weet zich te handhaven in en op aanrechten, wasbakken, en zelfs in desinfectantia.

Bij gezonde personen komt *Pseudomonas aeruginosa* commensaal voor op de huid en in feces. *Pseudomonas aeruginosa* is in een Gram-preparaat te herkennen als een slanke, licht gebogen, Gram-negatieve staaf. De bacterie bevat één (monotriche) polaire flagel en is hierdoor beweeglijk. Deze bacterie groeit strikt aëroob bij een temperatuur van 5-42 °C.¹⁰ *Pseudomonas aeruginosa* wordt onder andere gevonden bij urineweginfecties, luchtweginfecties, infecties van brandwonden, postoperatieve wondinfecties en oorinfecties.¹¹

Pseudomonas aeruginosa-stammen staan bekend om hun resistentie tegen veel gebruikte antibiotica. Mede hierdoor is deze bacterie erg pathogeen.¹² Er is zelfs sprake van een Multi Drugs Resistente *Pseudomonas aeruginosa* (MDRPA). Deze *Pseudomonas aeruginosa*-stammen zijn resistent voor minimaal drie van de volgende antibiotica soorten: β -lactam antibiotica, carbapenems, aminoglycosiden en fluorochinolonen.¹³

1.7. Waarom *Pseudomonas aeruginosa* een otitis externa veroorzaakt.

Het is niet geheel bekend waarom het juist *Pseudomonas aeruginosa* is die vaak een infectie veroorzaakt in de externe gehoorgang. Wel bekend is dat er factoren zijn die de kans op het ontwikkelen van een otitis externa verhogen, zoals diabetes, eczeem, psoriasis en de blootstelling aan water. Tropisme (affiniteit met een bepaald weefsel of anatomische locatie)¹⁴ is erg belangrijk voor de plek waar een bacterie een infectie veroorzaakt. Uit onderzoek is gebleken dat *Pseudomonas aeruginosa*-stammen die geïsoleerd zijn uit een externe otitis verschillen van stammen die gevonden worden bij bijvoorbeeld een ulcus aan een been of urineweginfecties. Verschillen zijn een verlaagde productie van pyocyanine (blauwgroen pigment), urease en alginaat in de isolaten van de otitis externa groep vergeleken met de controlegroepen (isolaten van urineweginfectie en isolaten van een ulcus aan een been).¹⁵ Productie van alginaat beschermt de bacterie normaal gesproken tegen fagocytose en zorgt ervoor dat deze beter kan binden aan bijvoorbeeld de epitheellaag.

Experimenten met katten bevestigen dat beschadiging van de externe gehoorgang bijdraagt aan het ontwikkelen van infecties, evenals verstoring van de pH-waarde.¹⁵ Gedacht wordt dat het belangrijker is hoe goed de bacterie kan hechten aan het epitheel in de externe gehoorgang dan hoe deze daar terecht komt. Het precieze mechanisme hierachter is nog niet bekend.

Vanuit dit perspectief is onderzoek gedaan naar waarom stammen die geïsoleerd zijn uit oren, beter hechten aan epitheel in de externe gehoorgang, dan stammen die geïsoleerd zijn uit bijvoorbeeld urineweginfecties.¹⁵ Uit dit onderzoek is gebleken dat er nauwelijks verschillen zijn in de enzymactiviteit tussen de isolaten uit de otitis externa groep en de controlegroep. Er

is één enzym dat wel duidelijk een significant verschil laat zien, namelijk DNase. Uit de isolaten van de otitis externa groep bleek de activiteit van dit enzym verhoogd te zijn vergeleken met de controlegroepen. Aan de hand van het resultaat, van de vijf enzymen (lipase, protease, elastase, DNase en hemolysine) die zijn onderzocht in dit onderzoek, kan er nog geen duidelijk beeld gegeven worden waarom *Pseudomonas aeruginosa* zo gemakkelijk bindt aan het epitheel van de externe gehoorgang. Aan de hand van dit onderzoek wordt aangenomen dat de predisponerende factoren belangrijker zijn voor het ontwikkelen van de infectie dan de manier waarop de *Pseudomonas aeruginosa* in staat is om te koloniseren op het epitheel in de externe gehoorgang.¹⁵

1.8. Diagnostiek.

Een uitstrijk, afgenomen van het externe oor, wordt opgestuurd naar een medisch microbiologisch laboratorium. Hier wordt de uitstrijk ingezet op specifieke voedingsbodems (zie tabel 2). Na het incuberen van de voedingsbodems worden deze beoordeeld door een analist. De analist beoordeelt of er zogeheten PPMO's aanwezig zijn in de kweek. PPMO's zijn Potentieel Pathogene Micro-Organismen (hieronder vallen de volgende bacteriën: *Staphylococcus aureus*, β -hemolytische streptokokken (met uitzondering van groep B,C,F en G, deze behoren tot de normale flora, deze worden alleen als pathogeen gezien wanneer deze duidelijk overheersen) *Enterobacteriaceae*, nonfermenters (waaronder *Pseudomonas aeruginosa*), schimmels (*Aspergillus* spp.) en gisten). Deze PPMO's groeien op de voedingsbodem tussen de normale flora van het externe oor. Ook wanneer er een bacterie uit de normale flora overheerst in de kweek dient deze als mogelijke verwekker gezien te worden. Na het beoordelen van de kweek zullen bacteriën die overheersen of die horen bij de PPMO's, geïdentificeerd worden. Voor de identificatie van *Pseudomonas aeruginosa* wordt naast het gebruik van bijvoorbeeld het Vitek2®-systeem een oxidase-test uitgevoerd. Deze moet positief zijn. Soms is een extra test nodig om te kijken of de stam ook bij 42°C in staat is om te groeien. Naast een identificatie wordt er een gevoeligheidsbepaling verricht. Hiermee wordt gekeken voor welke antibiotica de bacterie gevoelig is en voor welke resistent. Aan de hand van deze uitslag kan de arts de patiënt met de juiste antibiotica behandelen.¹⁶

Met behulp van genotypering kan eventueel worden vastgelegd of verschillende isolaten genetisch overeenkomen. Epidemiologisch kan zo gekeken worden naar de verspreiding van een bepaalde stam.

1.9. Behandeling.

1.9.1. Acut en chronisch.

Naast het reinigen van het oor met behulp van een oorspuit of het inbrengen van een watje doordrenkt met oordruppels om de externe gehoorgang te ontzwellen, kan er gebruik worden gemaakt van een medicamenteuze behandeling.

Een medicamenteuze behandeling van otitis externa wordt vaak begonnen met het toedienen van zure oordruppels (dit zijn dezelfde druppels die worden gebruikt bij het doordrenken van een oorwatje) met corticosteroiden (om de ontstekingsreactie te onderdrukken). Wanneer er echter ook sprake is van koorts, algemeen ziek zijn, pijn en zwelling met roodheid van de oorschelp of weke delen rondom het oor wordt aangeraden de behandeling van oordruppels aan te vullen met het oraal innemen van het antibioticum flucloxacilline (smal-spectrum

antibioticum tegen Gram positieven). Wanneer na een behandeling van minimaal drie weken nog geen verbetering zichtbaar is, wordt de arts aangeraden een uitstrijk te nemen van de externe gehoorgang voor verder bacteriologisch onderzoek.² Voor een chronische otitis externa wordt dezelfde behandeling toegepast als voor een acute otitis externa, het reinigen van het oor en het toedienen van oordruppels. Hierbij is het vooral belangrijk dat de huid van de externe gehoorgang weer geneest en de productie van cerumen weer opgang komt. Dit is nodig om de natuurlijke bescherming van het oor (intacte huid en cerumen) weer terug te brengen.¹⁻³

1.9.2. Maligne.

Patiënten waarbij een maligne otitis externa wordt gediagnosticeerd worden direct in het ziekenhuis opgenomen. Via een intraveneus infuus krijgt de patiënt antibiotica toegediend. Omdat een maligne otitis externa meestal veroorzaakt wordt door *Pseudomonas aeruginosa* wordt er direct gestart met ciprofloxacin of ceftazidime (alleen of in combinatie met een aminoglycoside). Deze medicatie wordt toegepast totdat er een uitslag is van de kweek en het bijbehorende antibiogram (gevoeligheidspatroon), hierop kan eventueel de behandeling aangepast worden.⁵

1.10. Schoonmaak van instrumentarium in de huisartspraktijk.

Wanneer een patiënt bij de huisarts komt met oorklachten zal de arts in de meeste gevallen in het oor kijken met behulp van een otoscoop om een diagnose te stellen. Om het oor met klachten te vergelijken met het oor zonder klachten zal de arts in beide oren kijken. Hygiënischer is het hierbij om eerst in het gezonde oor en vervolgens in het oor met klachten te kijken om overdracht van micro-organismen van het ene naar het andere oor te voorkomen.³ Wanneer er sprake is van een cerumenprop of overmatige schilfering zal de huisarts het oor vaak laten uitspuiten met behulp van een oorspuit. Volgens de richtlijnen van Stichting Werkgroep Infectie Preventie (WIP) wordt bij het reinigen van instrumentarium onderscheid gemaakt in niet-kritisch-, semi-kritisch- en kritisch-instrumentarium (tabel 1). Over het algemeen komt een otoscoop of oorspuit alleen in contact met de intacte huid en is, volgens deze richtlijnen van Stichting Werkgroep Infectie Preventie (WIP), huishoudelijk reinigen en goed drogen voldoende.¹⁷ Onder reiniging wordt verstaan het verwijderen van zichtbaar en onzichtbaar vuil en organisch materiaal. Dit om te voorkomen dat micro-organismen zich op het materiaal kunnen handhaven en vermenigvuldigen en zo bij volgend gebruik een andere patiënt besmetten.¹⁷ Aangeraden wordt om gebruik te maken van disposables. Zo wordt de overdracht van micro-organismen van de ene naar de andere patiënt vermeden.

Tabel 1; Behandeling niet-disposable instrumentarium na gebruik. Volgens Stichting Werkgroep Infectie Preventie (WIP).¹⁷

Kwalificatie:	Instrument in contact met:	Wijze van decontaminatie:
Niet-kritisch instrumentarium*	Intacte huid	Alleen reinigen en goed drogen
Semi-kritisch instrumentarium	Slijmvliezen	Reinigen, desinfecteren en goed drogen
Kritisch instrumentarium	Niet-intacte huid of slijmvliezen, steriele lichaamsholte	Sterilisatie

* Een oorspuit valt onder het niet-kritische instrumentarium, maar dient wel gedesinfecteerd te worden na gebruik bij een patiënt met een otitis externa.¹⁷

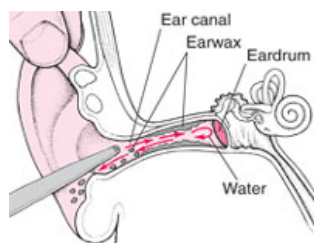
1.11. Onderzoekopzet.

Begin januari 2010 heeft huisarts Dr. R.G.J. Klein Overmeen, uit de regio Zwolle, contact gezocht met het Laboratorium voor Medische Microbiologie en Infectieziekten (LMMI), van de Isala klinieken in Zwolle. Hem was opgevallen dat na het uitspuiten van oren, patiënten terugkwamen met klachten wijzend op een externe otitis. De huisarts had het vermoeden dat het instrumentarium dat hij gebruikt voor het uitspuiten van de oren wel eens besmet kon zijn met *Pseudomonas aeruginosa* (veroorzaker van de otitis externa). Hij heeft hierop afstrijken afgenomen van het gebruikte instrumentarium om te kijken of deze inderdaad besmet zijn met *Pseudomonas aeruginosa*. Hiervan zijn de volgende afstrijken ontvangen, 29 januari 2010 op het LMMI:

1. tip oorspuit I en tip oorspuit II
2. tip opzetstuk I en tip opzetstuk II
3. tip otoscoop I en tip otoscoop II

Uit de bacteriële kweken van deze afstrijken bleek de oorspuit, zowel tip I als II, besmet te zijn met onder andere *Pseudomonas aeruginosa*. De overige kweken bleken negatief te zijn.

Om na te gaan of er inderdaad sprake is van overdracht via het instrumentarium zijn met ingang van 1 februari 2010 alle *Pseudomonas aeruginosa*-isolaten, die geïsoleerd zijn uit oren van huisartspatiënten en KNO-patiënten, op het LMMI bewaard (bij – 85 °C). Door middel van een genotypering zal worden vastgesteld of dezelfde *Pseudomonas aeruginosa*-isolaten voorkomen bij patiënten als op of in het instrumentarium.



Figuur 3; cerumenlavage.

2. Identificatie en typeringsmethode

2.1. Kweek.

Pus uit de uitwendige gehoorgang wordt afgenomen met een steriele wattenstok en wordt ingezet op voedingsbodems (tabel 2). CHOC, CLED en SAC worden na één en na twee keer overnacht incubatie (bij 35°C met 5% CO₂) beoordeeld. De COS wordt anaëroob geïncubeerd en beoordeeld na twee keer overnacht incubatie.

Tabel2; voedingsbodems die gebruikt worden voor een otitis externa kweek met de bijbehorende eigenschappen.

Voedingsbodem	Eigenschappen
CHOC	Bevat X en V factoren voor de groei van <i>Haemophilus</i> .
COS	Columbia agar + 5% schapenbloed, voor de groei van zowel Gram-positief als Gram-negatief.
CLED	Cysteïne Lactose Elektrolyten Deficiëntie agar, voor de groei van Gram-negatieven
SAC	Columbia agar + 5% schapenbloed + de antibiotica aztreonam en colistine. Voor de groei van Gram-positieven.

2.2. Vitek®2.

Vitek®2 is een volautomatisch systeem, dat de identificatie en gevoeligheidsbepaling van de meeste bacteriën, zo ook voor *Pseudomonas aeruginosa*, volautomatisch uitvoert. Voor het gebruik van Vitek®2 moet een suspensie gemaakt worden van de te onderzoeken bacterie met een dichtheid van 0,50 tot 0,63 McFarland in 3,0 ml 0,45% NaCl-oplossing. De dichtheid van de suspensie wordt vastgesteld met behulp van een DensiChek® (optische dichtheids meter).¹⁸ De ID- (identificatie) en AST- (antimicrobial susceptibility testing) kaarten bestaan uit 64 welletjes die verschillende substraten en antibiotica bevatten. De Vitek®2 incubeert deze kaarten en leest ze af. In de software is vervolgens waar te nemen om welke bacterie het gaat en welk gevoeligheidspatroon erbij hoort.¹⁹

2.3. DNA-extractie.

De Ultraclean® Microbial DNA isolation kit van Mo Bio Laboratories Inc. is ontwikkeld voor het isoleren van DNA uit micro-organismen. Deze extractie wordt uitgevoerd met behulp van kolomfiltering. Hierbij worden de volgende stappen doorlopen. Van een overnacht geïncubeerde, aangekweekte stam wordt een suspensie gemaakt in een bead-oplossing (waar de beads, die nodig zijn voor lysis zich in bevinden). De cellen worden gelyseerd met een combinatie van een SDS bevattende oplossing (MD1) in een epje met beads (korrels). Door deze epjes te vortexen, gedurende tien minuten, worden de cellen zowel chemisch als mechanisch gelyseerd. Vervolgens wordt het epje met de gelyseerde cellen afgedraaid om onder andere eiwitten (celresten) tot een pellet te laten neerslaan. Het supernatant wordt toegevoegd aan een MD2 oplossing, deze oplossing zorgt er voor dat proteïnen zullen neerslaan in het epje. Het supernatant wordt vervolgens toegevoegd aan een MD3 oplossing, deze oplossing bevat een hoge zoutconcentratie. Deze hoge zoutconcentratie is nodig om het

DNA tijdens de volgende stap aan het filter te laten binden. De gehele oplossing wordt overgepipetteerd in een spin filter epje. Het DNA blijft door de hoge zoutconcentratie binden aan het membraan, de rest (contaminatie) gaat door het membraan heen (filtraat). Het filtraat wordt weggegooid.

Vervolgens wordt het filter gewassen met MD4, dit is een wasbuffer op basis van ethanol. MD4 wasbuffer zorgt ervoor dat overig zout en andere contaminatie dat gebonden is aan het DNA wordt weggewassen. Hierbij blijft het DNA gebonden aan het filter. Als laatste wordt het DNA geëluëerd met behulp van MD5. MD5 is een elutie buffer, bij het centrifugeren gaat deze elutie buffer door het silica membraan heen en zorgt ervoor dat het DNA loslaat van het membraan. MD5 is een 10mM Tris pH8 oplossing en bevat geen zout.

Nu is in het epje al het DNA afkomstig van de bacteriën verzameld. Dit geïsoleerde DNA kan gebruikt worden voor amplificatie.²⁰

2.4. Rep-PCR.

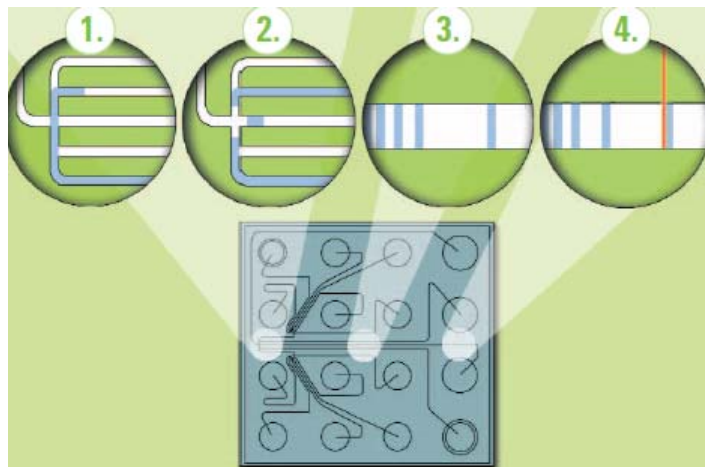
Voor de typering van de *Pseudomonas aeruginosa*-stammen wordt de *Pseudomonas* kit gebruikt van Diversilab® (bioMérieux). Het DiversiLab® DNA fingerprinting systeem maakt gebruik van de rep-PCR (repetitive sequence-based Polymerase Chain Reaction) technologie. Deze technologie is ontwikkeld voor epidemiologische onderzoeken, zoals het opsporen van de bron die verantwoordelijk is voor de verspreiding van een bepaald micro-organisme. Het principe van rep-PCR is het amplificeren van non-coding repeated sequences (niet coderende repetitieve sequenties in het genoom). Deze non-coding repeated sequences komen voor in het gehele genoom van een bacterie. Door het gebruik van een combinatie aan primers, worden vele fragmenten, met verschillende grootte, die over het hele genoom verspreid liggen geamplificeerd (figuur 5 en 6). Het PCR programma voor de amplificatie is weergegeven in tabel 3.²¹

Tabel 3; Cycli die de thermal cycler doorloopt tijdens de rep-PCR.²²

Rep-PCR protocol			
Initial denaturation:	94°C	2 min.	
Repeat cycle:	35 cycles		
Denaturation:	94°C	30 sec.	
Annealing:	50°C	30 sec.	
Extension:	70°C	90 sec.	
Final extension:	70°C	3 min.	
Hold:	4°C	∞	

2.5. Elektroforese.

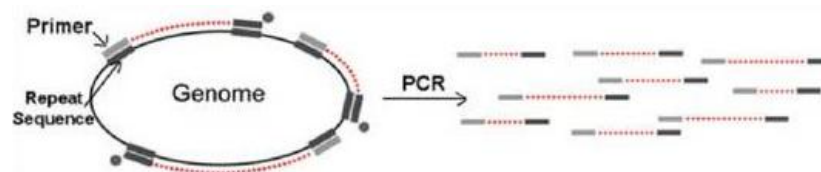
De geamplificeerde fragmenten kunnen vervolgens gescheiden worden op grootte. Een rep-PCR profiel wordt gecreëerd door de vele fragmenten van verschillende grootte. De fragmenten worden gescheiden met behulp van gel-elektroforese. DiversiLab® heeft hiervoor een chip ontwikkeld. Met deze chip (LabChip) wordt het zelfde principe van gel-elektroforese uitgevoerd. De LabChip bevat een netwerk van microkanalen, zie figuur 4.



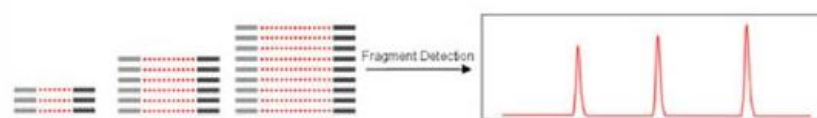
- 1) Het DNA monster migreert door de microkanalen van het welletje.
- 2) Het DNA monster migreert door het scheidingskanaal.
- 3) DNA fragmenten worden gescheiden met behulp van elektroforese.
- 4) Fluorescentie van fragmenten wordt gedetecteerd.

Figuur 4; werking Diversilab® LabChip.

Onder druk wordt gel-dye in de kanalen van de chip gebracht. De LabChip bevat 13 welletjes, het 13^e welletje kan gebruikt worden om een ladder in mee te nemen, maar ook om een DNA monster in mee te nemen. Naast het DNA monster wordt er in elke sample well een marker gepipetteerd. Deze marker bestaat uit een 'lower' en een 'upper' marker. Omdat de concentratie van de marker bekend is kan deze worden gebruikt bij de berekening van de concentratie van het DNA.²³ In de LabChip zullen de DNA fragmenten binden aan de gel-dye (gel met een fluorescerende kleurstof die bindt aan het DNA). De elektrische lading die nodig is voor de elektroforese wordt geleverd door de 16 elektrode pinnetjes die de elektrode cartridge van de Agilent®2100 bioanalyser bevat.²⁴ Deze 16 pinnetjes zijn zo afgesteld dat ze precies in de 16 welletjes van de chip vallen. Elke elektrode wordt apart aangestuurd. De DNA fragmenten worden door gradiënt verschillen van elkaar gescheiden. Kleine fragmenten zullen sneller migreren door de gel dan grotere fragmenten.²³ Wanneer de fragmenten in de microkanalen van de chip worden gescheiden, passeren ze een fluorescentiemeter waarmee het fluorescentie signaal van de fragmenten wordt gemeten. Deze signalen worden omgezet in een grafiek (figuur 6) met het bijbehorende bandenpatroon. Het gevormde profiel wordt vervolgens geanalyseerd door de Diversilab®software.²¹



Figuur 5; hechting van primers aan het DNA, fragmenten worden geamplificeerd.



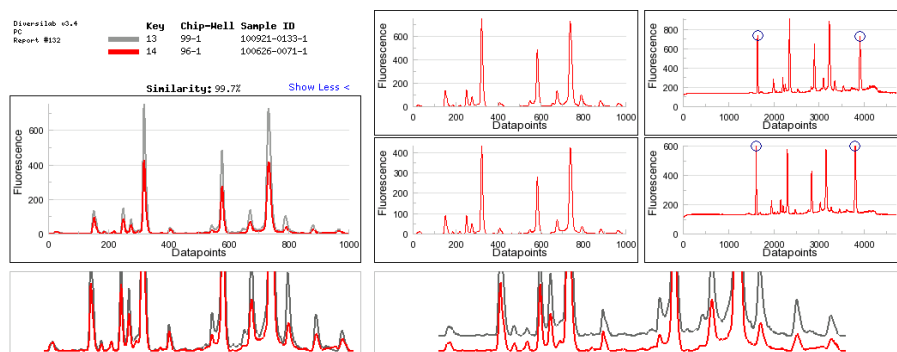
Figuur 6; Detectie van fragmenten geeft een specifiek patroon.

2.6. Analyse.

Bij het analyseren van de resultaten is gebruik gemaakt van de Pearson correlatie. De Pearson correlatie methode is zowel gebaseerd op de hoogte van de piek intensiteit als op de aan- of afwezigheid van bandjes.²⁵

Bij het analyseren van de resultaten is vaak voor de lower marker een piek waar te nemen, dit zijn de primer-dimeren uit de reactie.

Voor het analyseren van de resultaten wordt gebruik gemaakt van het dendrogram met gel-images, dat gevormd wordt door Diversilab®. Voor een specifiekere vergelijking tussen twee samples kan gebruik gemaakt worden van een overlay. In deze overlay worden grafieken van de samples weergegeven met de daarin gemeten waarden. Deze twee grafieken worden over elkaar heen geplaatst waardoor er duidelijk gekeken kan worden naar het verschil in pieken en intensiteit (hoogte van de piek).



Figuur 7; Overlay Diversilab®, pieken gelijk, intensiteit verschilt.

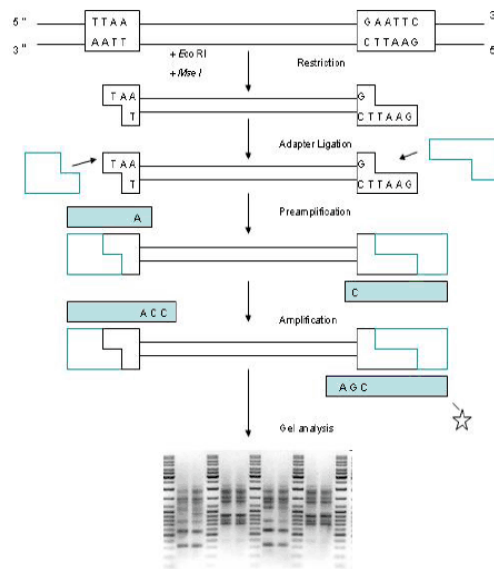
2.7. Discriminerend vermogen Diversilab® *Pseudomonas* kit.

Dat het discriminerend vermogen van de Diversilab® *Pseudomonas* kit mogelijk onvoldoende is, blijkt uit een artikel dat verscheen eind 2010. In het artikel 'Evaluation of the Diversilab System for Detection of Hospital Outbreaks of Infections by Different Bacterial Species' uit het Journal of Clinical Microbiology,³² wordt beschreven dat met name de *Pseudomonas* kit van Diversilab® verschillen laat zien in vergelijking met MLST (Multilocus sequence typing). Naar aanleiding van dit verschenen artikel is besloten om isolaten die volgens de Diversilab® typering overeenkomen te sturen voor een andere typeringsmethode. Er is gekozen voor de AFLP (Amplification Fragment Length Polymorphism) typering omdat AFLP mogelijk een groter discriminerend vermogen heeft dan Diversilab®, deze wordt uitgevoerd op de afdeling Moleculaire Epidemiologie van het VUMC Amsterdam.

2.8. AFLP.

AFLP is een typeringstechniek waarbij het DNA willekeurig wordt geknipt met één of meerdere restrictie enzymen. Deze enzymen herkennen een bepaalde volgorde van nucleotiden, dit kunnen drie maar bijvoorbeeld ook vier of zes nucleotiden zijn. De lengte van het herkende stukje DNA bepaalt hoe specifiek het restrictie enzym is, hoe meer nucleotiden deze herkent hoe specifiek het restrictie enzym is (een bepaalde sequentie van drie nucleotiden zal in verhouding vaker voorkomen dan één van zes nucleotiden). Op de

knipplaats ontstaat een zogenaamd “sticky end”.²⁶ Een sticky end is een overhang van een aantal nucleotiden ten opzichte van de complementaire streng. Het sticky end wordt gebruikt om een adapter aan te binden.²⁷ Vervolgens bindt de primer aan de adapter. Vanaf deze primer worden de fragmenten geamplificeerd. Ook de primer kan selectief gemaakt worden door aan de 3’ kant een nucleotide extra toe te voegen, zodat alleen de fragmenten worden geamplificeerd die op de volgende plek de juiste nucleotide bevatten, voor de vorming van minder banden. Vervolgens worden de geamplificeerde fragmenten op fragment grootte gescheiden met behulp van capillaire elektroforese.²⁶



Figuur 8; AFLP principe.

3. Materiaal en Methode

3.1. Verzamelen *Pseudomonas aeruginosa*-isolaten uit oorkweken.

Na de constatering van huisarts Dr. R.G.J. Klein Overmeen zijn vanaf januari 2010 alle *Pseudomonas aeruginosa*-isolaten geïsoleerd uit oorkweken bewaard in invriesbuisjes bij -85°C. Dit betreft zowel isolaten uit oorkweken van patiënten uit huisartsenpraktijken, als oorkweken van patiënten die door de KNO-arts zijn ingestuurd.

3.2. Bezoek aan huisartspraktijken, KNO-afdeling en de huisartsenpost.

Uit de lijst met bewaarde *Pseudomonas aeruginosa*-isolaten is een selectie gemaakt van huisartspraktijken. De KNO-afdeling van de Isala klinieken is bezocht ter vergelijking met de huisartspraktijken, omdat er ongeveer evenveel *Pseudomonas aeruginosa*-isolaten uit oorkweken ingestuurd door KNO-artsen worden geïsoleerd als uit oorkweken van patiënten uit de huisartspraktijken. Er is ook een bezoek gebracht aan een huisartsenpost in de regio met het idee dat hier de huisartspatiënten komen die 's avonds of in het weekend acute hulp nodig hebben.

De selectie van de te bezoeken huisartspraktijken werd gemaakt op basis van de volgende twee criteria:

- praktijken waarvan recent één of meerdere oorkweken waren ingestuurd en waaruit *Pseudomonas aeruginosa* werd geïsoleerd.
Door het selecteren van recente kweken (vanaf oktober 2010 tot en met februari 2011) werd de kans groter geacht dat er bij het afnemen van kweken, van het instrumentarium in de praktijken, dezelfde *Pseudomonas aeruginosa*-stam kon worden geïsoleerd.
- praktijken met het grootste aantal patiënten waarbij *Pseudomonas aeruginosa* uit oorkweken werd geïsoleerd (van januari 2010 tot en met januari 2011).

3.2.1. Afstrijken afgenomen van instrumentarium.

Tijdens de bezoeken werd een aantal afstrijken afgenomen van het instrumentarium dat gebruikt wordt bij het bekijken en uitspuiten van de oren met behulp van een steriele wattenstok (Transwab®).

De steriele wattenstokken zijn ingezet op een bloedplaat (COS) en overnacht aëroob geïncubeerd bij 35°C. De geïsoleerde bacteriën zijn volgens de diagnostiekvoorschriften van het LMMI gedetermineerd. Ook op de KNO-afdeling en in de huisartsenpost zijn, voor zover mogelijk, dezelfde afstrijken afgenomen.

3.2.2. Vragenlijst.

Aan de aanwezige huisartsen en doktersassistenten werden enkele vragen gesteld over het gebruik en het reinigen van het instrumentarium (zie bijlage 1). Deze zelfde vragen zijn gesteld op de KNO-afdeling en in de huisartsenpost.

3.3. Genotypering en epidemiologie.

3.3.1. Isolaten gebruikt voor typering met behulp van Diversilab®.

Wanneer er uit de kweken van de bezochte praktijk een *Pseudomonas aeruginosa* werd geïsoleerd, werd dit isolaat samen met de bewaarde isolaten afkomstig van patiënten uit deze praktijk, in duplo getypeerd. Hierbij is gebruik gemaakt van één *Pseudomonas aeruginosa* isolaat per patiënt. Wanneer met behulp van het Diversilab® typeringssysteem een overeenkomst tussen isolaten werd gevonden, werden de isolaten opgestuurd naar de afdeling Moleculaire Epidemiologie van het VUMC Amsterdam. Hier is een AFLP-typering uitgevoerd ter bevestiging.

3.3.2. Achtergrond patiënten en frequentie van otitis na lavage.

Om na te gaan of er daadwerkelijk sprake kan zijn van overdracht via instrumentarium naar de patiënt is aan de 17 huisartspraktijken gevraagd om na te gaan of er bij de patiënten met een otitis externa, die betrokken zijn in dit onderzoek, sprake is geweest van een cerumenlavage tot twee maanden voorafgaand aan de infectie.

Om inzicht te krijgen in hoe vaak het voorkomt dat na cerumenlavage een otitis optreedt, is gevraagd na te gaan of van de eerste vijf patiënten die dit jaar (2011) een cerumenlavage ondergingen, patiënten zijn teruggekomen met otitis verschijnselen.

3.4. Typering met behulp van Diversilab®.

3.4.1. Benodigdheden extractie en typering.

Materiaal en apparatuur

- Eppendorf® pipetten 1000 µl, 200 µl, 100 µl, 10 µl.
- 1 µl Wegwerpöses
- Vortex
- Eppendorf® centrifuge
- 2 ml Eppendorfvaatje
- 0,2 ml Eppendorf strip (8 cupjes)
- Agilent® 2100 bioanalyser
- ABI 2720 Thermal cycler
- Agilent® priming station

Reagentia

- DNA isolation kit van Mo Bio laboratories Inc.
- Diversilab® *Pseudomonas* kit
- Amplitaq DNA polymerase
- GeneAmp 10x PCR Buffer
- Diversilab® DNA reagents en supplies
- RNA/DNA vrij water

3.4.2. Extractie van DNA met behulp van kolomfiltering.

Pseudomonas aeruginosa-stammen die nodig zijn voor de extractie worden geënt op een bloedplaat (COS) en overnacht aëroob geïncubeerd bij 35°C. Voor extractie wordt gebruik

gemaakt van de Ultraclean® Microbial DNA isolation kit van Mo Bio Laboratories Inc. Na incubatie wordt de stam gesuspenderd in 300 µl Microbead-oplossing in een Microbead-epje met behulp van een wegwerpöse van 1 µl. Met deze öse worden twee oogjes vol gesuspenderd in de Microbead oplossing, waarna 50 µl MD1 oplossing wordt toegevoegd. Na het toevoegen van MD1 oplossing worden de epjes gedurende 10 minuten gevortext bij maximale snelheid. Vervolgens worden de Microbead epjes gedurende een halve minuut gecentrifugeerd bij 10.000 RCF. Door het centrifugeren zullen de celresten zich tot een pellet vormen. Het supernatant wordt afgepipetteerd en wordt toegevoegd aan 100 µl MD2 oplossing in een schoon 2 ml epje. Dit epje wordt kort gevortext en vervolgens gedurende minimaal 15 minuten bij 4°C geïncubeerd. Na incubatie worden de epjes gecentrifugeerd gedurende 1 minuut bij 10.000 RCF. Het supernatant wordt afgepipetteerd en overgebracht in een schoon 2 ml epje met 450 µl MD3 oplossing. Het epje wordt kort gevortext. De oplossing wordt overgepipetteerd in een spinfilter epje dat een silica membraan bevat. Het spinfilter epje wordt gecentrifugeerd gedurende 30 seconden bij 10.000 RCF. Het filtraat wordt vervolgens weggegooid. Op het filter wordt 300 µl MD4 oplossing gepipetteerd en het epje wordt weer gedurende 30 seconden bij 10.000 RCF gecentrifugeerd. Na het weggooien van het filtraat wordt het epje nog eens gedurende 1 minuut gecentrifugeerd bij 10.000 RCF om er zeker van te zijn dat alle ethanol resten (MD4) zijn verwijderd, daar deze de PCR reactie kunnen beïnvloeden. Het filter wordt in een schoon epje geplaatst. Op het filter wordt 50 µl MD5 oplossing gepipetteerd, en het epje wordt afgedraaid gedurende 30 seconden bij 10.000 RCF. Onder in het epje bevindt zich het geïsoleerde DNA. Het filter wordt weggegooid. Het geïsoleerde DNA kan worden bewaard bij -20°C of direct verder gebruikt worden voor amplificatie.

3.4.3. Rep-PCR.

Het maken van de master mix gebeurt met behulp van de Diversilab® *Pseudomonas* kit. In deze kit zitten de primer Mix (Tris EDTA met Oligonucleotide (N/A)) en de rep-PCR MM1 (nucleotiden, MgCl₂ en DNA/RNA vrij water)²⁹. Verder zijn nodig AmpliTaq DNA polymerase en GeneAmp 10x PCR Buffer. GeneAmp 10x PCR Buffer is een oplossing van 15mM MgCl₂. Wanneer deze oplossing 1:10 wordt verdund in de master mix, wordt er voor gezorgd dat de optimale pH voor het gebruik van AmpliTaq® DNA polymerase wordt bereikt.³⁰ AmpliTaq® DNA polymerase is een 94 kDa groot polymerase verkregen door het tot expressie brengen van het *Thermus aquaticus* Taq polymerase gen in een *E. coli*. Dit AmpliTaq® DNA polymerase is zeer geschikt omdat het optimaal actief is bij de annealing temperatuur van de PCR (55°C-75°C)³¹ De master mix wordt gemaakt in een 2 ml epje (tabel 4).

Tabel 4; Aantal µl reagentia nodig per monster voor een mastermix.

µl per monster	reagentia
18.0	rep-PCR MM1
2.5	GeneAmp 10X PCR buffer
2.0	Primer Mix
0.5	AmpliTaq® DNA Polymerase*
Totaal = 23.0	

*AmpliTaq dient als laatste toegevoegd te worden, en moet koud bewaard blijven tot gebruik.

Voor het in pipetteren van de rep-PCR wordt 23 μ l master mix en 2 μ l geïsoleerd DNA in een cupje van een 0,2 ml eppendorf strip gepipetteerd. De cupjes met de mix dienen koud bewaard te blijven tot dat ze in de ABI 2720 thermal cycler geplaatst worden omdat de AmpliTaq koud moet blijven tot dat de reactie begint. Op de ABI 2720 thermal cycler dient het juiste programma ingesteld te worden, zie tabel 3.

3.4.4. Gel-elektroforese.

Voor het uitvoeren van de gel-elektroforese met behulp van de Agilent®2100 bioanalyser wordt gebruik gemaakt van de Diversilab® DNA reagents en supplies kit. Deze kit wordt bewaard bij 4°C en moet voor gebruik eerst op kamertemperatuur komen. In deze kit zitten de reagentia voor het maken van de gel-dye, markers, DNA-ladder en de chips (chips worden bij kamertemperatuur bewaard).

De gel-dye wordt gemaakt voor 7 runs. Hierbij wordt 200 μ l gel + 10 μ l dye in een 1,5 ml epje gepipetteerd. Het epje wordt gevortext en de oplossing overgepipetteerd in een spinfilter epje, dit wordt gedurende 10 minuten bij 1500 x g gecentrifugeerd. Het epje wordt in aluminiumfolie gewikkeld om het te beschermen tegen licht. De gel-dye wordt bewaard bij 4°C. Er wordt 9 μ l gel-dye in het onderste G welletje met de zwarte cirkel gepipetteerd, met behulp van een priming station (figuur 9) wordt de gel-dye in de microkanalen van de chip gebracht. Gezorgd moet worden dat de spuit van het priming station op 1 ml staat en op de hoogste stand, dit om de juiste druk op de gel te zetten zodat deze in de microkanalen wordt verspreid. Het priming station wordt dichtgedrukt en de plunger van de spuit naar beneden gedrukt tot dat deze vast klikt. Na 30 seconden wordt de plunger weer los geklikt, deze komt rustig weer omhoog. Vervolgens wordt er 9 μ l gel-dye in de overige twee G welletjes gepipetteerd. Als volgt wordt er 5 μ l marker in alle 13 sample welletjes gepipetteerd en 1 μ l van het geamplificeerde DNA (het DNA moet een concentratie hebben van 25-50 ng/ μ l). De chip wordt gedurende 1 minuut bij 2400 rpm gevortext.



Figuur 9; priming station.

3.4.5. Agilent® 2100 bioanalyser.

De chip moet binnen vijf minuten in de Agilent® worden geplaatst, dit in verband met het indrogen van de gel bij een te lange tussentijd. In de Agilent® software wordt de juiste assay (Diversilab) gekozen en de elektroforese wordt gestart.

Na het gebruik van de Agilent®2100 bioanalyser dienen de elektroden schoongemaakt te worden met behulp van een schoonmaak chip. Deze chip wordt gevuld met RNA/DNA vrij water. De schoonmaak chip wordt gedurende een aantal minuten in de Agilent® geplaatst.

3.4.6. Inijken Diversilab.

In november 2010 is de Diversilab® *Pseudomonas* kit ingeijkt. Voor het inijken is gebruik gemaakt van de referentie stammen uit tabel 5. Van de vier referentie stammen is één ATCC-stam, de overige stammen kwamen uit rondzendingen ten behoeve van kwaliteitsbewaking (Neqas en SKML). Eén referentiestam was geen *Pseudomonas aeruginosa* maar *Pseudomonas cepacia* (*Burkholderia cepacia*). Alle stammen zijn in duplo vanuit het invriesbuisje gekweekt en getypeerd. *Pseudomonas cepacia* is in viervoud getest, twee aparte duplo's voor het testen van de reproduceerbaarheid.

Tabel 5; Stammen gebruikt voor het inijken van Diversilab® *Pseudomonas* kit.

Gebruikte stammen inijken	Soort
ATCC 27853	<i>P. aeruginosa</i>
Neqas 9758	<i>P. aeruginosa</i>
SKML 2008-3	<i>P. aeruginosa</i>
Rondzending nummer 57	<i>P. cepacia</i>

3.4.7. Onderscheidend vermogen van de Diversilab® *Pseudomonas* kit.

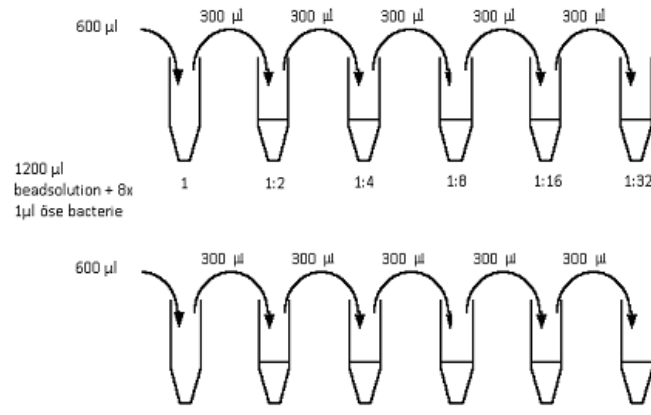
Om het onderscheidend vermogen van de Diversilab® *Pseudomonas* kit te testen zijn vijf verschillende soorten *Pseudomonas*-stammen (anders dan *Pseudomonas aeruginosa*) getypeerd (tabel 6).

Tabel 6; Extra *Pseudomonas*-stammen voor onderscheidend vermogen van de Diversilab® *Pseudomonas* kit.

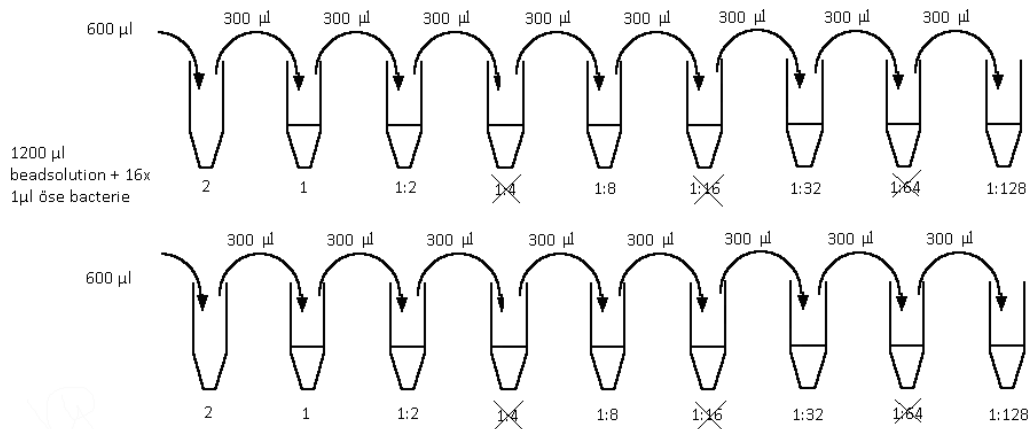
Extra <i>Pseudomonas</i> -stammen
<i>Pseudomonas cepacia</i>
<i>Pseudomonas putrefaciens</i>
<i>Pseudomonas putida</i>
<i>Pseudomonas stutzeri</i>
<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>

3.4.8. Verdunningsreeks.

Tijdens het analyseren van de resultaten van het vaststellen van het onderscheidend- en reproducerend vermogen van de *Pseudomonas* kit, werd geconstateerd dat sommige stammen een verschil in bandenpatroon lieten zien in een duplo uitvoering. Een verschil was zichtbaar zowel in de intensiteit als in de aan of afwezigheid van een bandje. Om na te gaan of het verschil zat in DNA input is een verdunningsreeks in duplo gemaakt van de twee stammen die het grootste verschil in bandenpatroon gaven, namelijk *Pseudomonas cepacia* en *Pseudomonas putrefaciens*. Hierbij is een verdunningsreeks gemaakt met tweevoudige verdunningsstappen beginnend vanuit een onverdunde oplossing (de normale hoeveelheid DNA input van 2x 1 µl öse bacterie in 300 µl beadsolution) tot een verdunning van 1:32 (figuur 10). Vervolgens is met twee verschillende *Pseudomonas aeruginosa*-stammen (omdat deze stabiel lijken in eerdere runs) opnieuw een verdunningsreeks uitgevoerd met grotere verdunningsstappen (figuur 11) van 2x de normale hoeveelheid tot een verdunning van 1:128.



Figuur 10; eerste verdunningsreeks in duplo.



Figuur 11; tweede verdunningsreeks in duplo (1:4, 1:16 en 1:64 niet meegenomen in typering).

3.4.9. Wanneer worden isolaten als identiek beschouwd.

Aan de hand van de ATCC vergelijking is een afkapwaarde van 95% vastgesteld. Wanneer twee isolaten een overeenkomst hebben van >95% worden deze isolaten als identiek beschouwd. Wel wordt op het oog naar het bandenpatroon gekeken, wanneer het bandenpatroon niet overeenkomt kan de stam alsnog als niet identiek beschouwd worden. Bij twijfel kan gebruik gemaakt worden van een overlay die gemaakt kan worden met de Diversilab® software.

3.5. AFLP VUMC.

Stammen die met de Diversilab® typering overeenkomen worden opgestuurd naar de afdeling Moleculaire Epidemiologie van het VUMC. Op deze afdeling wordt gebruik gemaakt van de volgende primers, adapters en restrictie enzymen voor AFLP typering

Primers

Eco-0 FAM
Mse-C

GAC TGC GTA CCA ATT C
GAT GAG TCC TGA GTA AC

Adaptors	Mse ad1	GAC GAT GAG TCC TGA G
	Mse ad2	TAC TCA GGA CTC ATC
	Eco ad2	AAT TGG TAC GCA GTC TAC
	Eco ad1	CTC GTA GAC TGC GTA CC
Restrictie enzymen	<i>EcoR1</i>	G/AATTC
	<i>MseI</i>	T/TAA

Voor de interpretatie van de AFLP-resultaten wordt op de afdeling Moleculaire Epidemiologie van het VUMC een afkapwaarde gebruikt van 85%, gebaseerd op de validatie van de typering. Isolaten die een overeenkomst vertonen $\geq 85\%$ worden als identiek beschouwd. Isolaten voor AFLP krijgen een uniek TY nummer.

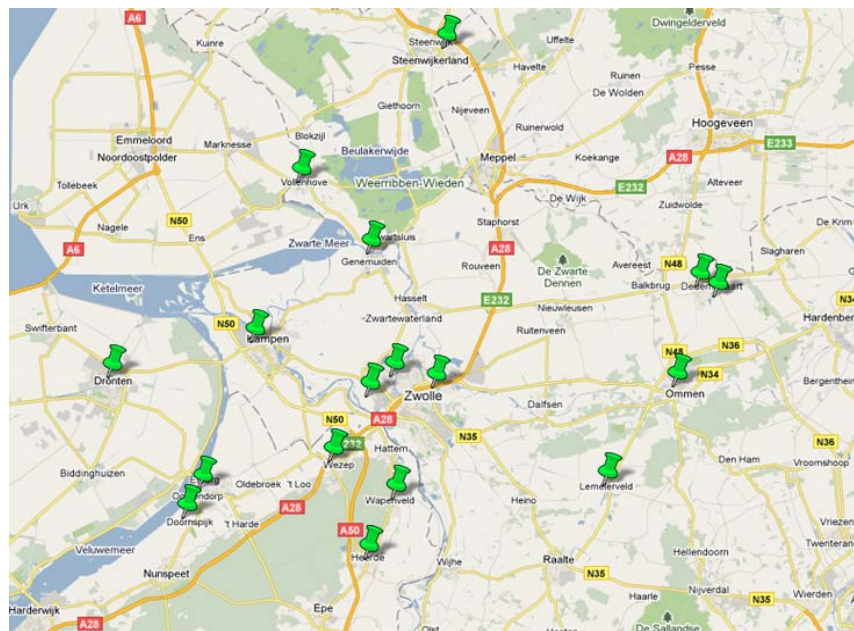
4. Resultaten

4.1. Verzamelen *Pseudomonas aeruginosa*-isolaten uit oorkweken.

Vanaf januari 2010 tot en met februari 2011 zijn 259 *Pseudomonas aeruginosa*-isolaten uit oorkweken bewaard, waarvan 132 isolaten van patiënten uit huisartspraktijken, 118 isolaten van patiënten van de KNO afdeling en negen overige ongerelateerde isolaten (ingestuurd vanaf andere afdelingen binnen de Isala klinieken).

4.2. Bezoek aan huisartspraktijken, KNO-afdeling en de huisartsenpost.

Naast de KNO-afdeling en de huisartsenpost zijn in totaal 17 huisartspraktijken in de regio bezocht, zie figuur 12.



Figuur 12; Regio Zwolle met alle bezochte huisartspraktijken.

4.2.1. Kweken afgenomen van instrumentarium.

In de huisartspraktijken waren verschillende soorten oorspuiten aanwezig.

A= Hand oorspuit met of zonder spatscherm achter de punt en met of zonder slang. De spuit vult zich automatisch wanneer de slang in het water wordt gelegd (figuur 13 en 14).



Figuur 13; Metalen hand oorspuit.



Figuur 14; Hand oorspuit met slang en spatscherm.

B= Elektrische oorspuit, deze elektrische oorspuiten hebben een pulserende waterstraal met regelbare druk. De spuit is aangesloten op een waterbakje waar het water automatisch uit wordt opgezogen (figuur 15).



Figuur 15; Elektrische oorspuit.

C= 100cc Plastic spuit. Deze disposable 100cc plasticspuit zijn we in één praktijk tegen gekomen. Op de punt van de plastic spuit werd de punt van een metalen oorspuit gezet (figuur 16).



Figuur 16; 100cc Plastic spuit.

In de 17 bezochte huisartspraktijken, de KNO afdeling en de huisartsenpost zijn afstrijken afgenomen van het instrumentarium dat gebruikt wordt bij het bekijken en uitspuiten van oren. In totaal zijn er 191 afstrijken afgenomen. Over het algemeen ging het hierbij om een afstrijk van

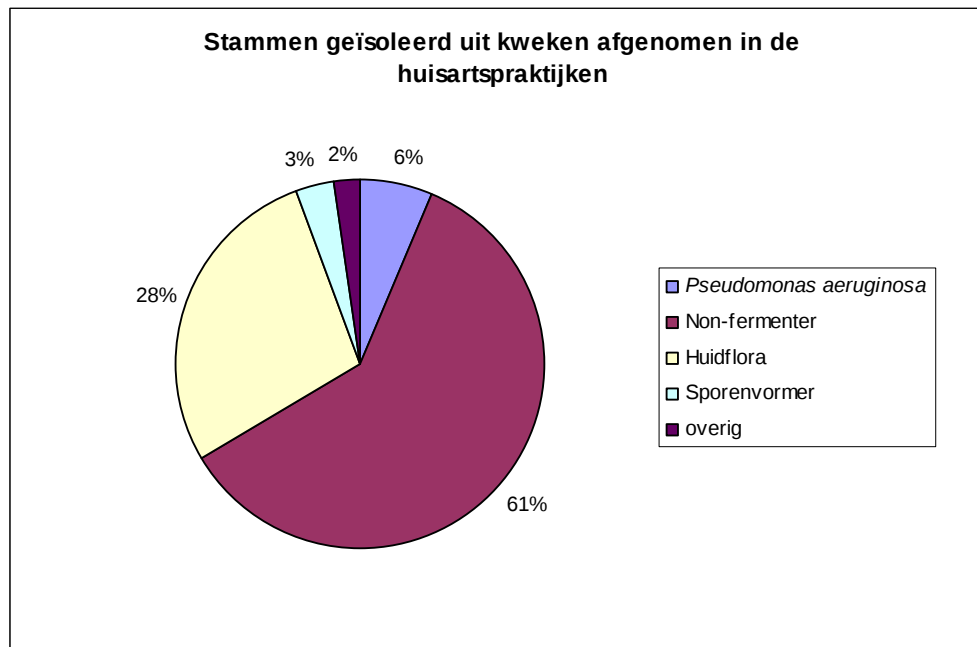
- de punt van de otoscoop (figuur 17).
- de punt van de oorspuit.
- de binnenkant van de oorspuit.
- het waterbakje waar schoon water uit wordt opgezogen.
- de afwasborstel waar het instrumentarium mee schoongemaakt wordt.



Figuur 17; otoscoop met disposable punt.

In totaal zijn 214 stammen geïsoleerd (figuur 18), meest non-fermenters (61%) en bacteriën behorend tot de huidflora (28%). Verder zijn sporenvormende Gram-positieve staven (3%) en een enkele gist, schimmel en bacteriën behorend tot de *Enterobacteriaceae* geïsoleerd (overig 2%). In acht van de 17 huisartspraktijken zijn één of meerdere *Pseudomonas aeruginosa*-isolaten geïsoleerd (6%). Een totaal overzicht van alle geïsoleerde isolaten is bijgevoegd als

bijlage 3. Alle bezochte huisartspraktijken, de KNO afdeling en de huisartsenpost hebben een rapport ontvangen met de resultaten van de afstrijken die bij hen zijn afgenomen.



Figuur 18; Stammen geïsoleerd uit kweken afgenomen in de huisartspraktijken.

4.2.2. Vragenlijst.

Tijdens het doornemen van de vragenlijst viel een aantal dingen op.

- Doktersassistentes zijn over het algemeen verantwoordelijk voor het uitspuiten van de oren.
- Door de doktersassistentes wordt over het algemeen geen rekening gehouden met de volgorde waarop de oren worden bekeken. Vaak kijken de assistentes eerst in het oor met klachten en vervolgens ter vergelijking in het oor zonder klachten. Door de huisartsen wordt hier over het algemeen wel rekening mee gehouden.
- In veel praktijken wordt er gekozen voor het schoonmaken en hergebruiken van disposable opzet puntjes voor otoscopen. Deze puntjes worden vaak huishoudelijk gereinigd.
- In veel praktijken blijkt dat er één van de volgende schoonmaakmiddelen wordt gebruikt bij het reinigen van de oorspuiten: Hibicet of Dettol.
- In alle praktijken is een autoclaaf aanwezig. Deze wordt echter zelden gebruikt voor het steriliseren van de oorspuit.
- In de meeste praktijken is men niet bekend met de WIP richtlijnen.
- Een aantal huisartsen zegt dat het wel eens voorkomt dat patiënten terugkomen met een infectie na het uitspuiten van de oren.

In bijlage 7 is een overzicht opgenomen met alle vragen en antwoorden uit de bezochte huisartspraktijken, de KNO afdeling en de huisartsenpost.

4.2.3. KNO afdeling en de Huisartsenpost.

Op de KNO afdeling blijkt dat er geen gebruik wordt gemaakt van een oorspuit. Hier wordt gebruik gemaakt van een KNO unit met uitzuigsysteem (figuur 19). Het puntje van het uitzuigsysteem wordt na iedere patiënt gesteriliseerd op de Centrale Sterilisatie Afdeling (CSA) van de Isala klinieken. De slangen van het uitzuigsysteem worden tussen de behandelingen door of aan het eind van een spreekuur doorgezogen met behulp van het doorspoelsysteem van de unit. Tussen de middag en aan het eind van de dag gaan de units uit in verband met de zelfreinigende werking.



Figuur 19; KNO unit met o.a. uitzuigapparatuur en otoscoop.

Bij het bezoek aan de huisartsenpost bleek dat men hier niet tot nauwelijks gebruik maakt van de oorspuit. Het uitspuiten van oren wordt niet beschouwd als spoedeisend, patiënten die hiervoor op de huisartsenpost komen worden over het algemeen doorgestuurd naar hun eigen huisarts. Op de KNO afdeling en in de huisartsenpost zijn de volgende afstrijken afgenomen:

Tabel 7; afstrijk KNO-afdeling.

Afstrijk	Resultaat kweek
Otoscoop 1	1 kolonie <i>Bacillus firmus</i>
Otoscoop 2	geen micro-organismen aangetoond
Otoscoop 3	geen micro-organismen aangetoond
Uitzuigmateriaal gesteriliseerd	geen micro-organismen aangetoond

Tabel 8; afstrijk Huisartsenpost.

Afstrijk	Resultaat kweek
Punt spuit	geen micro-organismen aangetoond
Achterkant binnenkant spuit	geen micro-organismen aangetoond
Schacht binnenkant spuit	geen micro-organismen aangetoond
Otoscoop	geen micro-organismen aangetoond
Afwasborstel	geen micro-organismen aangetoond
Schoon water bakje	geen micro-organismen aangetoond

4.3. Genotypering en epidemiologie.

4.3.1 Isolaten gebruikt voor typering met behulp van Diversilab®.

In acht van de 17 praktijken is een *Pseudomonas aeruginosa* geïsoleerd uit de afstrijken. Deze isolaten zijn samen met de isolaten van de patiënten uit deze praktijk getypeerd. Zie tabel 9 voor een overzicht per praktijk.

Tabel 9; *Pseudomonas aeruginosa* isolaten getypeerd met behulp van Diversilab®.

Praktijk	Materiaal waaruit <i>P. aeruginosa</i> werd geïsoleerd	Aantal patiënten waarvan isolaten zijn getypeerd
1	Rand binnenkant oorspuit	4
3	Binnenkant waterreservoir	8
	Rubberrand binnenkant oorspuit	
	Punt oorspuit	
4	Water binnenkant oorspuit	3
	Binnenkant plastic 100cc oorspuit	
5	Binnenkant oorspuit	2
7	Waterslang oorspuit	6
	Binnenkant waterreservoir	
11	Rubberrand oorspuit	4
	Water uit oorspuit	
14	Binnenkant oorspuit	5
16	Schacht achterkant oorspuit	4
	Punt otoscoop	

4.3.2. Achtergrond patiënten en frequentie van otitis na cerumenlavage.

Van de 17 praktijken hebben uiteindelijk 13 praktijken meegewerkt aan dit onderdeel van het onderzoek. Deze 13 praktijken hebben gegevens opgezocht van, in totaal 55, patiënten die betrokken zijn bij dit onderzoek. Hieruit blijkt dat 11 van de 55 patiënten een cerumenlavage hebben gehad in de twee maanden voorafgaand aan de infectie. Van deze 11 patiënten is bij drie patiënten een mogelijke besmettingsbron bekend, twee keer zwemmen in oppervlaktewater en één keer mastoïdectomie ten gevolge van otitiden in 1970. Onder deze 11 patiënten zijn twee patiënten (zonder bekende besmettingsbron) waarvan we met Diversilab® en AFLP hebben aangetoond dat de stammen geïsoleerd uit het oor overeenkomen met de stammen die geïsoleerd zijn uit de oorspuiten (patiënt 101021-0181 uit praktijk 7 en patiënt 100605-0087 uit praktijk 14). Beide patiënten kwamen binnen twee weken terug met otitis klachten.

Verder hebben we gevraagd aan de praktijken om na te gaan of de eerste vijf patiënten, die dit jaar een cerumenlavage hebben gehad, terug zijn gekomen met een infectie wijzende op een otitis externa. In alle 13 praktijken blijkt dit niet het geval te zijn. Niet één van de eerste vijf patiënten die dit jaar een cerumenlavage hebben gehad is teruggekomen met otitis verschijnselen.

4.4. Typering met behulp van Diversilab®.

4.4.1. Inijken Diversilab.

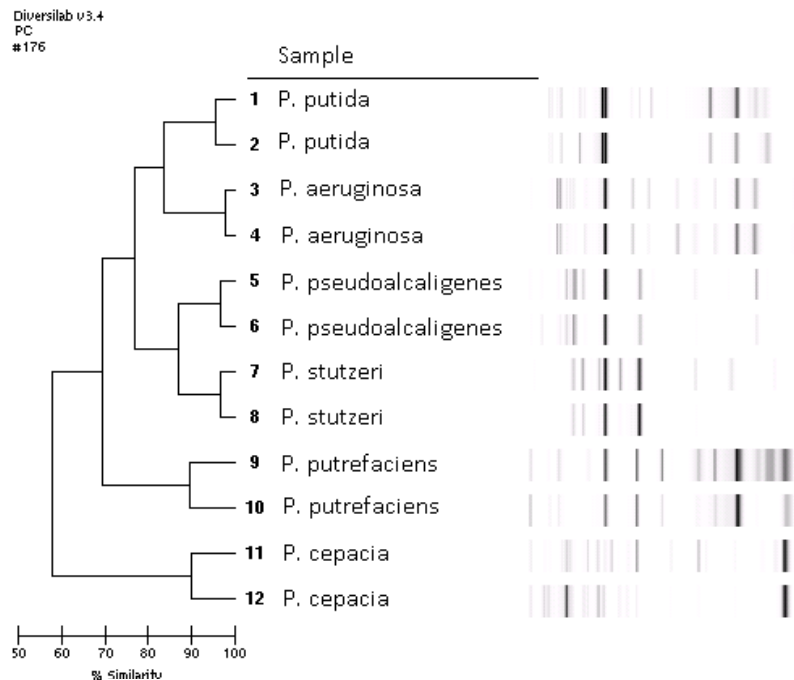
Bij het inijken van de Diversilab® kit zijn tussen de referentiestammen vier verschillende typen gevonden. *Pseudomonas cepacia* gaf een heel ander bandenpatroon dan *Pseudomonas aeruginosa*. Zie tabel 10 en bijlage 2 voor het Dendrogram.

Tabel 10; Inijken Diversilab®

Geteste stammen	Overeenkomst
ATCC 27853 (<i>P. aeruginosa</i>)	Geen overeenkomst met overige stammen
SKML 2007-5 (<i>P. aeruginosa</i>)	Geen overeenkomst met overige stammen
Neqas 2384 (<i>P. aeruginosa</i>)	Geen overeenkomst met overige stammen
Rondzending nummer 57 (<i>P. cepacia</i>)	Geen overeenkomst met overige stammen

4.4.2. Onderscheidend vermogen van de Diversilab® *Pseudomonas* kit.

Uit deze test blijkt dat het onderscheidende vermogen van de kit goed is. De *Pseudomonas aeruginosa*-stammen clusteren samen en de andere soorten *Pseudomonas*-stammen clusteren per duplo samen. Wel blijkt er tussen de duplo-stammen enig verschil in het bandenpatroon, zie figuur 20.



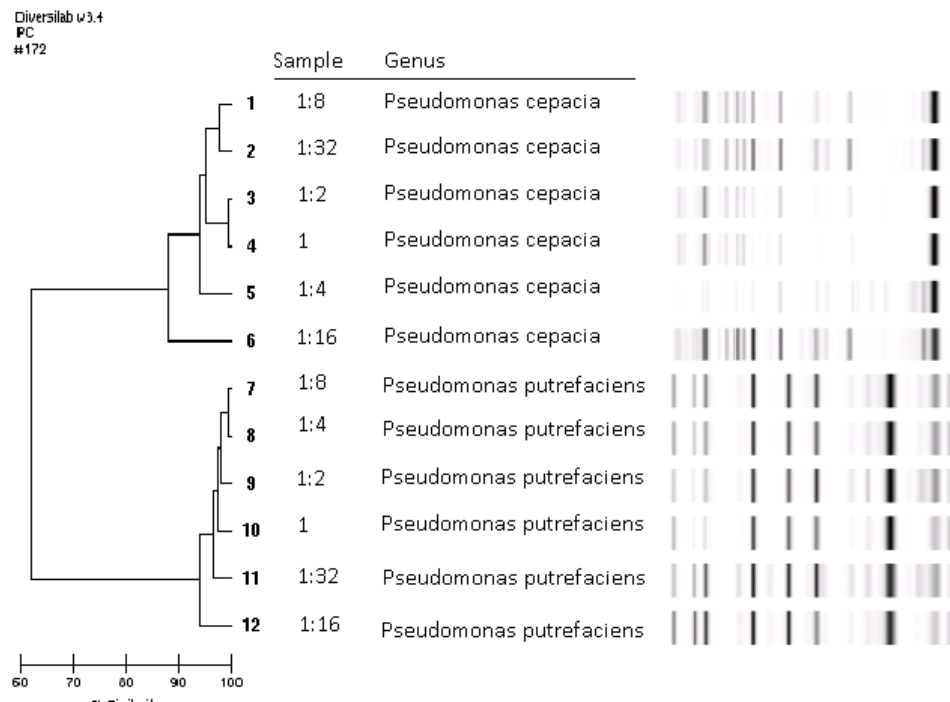
Figuur 20; Onderscheidend vermogen Diversilab® *Pseudomonas* kit.

4.4.3. Verdunningsreeks.

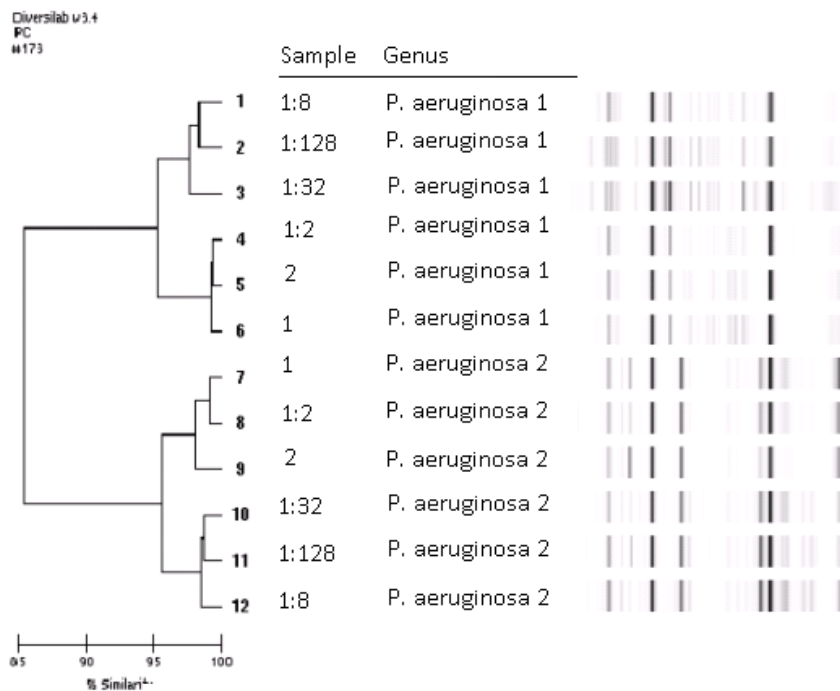
In de eerste verdunningsreeks, van onverdund tot 1:32 met *Pseudomonas cepacia* en *Pseudomonas putrefaciens*, was de verdunning nauwelijks terug te zien. Wel is te zien dat de reproduceerbaarheid van deze twee stammen niet optimaal is zie figuur 21 (evenals bleek uit de duplo's in figuur 20).

Ook in de tweede verdunningsreeks, van twee keer de normale hoeveelheid tot 1:128 met twee verschillende *Pseudomonas aeruginosa*-stammen, is nauwelijks een verdunning terug te zien (figuur 22).

Hieruit is geconcludeerd dat de hoeveelheid DNA niet bepalend is voor het verschil in bandenpatroon en intensiteit. Wel werd vastgesteld dat de *Pseudomonas*-stammen variabel kunnen zijn in hun bandenpatroon. Hierop is besloten de rest van de stammen met de normale volgens Diversilab® voorgeschreven hoeveelheid DNA te typeren.



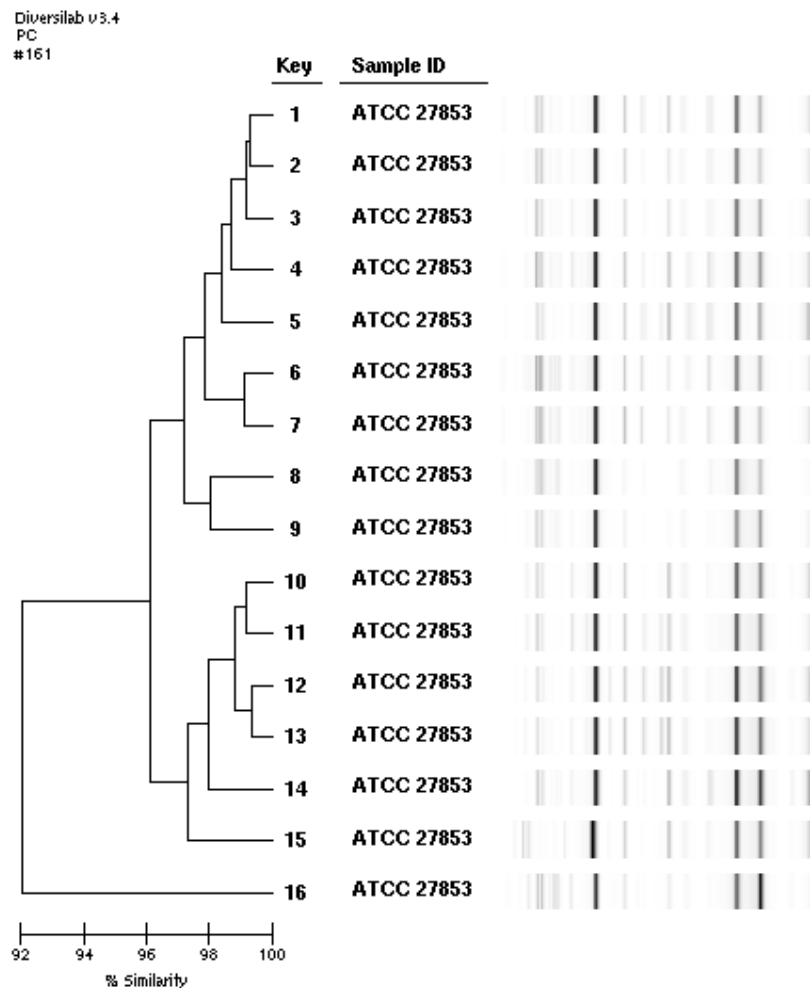
Figuur 21; Dendrogram Diversilab® typering eerste verdunningsreeks.



Figuur 22; Dendrogram Diversilab® typing tweede verdunningsreeks.

4.4.4. ATCC vergelijking.

Bij elke extractie/typering run wordt een *Pseudomonas aeruginosa* ATCC-stam meegetypeerd. In figuur 23 is te zien dat er tussen de ATCC-stammen een verschil is te zien in het bandenpatroon. Zowel in de intensiteit als in de aan of afwezigheid van bandjes in het patroon. Hieruit wordt wederom geconcludeerd dat de reproduceerbaarheid van *Pseudomonas*-stammen niet optimaal is.



Figuur 23; Dendrogram typering Diversilab® ATCC-stammen.

4.4.5. Resultaten Diversilab®.

De *Pseudomonas aeruginosa*-isolaten die geïsoleerd zijn uit het instrumentarium van de acht huisartspraktijken zijn samen met de patiënten uit de praktijk met behulp van Diversilab® in duplo getypeerd.

In vier van de acht praktijken is een overeenkomst gevonden tussen isolaten. Dit betreft een overeenkomst tussen patiënt en patiënt en/of tussen spuit en patiënt, tabel 11.

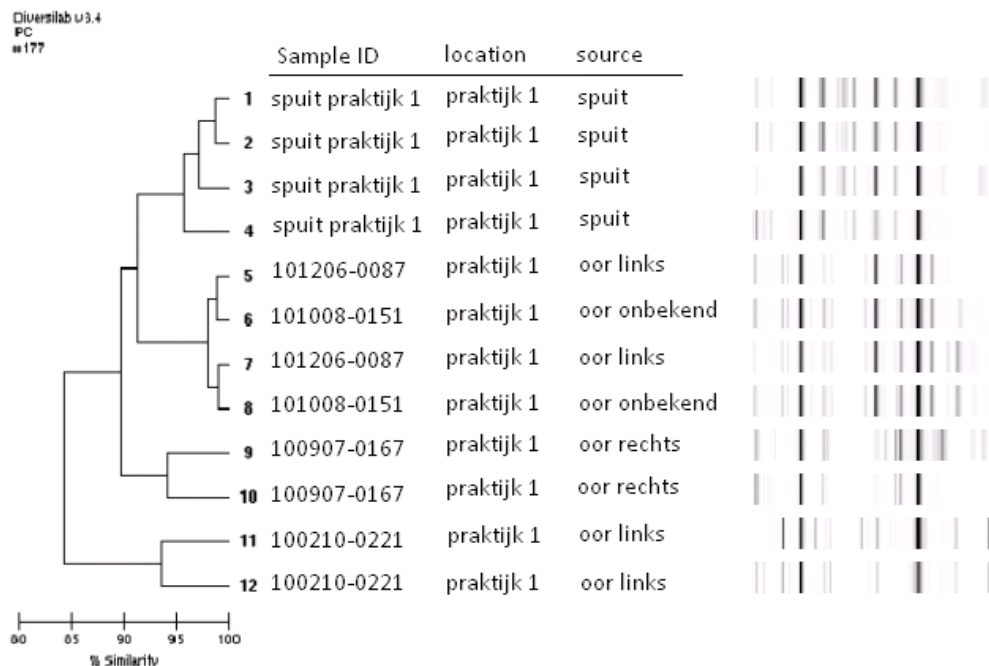
Tabel 11; Overeenkomsten gevonden tussen spuit/patiënt en/of patiënt/patiënt

Praktijk	Overeenkomst
1	patiënt 101008-0151 en 101206-0087
3	patiënt 100921-0133, 100626-0071, 101208-0141 en 100717-0073
3	spuit praktijk 3 (3x) en patiënt 100519-0077
7	spuit praktijk 7 en patiënt 101021-0181
14	spuit en patiënt 100605-0087 en (mogelijk) patiënt 100412-0211

Hieronder zijn de resultaten uit praktijk 1 (met overeenkomst) en praktijk 4 (zonder overeenkomst) weergegeven, de rest van de Diversilab® resultaten is weergegeven in bijlage 4.

4.4.5.1. Resultaten typering Diversilab® praktijk 1.

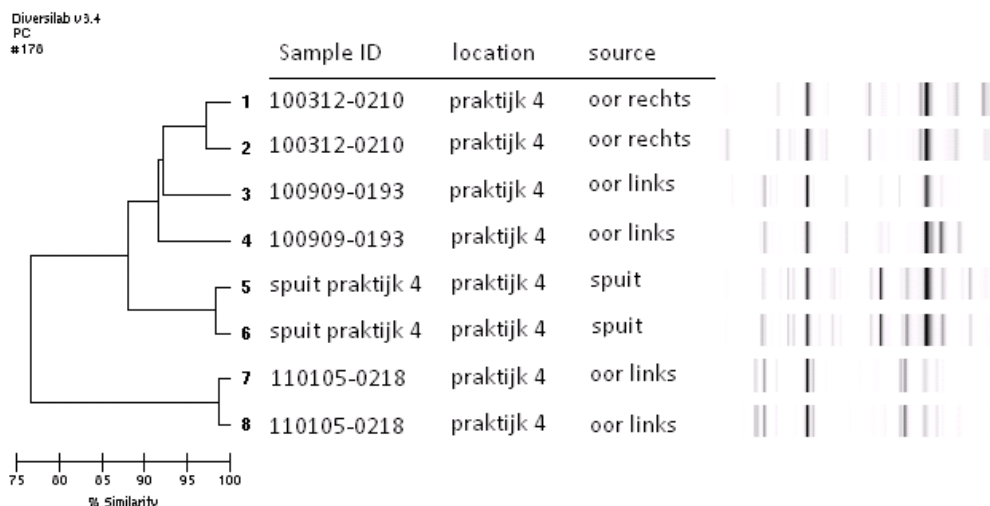
Overeenkomst tussen twee patiënten. 101008-0151 en 101206-0087.



Figuur 24; Dendrogram typering Diversilab® praktijk 1.

4.4.5.2. Resultaten typering Diversilab® praktijk 4.

Geen overeenkomst gevonden tussen verschillende patiënten of tussen spuit en patiënt.

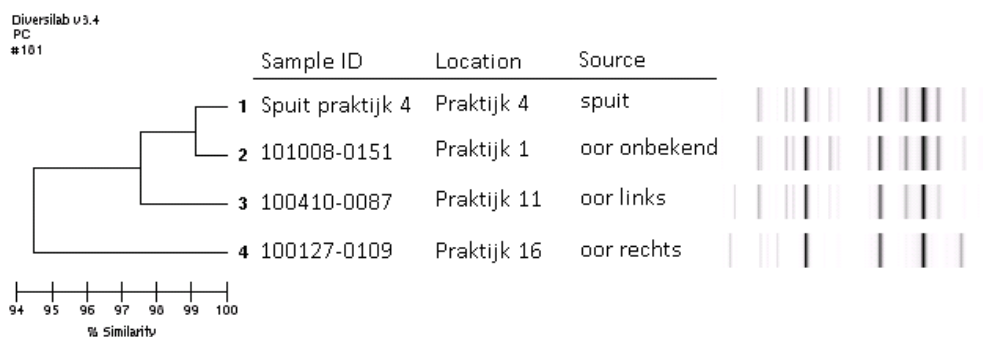


Figuur 25; Dendrogram typering Diversilab® praktijk 4.

4.4.6. Overeenkomst tussen verschillende praktijken.

Wanneer alle Diversilab® resultaten in één dendrogram geplaatst worden, blijkt dat er een mogelijke overeenkomst is tussen isolaten uit verschillende praktijken.

Isolaten uit praktijk 1 (101008-0151), 4 (spuit), 11 (100410-0087) en 16 (100127-0109) lijken overeen te komen.



Figuur 26; Overeenkomst tussen verschillende praktijken.

4.5. AFLP VUMC.

Naar aanleiding van de typeringsresultaten zijn alle isolaten met een overeenkomst volgens Diversilab® opgestuurd naar de afdeling Moleculaire Epidemiologie van het VUMC voor AFLP typering.

4.5.1. AFLP Resultaten.

Met behulp van AFLP typering zijn de volgende overeenkomsten gevonden, zie tabel 12. In bijlage 5 zijn de AFLP resultaten opgenomen.

Isolaten uit praktijk 1 (101008-0151), 4 (spuit), 11 (100410-0087) en 16 (100127-0109) zijn opgestuurd vanwege een overeenkomst tussen verschillende praktijken aan de hand van de Diversilab® resultaten. Met behulp van AFLP is tussen deze isolaten geen overeenkomst gevonden.

Tabel 12; Overeenkomsten gevonden met AFLP tussen spuit/patiënt en/of patiënt/patiënt

Praktijk	Overeenkomst
1	patiënt 101008-0151 (TY 8286) en 101206-0087 (TY8287)
3	patiënt 100921-0133 (TY 8289), 100626-0071 (TY 8288) en 100717-0073 (TY 8389)
3	spuit (TY 8284, 8285, 8283) en patiënt 100519-0077
7	spuit (TY 8293) en patiënt 101021-0181 (TY8294)
14	spuit (TY 8373) en patiënt 100605-0087 (TY 8374)

4.5.2. Reproduceerbaarheid AFLP.

Omdat AFLP niet in Zwolle werd uitgevoerd en daardoor de reproduceerbaarheid van de methode onbekend, is isolaat 100921-0133 twee keer opgestuurd onder een andere naam voor het testen van de reproduceerbaarheid (100921-0133 en patiënt praktijk 3). De isolaten kunnen echter niet goed met elkaar vergeleken worden omdat ze niet in de zelfde run zijn gedraaid. De test blijkt dus niet erg reproduceerbaar.

4.6. Adviezen en aanbevelingen.

Aan de hand van onze constatering en resultaten uit de huisartspraktijken zijn in samenwerking met de afdeling Hygiëne en Infectiepreventie van de Isala klinieken adviezen en aanbevelingen opgesteld voor de huisartspraktijken. In deze adviezen en aanbevelingen wordt uitgelegd wat er verbeterd kan worden met betrekking tot de schoonmaak van het instrumentarium en het voorkomen van overdracht van micro-organismen. Deze aanbevelingen zijn opgenomen in bijlage 6.

4.7. Samenvatting resultaten.

Tabel 13; Aantal isolaten verzameld uit oorkweken tussen februari 2010 t/m januari 2011.

	N	(%)
Huisartspraktijken	132	(51)
KNO-afdeling	118	(46)
Overig	9	(3)
Totaal	259	(100)

<i>Tabel 14; Huisartspraktijken bezocht + KNO-afdeling en Huisartsenpost.</i>		N
Totaal aantal huisartspraktijken		17
Afstrijken afgenomen van instrumentarium		191
Totaal aantal isolaten incl. <i>P.aeruginosa</i>		214
Isolaten Huisartspraktijken		213
Isolaten KNO-afdeling		1
Isolaten Huisartsenpost		0
Aantal huisartspraktijken		17
Aantal praktijken met <i>P. aeruginosa</i>		8 (8/17; 47%)
Aantal patiënten		36
Aantal praktijken met overeenkomst		4 (4/8; 50%)
Overeenkomst tussen spuit en één patiënt		3 (3/36; 8%)
Overeenkomst patiënt-patiënt		
Overeenkomst tussen twee patiënten		1
Overeenkomst tussen drie patiënten		1

<i>Tabel 15; Achtergrond patiënten verkregen uit dossieronderzoek.</i>		N
Aantal patiënten in onderzoek		55
Aantal patiënten met cerumenlavage <2 maand voor otitis		11 (11/55; 20%)
Aantal patiënten zonder bekende besmettingsbron		8
Overeenkomst spuit-patiënt aangetoond		2
Tijdsduur tussen lavage en infectie < 2 weken		2

5. Discussie

5.1. Eerder uitgevoerd onderzoek.

Vanuit een veterinaire praktijk is een onderzoek gepubliceerd, waaruit blijkt dat oorinstrumentarium ook na schoonmaak nog steeds gekoloniseerd is met onder andere *Pseudomonas aeruginosa*.³⁷ Over bacteriën op instrumentarium dat gebruikt wordt bij het uitspuiten van oren (oorspuiten en otoscopen) in een huisartsenpraktijk is voor zover nog niets bekend.

5.2. Verzamelen *Pseudomonas aeruginosa*-isolaten uit oorkweken.

Tijdens het verzamelen van de *Pseudomonas aeruginosa*-isolaten van patiënten zijn vaak meerdere isolaten van één patiënt bewaard. Het ging hierbij vaak om isolaten van zowel het linker als het rechter oor of isolaten met een verwaarloosbaar verschil in het antibioticaresistentie-patroon. Tijdens het typeren is gekozen voor het gebruik van één isolaat per patiënt.

5.3. Bezoek aan huisartsenpraktijken, KNO afdeling en de huisartsenpost.

5.3.1. Afstrijken afgenomen.

Bij het afnemen van afstrijken is per praktijk bekeken wat er aan instrumentarium gebruikt werd. Over het algemeen zijn er afstrijken afgenomen van het eerder genoemde instrumentarium. Wanneer er buiten dit genoemde instrumentarium gebruik werd gemaakt van andere materialen zijn ook hier afstrijken van afgenomen.

In de huisartspraktijken wordt gebruik gemaakt van verschillende oorspuiten. De ene oorspuit kan gemakkelijker uit elkaar worden gehaald voor het reinigen dan de andere oorspuit. Tijdens het isoleren van micro-organismen is geen verschil waargenomen tussen het aantal isolaten uit bijvoorbeeld een spuit die gemakkelijk uit elkaar te halen is en een spuit die minder gemakkelijk uit elkaar te halen is.

Vanuit praktijk 3 is na het bezoek, door de doktersassistente, nog een aantal afstrijken ingestuurd, afgenomen van instrumentarium dat tijdens het bezoek niet beschikbaar was.

Hiernaast is wederom een afstrijk afgenomen van de oorspuit waaruit eerder een *Pseudomonas aeruginosa* is geïsoleerd. Uit deze tweede kweek van de oorspuit is geen *Pseudomonas aeruginosa* geïsoleerd.

Nadien is er contact geweest met de praktijk over de reiniging van de oorspuit na het bezoek. Voor het bezoek werd de oorspuit alleen huishoudelijk gereinigd. Na het bezoek is de oorspuit huishoudelijk gereinigd en gesteriliseerd in de autoclaaf, wat resulteerde in een negatieve kweek.

In Bijlage 3 is weergegeven welke micro-organismen geïsoleerd zijn uit de kweken die zijn afgenomen van het instrumentarium in de praktijken. In deze lijst komen naast bacteriën behorend tot de huidflora ook een aantal mogelijke ziekteverwekkers voor zoals, *Escherichia coli*, *Candida parapsilosis*, *Staphylococcus aureus*, *Stenotrophomonas maltophilia* en andere *Pseudomonas* species dan *Pseudomonas aeruginosa*. Het is duidelijk dat deze species niet thuis

horen in een oorspuit, dit bevestigt wederom dat het instrumentarium beter gereinigd zou moeten worden.

5.3.2. KNO afdeling en de Huisartsenpost.

Op de KNO afdeling wordt gebruik gemaakt van een uitzuigstelsel in plaats van een oorspuit. Bij het gebruik van een uitzuigstelsel wordt er geen water in het oor van de patiënt gespoten waardoor er minder kans is op overdracht van micro-organismen door eventueel vervuild water (water raakt vervuild door een vieze oorspuit). Door het gebruik van water wordt de pH-waarde van het cerumen verhoogd waardoor bacteriën eerder in staat zijn om de uitwendige gehoorgang te koloniseren. Door het gebruik van een uitzuigstelsel blijft deze pH-waarde ongestoord.

Op de huisartsenpost is instrumentarium aanwezig dat door alle dienstdoende artsen op de post gebruikt wordt. Het is dus moeilijk na te gaan hoe er omgegaan wordt met de volgorde waarop de oren worden bekeken en hoe het instrumentarium wordt schoongemaakt. Wel is hier een protocol voor aanwezig. Het is niet na te gaan of patiënten die hier zijn geweest om hun oren uit te laten spuiten (wat maar zelden gebeurt) eventueel later klachten kregen van een otitis externa. Het instrumentarium dat we aantreffen in de huisartsenpost leek zo goed als ongebruikt.

Uit de afstrijken die zijn afgenomen van het instrumentarium op de KNO-afdeling en van het instrumentarium in de huisartsenpost, zijn (op één kolonie *Bacillus* na) geen micro-organismen geïsoleerd. Het blijkt dus dat met name de werkwijze, zoals op de KNO-afdeling wordt toegepast, een schonere manier van werken is.

5.3.3. Vragenlijst.

Tijdens de bezoeken zijn we overal zeer enthousiast en open ontvangen waardoor we een goede kijk hebben gekregen op het handelen in de huisartspraktijken met betrekking tot het gebruik van oorspuiten en otoscopen. De doktersassistentes die we gesproken hebben waren bereid er iets van te leren, en kwamen eigenlijk tijdens het gesprek al tot inzichten van dingen die eventueel beter konden in de praktijk. Tijdens het doornemen van de vragenlijst is een aantal dingen opgevallen, zoals weergegeven in de resultaten.

- Het blijkt dat de handeling van het uitspuiten wordt geleerd tijdens de opleiding tot doktersassistente, in de praktijk wordt de handeling van assistente op assistente doorgegeven. De handeling zelf wordt nooit gecontroleerd door een huisarts, alleen als er door de assistente een infectie wordt waargenomen komt de huisarts kijken of er wel uitgespoten mag worden of niet.
- De doktersassistente kijkt vaak eerst in het oor met klachten en later ter vergelijking in het andere oor (vaak) zonder klachten. Bij deze werkwijze bestaat de kans dat micro-organismen worden overgebracht van het ene naar het andere oor. Wat opvalt, is dat huisartsen hier over het algemeen wel rekening mee houden en er van uit gaan dat hun doktersassistentes dat ook doen.
- Disposable otoscoop puntjes worden vaak schoongemaakt en hergebruikt. Door eventuele beschadigingen kan niet worden gegarandeerd dat de puntjes na reiniging

vrij zijn van micro-organismen. Het is niet de bedoeling dat deze puntjes na reiniging worden hergebruikt.

- Dettol en Hibicet zijn schoonmaakmiddelen bedoeld voor desinfectie van de huid en niet voor de schoonmaak van instrumentarium.
- In veel praktijken is men niet bekend met de WIP richtlijnen die speciaal zijn opgesteld voor de huisartspraktijken, deze zijn meegenomen in de aanbevelingen om men hier attent op te maken.
- Opvallend is dat een aantal huisartsen zegt dat het vaker voorkomt dat patiënten na het uitspuiten last krijgen van een otitis externa. Over het algemeen is dit voorval niet bekend onder de huisartsen.

5.3.4. Achtergrond patiënten en frequentie van otitis na cerumenlavage.

Bij acht van de 11 patiënten die in de twee maanden voorafgaand aan de infectie een cerumenlavage hebben gehad is geen mogelijke besmettingsbron bekend. Het is dus mogelijk dat deze patiënten een otitis externa hebben ontwikkeld door een cerumenlavage met een besmette oorspuit. Dat bij twee patiënten, die in de twee maanden voorafgaand aan de infectie een cerumenlavage hebben gehad, dezelfde stam is geïsoleerd uit het oor als uit de oorspuit is opvallend (patiënt 101021-0181 uit praktijk 7 en patiënt 100605-0087 uit praktijk 14). De vraag is alleen of de patiënt de stam heeft opgelopen door de besmette oorspuit, of dat de oorspuit besmet is geraakt door het mogelijk geïnfecteerde oor van de patiënt, er zijn namelijk in dezelfde praktijken niet meer patiënten gevonden met dezelfde stam. Aangezien er tussen het constateren van de infectie bij patiënt 101021-0181 (oor 18-10-2010) en het afnemen van afstrijken van de oorspuit (oorspuit 23-2-2011) vier maanden zit, is het goed mogelijk dat dezelfde stam vaker is overgedragen van de spuit naar een patiënt. Ook bij patiënt 100605-0087 zit negen maanden tussen het afnemen van een uitstrijk uit het oor (04-06-2010) en het afnemen van de afstrijk van de oorspuit (09-03-2011). Dat wij deze stam niet vaker terug vinden bij meerdere patiënten is mogelijk te verklaren doordat er niet altijd een uitstrijk wordt afgenomen van het oor bij het zien van een otitis externa.

Opvallend is dat in alle 13 praktijken geen sprake is van patiënten die begin dit jaar een cerumenlavage hebben gehad en zijn terug gekomen met otitis verschijnselen. Het kan zijn dat de stam wel wordt overgedragen van de oorspuit naar de patiënt maar dat de patiënt voldoende weerstand heeft waardoor er geen infectie optreedt.

5.4. Typering met behulp van Diversilab®.

5.4.1. RAPD en Rep-PCR.

RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA) is een typeringstechniek die random sequenties amplificeert. Er wordt gebruik gemaakt van primers die ca. tien nucleotiden lang zijn. Wanneer de afstand tussen de forward- en de reverse-primer niet te groot is zal het stukje DNA geamplificeerd worden.³⁴

Rep-PCR is een opvolger van deze typeringstechniek. Rep-PCR is een verzamelnaam voor de oorspronkelijk ontwikkelde REP- BOX- en ERIC-PCR. REP, BOX en ERIC zijn repetitieve sequenties in het genoom van een bacterie. Deze techniek was oorspronkelijk bedoeld voor *Enterobacteriaceae*.³⁶ Later heeft men ontdekt dat ook bij andere bacteriën een bandenpatroon wordt gevormd wanneer gebruik wordt gemaakt van deze methode. Het

bandenpatroon is echter wat minder mooi dan bij de oorspronkelijke PCR omdat de sequenties niet volledig overeenkomen. Diversilab® heeft deze methode gebruikt bij het ontwikkelen van, onder andere, de *Pseudomonas* kit. Gedacht wordt dat de primers die hier in verwerkt zijn, ook gebaseerd zijn op BOX en ERIC sequenties, met enige aanpassingen voor de species.

5.4.2. Discriminerend vermogen Diversilab® *Pseudomonas* kit.

Het discriminerend vermogen van de Diversilab® *Pseudomonas* kit leek op het eerste gezicht goed te zijn. Tijdens het inzien werden vier verschillende bandenpatronen gevonden tussen de referentie stammen. Bij het testen van het onderscheidend vermogen, met meerdere *Pseudomonas* species, bleek dat de Diversilab® *Pseudomonas* kit wat problemen gaf, de duplo's kwamen niet geheel overeen. Er was verschil waar te nemen in de intensiteit en de aan- of afwezigheid van banden. Met de verdunningsreeks en de ATCC vergelijking werd dit wederom bevestigd. Een mogelijkheid voor deze verschillen in het bandenpatroon kan liggen aan een verschil in DNA input.

In de ATCC vergelijking is één monster dat onder de afkapwaarde van 95% valt. De run waaruit deze ATCC-stam komt is afgekeurd vanwege de lage overeenkomst. Overige runs zijn goedgekeurd als de ATCC-stam die meegetypeerd is een overeenkomst heeft van minimaal 95% vergeleken met de andere ATCC-stammen. Wel werd bij elk resultaat met het oog beoordeeld of het isolaat daadwerkelijk qua bandenpatroon overeenkwam. Soms kan het zijn dat er een percentage van >95% wordt berekend maar dat er op het oog toch een paar banden verschillen. Wanneer dit het geval was werd gebruik gemaakt van een zogehete overlay, die gemaakt kan worden met de Diversilab® software. In het piekenpatroon kan nauwkeuriger gekeken worden naar het verschil tussen twee isolaten dan in het bandenpatroon. In een overlay kan ook nauwkeuriger gekeken worden naar intensiteitsverschil, wanneer een band vaag is in het patroon en moeilijk te vergelijken kan in een overlay bepaald worden of de piek wel of niet opkomt. Komt deze wel op maar zwak dan zal de band dus lichter zijn in het patroon. Het blijkt dus belangrijk om zelf kritisch naar het bandenpatroon te blijven kijken.

5.4.3. Verdunningsreeks.

Naar aanleiding van de verschillen in de test voor het discriminerend vermogen is gekozen voor een verdunningsreeks om het verschil in DNA input te testen.

In de resultaten van de verdunningsreeks is nauwelijks terug te zien dat er een verdunning is gemaakt van de DNA input. Normaal gesproken zou er bij een hogere DNA input een duidelijker bandenpatroon ontstaan, de intensiteit van de banden zal hoger worden. Dit geldt echter tot een bepaald punt. Door een overmaat aan DNA zal de PCR reactie efficiëntie verliezen. Wanneer er teveel DNA aanwezig is hebben primers meer moeite met het vinden van de juiste sequentie, het DNA zal meer in elkaar gaan zitten.

Bij een lagere DNA input kunnen er meer bandjes verschijnen, de primers hebben meer mogelijkheid om specifiek te binden, de intensiteit van de bandjes zal dan lager zijn.

Aan de hand van de verdunningsreeks is besloten dat de volgens Diversilab® voorgeschreven DNA input het best mogelijke bandenpatroon geeft.

5.4.4. Literatuur over het discriminerend vermogen van het Diversilab® systeem.

Eind 2010 verscheen een artikel waarin wordt beschreven dat het discriminerend vermogen van de Diversilab® *Pseudomonas* kit onvoldoende is.³² In de beschreven studie zijn

Pseudomonas aeruginosa-stammen getypeerd met behulp van Diversilab® en vergeleken met MLST. Niet alle stammen die in Diversilab overeenkwamen komen overeen met MLST.

Door mutaties verandert het genoom van de bacterie. Met MLST wordt elke mutatie, in de bepaalde sequenties, waargenomen als een verschil. Met Diversilab® kan dit onderscheid niet gemaakt worden. Hier wordt alleen een verschil waargenomen als de mutatie zit in de primersequentie.³²

Volgens de onderzoekers van dit artikel is Diversilab® niet in staat om de huidige typeringstechnieken te vervangen voor alle genera. Dit is gebaseerd op de matige resultaten die onder andere zijn gevonden bij *Pseudomonas aeruginosa*-stammen maar ook voor MRSA-stammen en *Enterococcus faecium*.³²

In een ander artikel wordt echter beschreven dat er een goede overeenkomst werd gevonden met behulp van Diversilab® in vergelijking met Pulsed-Field Gel Elektroforese (PFGE).²² Er zijn een paar stammen die met Diversilab® wel een verschil in bandenpatroon tonen maar met PFGE niet. Dit is volgens de schrijvers van dit artikel mogelijk te verklaren door genetische drift tussen gerelateerde stammen.²²

Volgens de schrijvers van dit artikel zou rep-PCR dus een beter discriminerend vermogen hebben dan PFGE, dat dit komt door de genetische drift lijkt onwaarschijnlijk. Een genetische drift is de continue mutatie die een bacterie ondergaat van generatie op generatie. Hier zou bij één en dezelfde stam geen verschil in aangetoond moeten worden.

5.4.5. Diversilab® resultaten.

In de Diversilab® resultaten, uit ons onderzoek, zijn ongeveer acht á tien bandjes zichtbaar in het banden patroon. Dit aantal is wat weinig voor een goed onderscheidend vermogen. Wat verder gezien wordt in de resultaten is dat er veel lichte banden tussen zitten die soms moeilijk te vergelijken zijn. Verschil in intensiteit kan ontstaan door een aspecifieke binding van de primer. Een primer kan binden terwijl bijvoorbeeld één nucleotide niet overeenkomt met de originele primersequentie.³⁵ De primer zal lastiger binden en bindt hierdoor vaak pas later in het proces waardoor deze minder cycli de tijd krijgt om te amplificeren. Het stukje geamplificeerd DNA zal dus minder vaak voorkomen in het eindproduct. In het bandenpatroon zal deze band lichter zijn qua intensiteit. Dit is een mogelijke verklaring voor het vaak voorkomen van verschillen in de duplo typering, de ene keer weet de primer wel te binden de andere keer niet.

Om meer bandjes te krijgen zou gekozen kunnen worden voor primers met een kortere sequentie. Een kortere sequentie zal relatief vaker voorkomen in het genoom dan een langere sequentie. Zo zullen er meer bandjes gevormd kunnen worden. Het gaat hier echter om een commerciële kit waarbij de primersequenties niet worden vrijgegeven. Het eventueel aanpassen van de primers is dus niet mogelijk.

5.5. AFLP VUMC.

5.5.1. Discriminerend vermogen AFLP

AFLP beschikt over een groter discriminerend vermogen dan rep-PCR. Dit is te verklaren door de hoeveelheid banden in het bandenpatroon dat ontstaat bij AFLP (AFLP heeft meer banden in het bandenpatroon dan rep-PCR). Wij hebben er in dit onderzoek dan ook voor gekozen om

AFLP te gebruiken ter bevestiging van de Diversilab® resultaten. Mochten de AFLP resultaten anders zijn dan de Diversilab® resultaten, dan hebben we de AFLP resultaten als juist beschouwd omdat deze beschikt over een groter discriminerend vermogen.

5.5.2. AFLP resultaten.

De resultaten van de AFLP typering komen grotendeels overeen met de resultaten van Diversilab®. Het enige verschil dat gevonden is tussen de twee technieken is in praktijk 3: patiënt 101208-0141 komt volgens AFLP niet overeen met de patiënten 100626-0071, 100717-0073 en 100921-0133, en volgens de AFLP typering is er geen overeenkomst tussen de isolaten uit de verschillende praktijken die in Diversilab® wel een overeenkomst geven, namelijk de isolaten uit praktijk 1 (101008-0151), 4 (spuit), 11 (100410-0087) en 16 (100127-0109). Dit lijkt ook logisch omdat je niet verwacht dat patiënten en een spuit uit verschillende praktijken een zelfde stam dragen. Wanneer dit wel het geval zou zijn geweest, zou er gekeken kunnen worden naar een eventuele gemeenschappelijke besmettingsbron, zoals zwembadwater. Op grond hiervan kunnen we concluderen dat Diversilab® onvoldoende onderscheidend vermogen biedt, dat wil zeggen als Diversilab® verschil vaststelt, dan is dat ook zo. Als Diversilab® overeenkomst vaststelt dan is een vervolgtechniek, als AFLP, noodzakelijk.

5.5.3. Reproduceerbaarheid AFLP.

Bij de AFLP resultaten is door het uitvoerend laboratorium de eerste twee keer een afkapwaarde van 85% aangegeven. 85% lijkt een lage afkapwaarde. Wanneer gekeken wordt naar de reproduceerbaarheid is dit wel begrijpelijk. De reproduceerbaarheid van de test is namelijk niet optimaal. In figuur 27 zijn twee bandenpatronen van één dezelfde stam te zien, die onder een andere naam en op een andere datum zijn ingestuurd. Deze zijn dus niet in dezelfde run getest. Normaal gesproken zou de reproduceerbaarheid verbeterd kunnen worden met een optimalisatie van de test. Denk hierbij bijvoorbeeld aan het veranderen van de extractie of de temperaturen tijdens de PCR reactie.

Omdat we zowel bij AFLP als bij Diversilab® een lage reproduceerbaarheid vinden, zou je denken dat het zou kunnen liggen aan het soort bacterie. Het is voor ons niet na te gaan of de test beter geoptimaliseerd zou kunnen worden omdat AFLP op het VUMC wordt uitgevoerd en de Diversilab® *Pseudomonas* kit een commerciële kit is waar we geen verandering in aan kunnen brengen. Vanaf de extractie tot en met de elektroforese is de test vastgelegd door Diversilab®.

In de laatste twee AFLP resultaten is geen lijn getrokken bij de 85%, en is de afkapwaarde niet vermeld in de uitslag. Hier zijn we uitgegaan van dezelfde eerder opgegeven afkapwaarde van 85%. In het laatste AFLP resultaat, figuur 38, lijken de isolaten 101008-0151, spuit praktijk 4 en 100410-0087 een overeenkomst te hebben van $\geq 85\%$. In de uitslag worden deze isolaten niet als identiek beschouwd. Waarschijnlijk is hier op het oog beoordeeld of het bandenpatroon van de isolaten overeenkomt, er zijn namelijk een aantal banden duidelijk verschillend.



Figuur 27; reproduceerbaarheid AFLP

6. Conclusie

Dat in vier praktijken een overeenkomst wordt gevonden tussen een isolaat uit een spuit en een isolaat uit het oor van de patiënt, kan geen toeval zijn. Het is echter niet duidelijk hoe deze stam zich verspreidt. Wordt de stam overgedragen van de spuit naar de patiënt, of van de patiënt naar de spuit? Wanneer de stam uit de spuit naar de patiënt wordt overgedragen hoeft er niet altijd sprake te zijn van het ontwikkelen van een infectie, waardoor de eventuele overdracht niet wordt opgemerkt.

Uit dit onderzoek kunnen we concluderen dat er een mogelijkheid is van overdracht van micro-organismen vanuit instrumentarium, dat gebruikt wordt bij het onderzoeken en uitspuiten van het oor, naar het oor van de patiënt.

Duidelijk is dat deze bacterie niet thuis hoort in de oorspuit. De oorspuiten zullen dus beter gereinigd moeten worden. Uit het voorbeeld van praktijk 3 blijkt dat na het reinigen en steriliseren er geen *Pseudomonas aeruginosa* meer wordt geïsoleerd uit de oorspuit. Reiniging alleen, zoals voorgeschreven in de richtlijnen van de WIP, is niet voldoende. Na het reinigen van de spuit dient deze nog gedesinfecteerd of gesteriliseerd te worden.

We willen alle huisartspraktijken, die hebben meegewerkt aan dit onderzoek, een lijst met adviezen en aanbevelingen aanbieden, zie bijlage 6.

Over het Diversilab® systeem kunnen we concluderen dat het discriminerend vermogen van deze test onvoldoende is. Er is altijd een bevestiging nodig door middel van een andere typeringstechniek voor een betrouwbare uitslag.

Literatuurlijst

1. Nederlandse vereniging voor keel-neus-oorheelkunde en heelkunde van het Hoofd-Halsgebied. www.kno.nl/publiek/voorlichting/gehoorgangontsteking. Geraadpleegd op 23-11-2010
2. Erasmus Medisch Centrum. KNO afdeling, informatie oorsmeer. www.erasmusmc.nl/kno/patientenzorg/knoklacht/Oorklachten/1932197. Geraadpleegd op 28-03-2011.
3. NHG-Standaard Otitis externa (eerste herziening). http://nhg.artsennet.nl/kenniscentrum/k_richtlijnen/k_nhgstandaarden/NHGStandaard/M49_std.htm. Geraadpleegd op 23-11-2010.
4. Groene Hart Ziekenhuis, KNO patiënten voorlichting. www.ghzkno.nl/Groene_Hart_Ziekenhuis_C01/default.asp?comid=14&modid=919&itemid=0&time=544. Geraadpleegd op 27-01-2011.
5. YK Ong, G Chee. Infections of the external ear. Ann Acad Med Singapore 2005;34:330-4.
6. Mutsaers JAEM, Jansen CL, Knecht NM, Doornbos L, Bacteriologie voor laboratorium en kliniek 2. Arnhem: Syntax Media:2007.p. 7-8.
7. Carfrae MJ, Kesser BW. Malignant otitis externa. Otolaryngol Clin Nort Am 2008;41:537-549.
8. Teunissen E, Broek van den P. Necrotiserende otitis externa of maligne otitis externa. Ned Tijdschr Geneesk 1990;134:793-794.
9. Cândida Rodrigues Nogueira J, de Fatima F. Melo Diniz M, Oliveira Lima E, Nandes Lima Z. Identification and antimicrobial susceptibility of acute external otitis microorganisms. Rev Bras Otorrinolaringol 2008;74:526-30
10. Mutsaers JAEM, Jansen CL, Knecht NM, DoornbosL, Bacteriologie voor laboratorium en kliniek 2. Arnhem: Syntax Media: 2007.p.224-228.
11. Hoepelman IM, Noordaa van der J, Sauwerwein RW, Verburgh HA. Microbiologie en infectieziekten. Houten/Mechelen: Bohn Stafleu Van Loghum: 2002 p.73, 260, 289.
12. *Pseudomonas aeruginosa*. www.textbookofbacteriology.net/pseudomonas.html. Geraadpleegd op 30-11-2010.
13. Obritsch, Fish, Maclaren, Jung. Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. Pharmacotherapy 2005;25:1353-1364.
14. Jochems AAF, Joosten FWFG. Geneeskundig zakwoordenboek.Doetinchem: Elsevier Gezondheidszorg: 2003.
15. Sundström J, Agrup C, Kronvall G, Wretling B. *Pseudomonas aeruginosa* adherence to external auditory canal epithelium. Arch Otolaryngol Head Neck Surg. 1997;123:1287-1292.

16. Protocol bovenste luchtwegen, werkmap IC, NICU, SDD Sophia, Wezenlanden.
17. WIP Infectiepreventie in de huisartsenpraktijk.
www.wip.nl/free_content/Richtlijnen/090218%20Huisartsenpraktijk%20def.pdf.
Geraadpleegd op 23-11-2010.
18. Wen-Shyang Hsieh, Ling-Ling Sung, Kun-Choe Tsai, Hsin-Tsung Ho. Evaluation of the VITEK 2 cards for identification and antimicrobial susceptibility testing of non-glucose-fermenting Gram-negative bacilli. APMIS 2009;117:241-247.
19. VITEK® 2: HEALTHCARE REAGENTS. www.biomerieux-usa.com/servlet/srt/bio/usa/dynPage?open=USA_PRD_LST&doc=USA_PRD_LST_G_PRD_USA_4&pubparams.sform=2&lang=en. Geraadpleegd op 10-01-2011.
20. Ultraclean® Microbial DNA Isolation Kit. Instruction Manual versie 05172010.
21. Biomerieux products Diversilab underlying technology.
www.biomerieux-diagnostics.com/servlet/srt/bio/clinical-diagnostics/dynPage?open=CNL_CLN_PRD&doc=CNL_PRD_CPL_G_PRD_CLN_2&pubparams.sform=6&lang=en. Geraadpleegd op 15-02-2011.
22. Doléans-Jordheim A, Cournoyer B, Bergeron E et al. Reliability of *Pseudomonas aeruginosa* semi-automated rep-PCR genotyping in various epidemiological situations. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2009;28:1105-1111.
23. Agilent 2100 Bioanalyzer 2100 Expert User's Guide 2003. p. 56-57.
<http://gcf.pbrc.edu/docs/Agilent/Agilent%20Manual.pdf>. Geraadpleegd op 01-02-2011.
24. Agilent 2100 test chip kit 62938-68300, using the test chips.
www.chem.agilent.com/Library/usermanuals/Public/G2938-90202_TestChip.pdf.
Geraadpleegd op 15-02-2011
25. Diversilab® software guide. Software version 3.4.
26. Vos P, Hogers R, Bleeker M et al. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acids Res 1995;23:4407-4414.
27. Sticky end. www.biology-online.org/dictionary/Sticky_end. Geraadpleegd op 21-03-2011.
28. Medimate, Capillaire elektroforese. www.medimate.com/meetprincipe/capillaire-elektroforese. Geraadpleegd op 15-03-2011.
29. Bacterial Barcodes. Material safety data sheet Diversilab® fingerprinting kits 2005.
www.biomerieux-usa.com/upload/66-0006-00rev2-MSDSDL-1.pdf. Geraadpleegd op 15-03-2011.
30. Applied biosystems. GeneAmp® 10x PCR buffers, product description.
<https://products.appliedbiosystems.com/ab/en/US/adirect/ab?cmd=catNavigate2&catID=601063&tab=DetailInfo>. Geraadpleegd op 15-03-2011.
31. Applied biosystems. Amplitaq® DNA polymerase.

<https://products.appliedbiosystems.com/ab/en/US/adirect/ab?cmd=catNavigate2&catID=601622&tab=DetailInfo>. Geraadpleegd op 15-03-2011.

32. Fluit AC, Terlingen AM, Andriessen L et al. Evaluation of the Diversilab System for Detection of Hospital Outbreaks of Infections by Different Bacterial Species. J Clin Microbiol 2010;48: 3979-3989.

33. Genetische drift. www.evolutietheorie.ugent.be/node/12. Geraadpleegd op 23-04-2011.

34. NCBI RAPD. www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genome/probe/doc/TechRAPD.shtml. Geraadpleegd op 23-04-2011.

35. Day JP, Bergstrom D, Hammer RP, Barany F. Nucleotide analogs facilitate base conversion with 34 mismatch primers. Nucleic Acids Res 1999;27:1810-1818.

36. Wilson LA, Sharp PM. Enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC) sequences in Escherichia coli: evolution and implications for ERIC-PCR. Mol Bio Evol 2006;23:1156-1168.

37. Newton HM, Rosenkrantz WS, Muse R, Griffin CE. Evaluation of otoscope cone cleaning and disinfection procedures commonly used in veterinary medical practices: a pilot study. Vet Dermatol 2006;17:147-150.

Figurenlijst

1. <http://www.xenophilia.com/news/ear.jpe>.
2. <http://www.guidetobelize.info/en/diving/images/gtb-swimmers-ear.jpg>.
3. <http://www.merckmanual.nl/mmhenl/sec19/ch219/ch219b.html>.
4. http://www.biomerieux-diagnostics.com/upload/DiversiLab_product_overview_chart_thumb.jpg.
- 5 & 6. http://www.biomerieux-industry.com/servlet/srt/bio/industry-microbiology/dynPage?open=NDY_IND_BPA_PRD&doc=NDY_BPA_PRD_G_PRD_NDY_2&pubparams.sform=5&lang=enn.
7. Overlay Diversilab (LMMI)
8. <http://www.philsciletters.org/May%202,%202009/Romero/Figure%201.gif>
9. Priming station (LMMI).
- 10 & 11. Verdunningsreeks (LMMI).
12. Kaart regio Zwolle (LMMI).
- 13 & 39 http://www.cantaertaxel.be/image_files/dokter_instr_oorspuit2.jpg.
- 14.& 40 http://www.multimedi.com/www/images/afbeeldingen/oorspuiten/socorex/socorex_oorspuit.jpg.
15. http://huisartsen.arseus-medical.be/cms_files/N-4454-TxtImage1.jpg
16. http://www.wijgergangsmedical.nl/product_thumb.php?img=images/wondblaasspuit.jpg&w=80&h=80.
17. http://www.schnabel.nl/pics_products/heine/heine_beta200_otoscope2.jpg.
18. Stammen geïsoleerd uit kweken afgenomen in de huisartspraktijken (LMMI).
19. http://www.meditop.nl/website/public/upload/hires/victory_large.png?PHPSESSID=520173ecf23db6fb92f6df85e14ead3c.
- 20 t/m 34. Diversilab resultaten (LMMI).
- 35 t/m 38. AFLP resultaten (LMMI).
- 41 t/m 46. Diversilab resultaten (LMMI).

Nawoord

Gedurende de afgelopen zeven maanden heb ik mijn afstudeeropdracht uitgevoerd op het Laboratorium voor Medische Microbiologie en Infectieziekten van de Isala klinieken te Zwolle. Tijdens deze leerzame periode heb ik met veel plezier aan mijn afstudeeropdracht gewerkt. In het bijzonder het epidemiologische gedeelte van het onderzoek sprak me erg aan, daarnaast vond ik het erg leuk en leerzaam om verschillende huisartspraktijken te mogen bezoeken in samenwerking met de ziekenhuishygiëne.

Mijn afstudeerperiode is goed en soepel verlopen, bij deze wil ik dan ook mijn stagebegeleidster Marjan Bruins en eind verantwoordelijk arts-microbioloog Gijs Ruijs bedanken voor de goede begeleiding en de fijne samenwerking.

Verder wil ik bedanken, Lesla Bruijnesteijn van Copenraet (moleculair bioloog) voor de goede ondersteuning bij het interpreteren van de resultaten en de theoretische achtergrond, Inge Kamphuis (analist medische microbiologie) voor de ondersteuning bij het gebruik van Diversilab®, Anne-Marie Willems (analist medische microbiologie) voor de ondersteuning bij het verwerken van de kweken en Saskia de Vries- van Rossum (ziekenhuishygiënist) voor de begeleiding bij het bezoeken van de huisartspraktijken en het opstellen van de aanbevelingen.

Roy Klein Overmeen (huisarts) wil ik graag in het bijzonder bedanken voor de tijd die hij heeft gestopt in dit project, en de fijne samenwerking.

De afdeling Moleculaire Epidemiologie van het VUMC Amsterdam wil ik bedanken voor het uitvoeren van de AFLP typering.

Voor de goede begeleiding vanuit de Hogeschool Utrecht bedank ik Dick van Brenk.

Tenslotte wil ik graag alle medewerkers van het LMMI Zwolle bedanken voor alle hulp en de fijne samenwerking.

Bijlage 1; vragenlijst bij bezoek aan huisartsenpraktijk.

1.Wie is over het algemeen verantwoordelijk voor het uitspuiten van de oren (wie doet de verrichting de assistente of de arts)?

- Is er een protocol voor het procedé?
- Wordt de handeling wel eens gecontroleerd door de huisarts?

2.Wordt er bij het onderzoek rekening gehouden met de volgorde waarop de oren worden bekeken en uitgespoten (eerst de niet aangedane zijde)?

3.Hoe is het gebruik van de instrumenten onderling? Heeft ieder zijn eigen instrumenten of worden deze gedeeld in de praktijk?

4.Wordt er gebruik gemaakt van disposables?

5.Hoe wordt het materiaal gereinigd? (desinfecteren met alcohol? Afwasmiddel en afwasborstel?)

6.Is er een mogelijkheid tot autoclaveren? Worden oorspuiten wel eens op deze manier gesteriliseerd?

- Zo ja wordt deze autoclaaf ook regelmatig gevalideerd?

7.Is men in de praktijk bekend met de WIP richtlijnen?

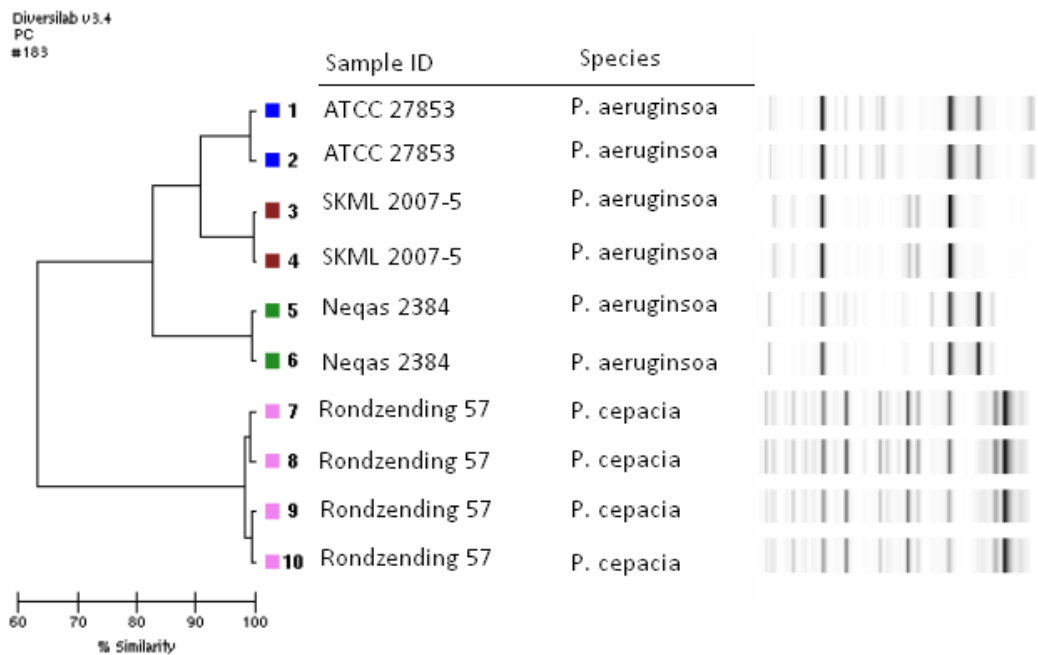
8.Wat is over het algemeen de reden van het uitspuiten van de oren, is hier al een infectie bij gaande? Wordt het uitspuiten van de oren(cerumenlavage) ook ontraden bij aanwezigheid van een infectie?

- Ziet de arts vaak patiënten terug die eerst zijn uitgespoten en daarna terug komen met klachten van een otitis externa?
- Komen patiënten vaak eerst met een eenzijdige infectie in de praktijk en later met een dubbelzijdige infectie?

9.Kweken afnemen van:

- Punt oorspuit
- Binnenkant oorspuit
- Punt otoscoop, indien disposables vaker worden gebruikt deze ook kweken
- Indien er gebruik wordt gemaakt van een afwasborstel o.i.d., deze ook kweken

Bijlage 2: Inijken Diversilab®.



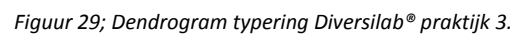
Figuur 28; inijken Diversilab Pseudomonas kit.

Bijlage 3; alle soorten micro-organismen geïsoleerd uit de afgenomen kweken.

Tabel 16; soorten micro-organismen geïsoleerd uit instrumentarium.

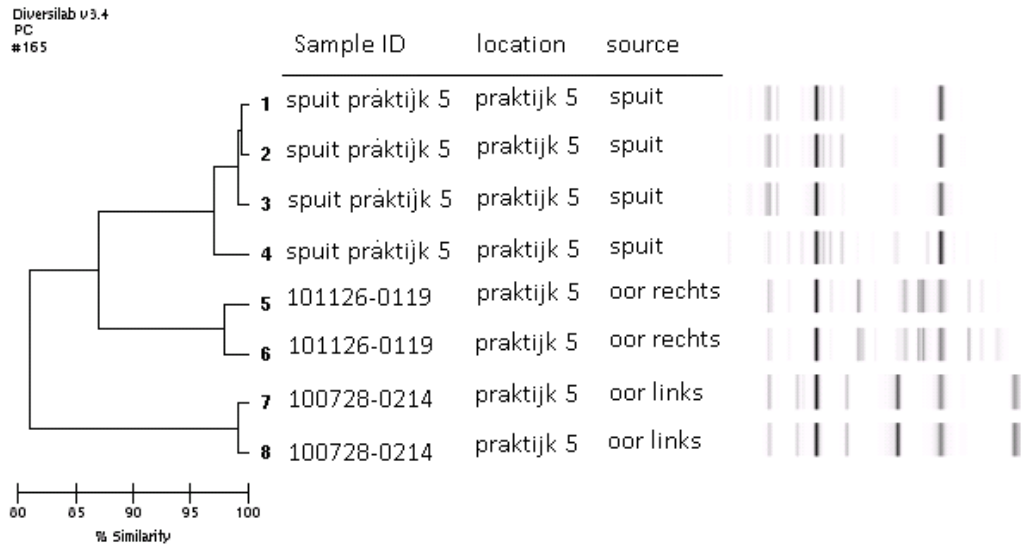
Soort	Aantal keer geïsoleerd
<i>Acinetobacter baumannii</i>	2
<i>Acinetobacter lwoffii</i>	2
<i>Acinetobacter ursingii</i>	1
<i>Aerococcus viridans</i>	1
<i>Aeromonas salmonicida</i>	5
<i>Arthrobacter spp.</i>	1
<i>Bacillus firmus</i>	2
<i>Bacillus licheniformis</i>	1
<i>Bacillus megaterium</i>	2
<i>Bacillus mycoides</i>	1
<i>Bacillus species</i>	1
<i>Brevundimonas species</i>	28
<i>Candida parapsilosis</i>	2
<i>Comamonas testosteroni</i>	3
<i>Corynebacterium accolens</i>	1
<i>Corynebacterium propinquum</i>	1
<i>Corynebacterium species</i>	1
<i>Delftia acidovorans</i>	4
<i>Escherichia coli</i>	1
<i>Kocuria kristinae</i>	3
<i>Kocuria rosea</i>	1
<i>Kocuria varians</i>	2
<i>Microbacterium species</i>	1
<i>Micrococcus luteus</i>	7
<i>Micrococcus lylae</i>	3
<i>Micrococcus spp</i>	1
<i>Paracoccus yeii</i>	1
<i>Penicillium species</i>	1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	14
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	3
<i>Pseudomonas mendocina</i>	3
<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>	1
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	4
<i>Rhizobium radiobacter</i>	2
<i>Sphingobacterium spiritivorum</i>	2
<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	45
<i>Staphylococcus aureus</i>	1
<i>Staphylococcus auricularis</i>	3
<i>Staphylococcus capitis</i>	6
<i>Staphylococcus caprae</i>	2
<i>Staphylococcus chromogenes</i>	1
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	10
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	3
<i>Staphylococcus hominis ssp hominis</i>	3
<i>Staphylococcus kloosii</i>	1
<i>Staphylococcus warneri</i>	9
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	13

Overeenkomst tussen spuit en patiënt 100519-0077.



Resultaten typering Diversilab® praktijk 5.

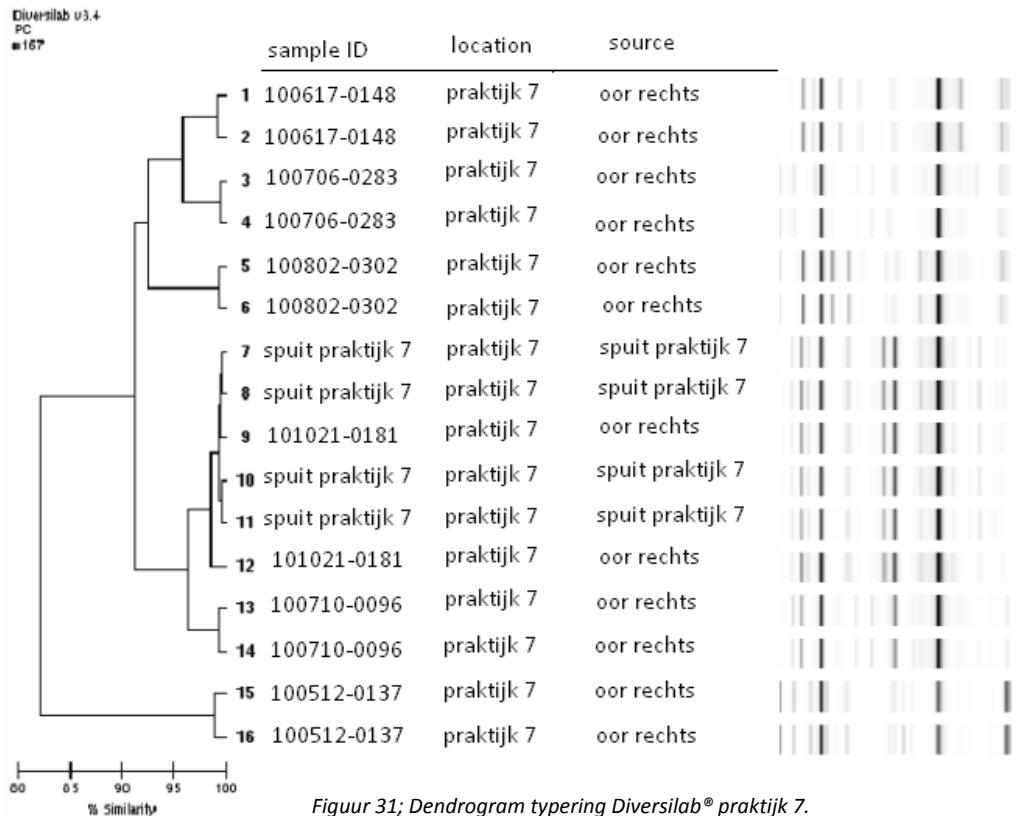
Geen overeenkomst gevonden tussen verschillende patiënten of tussen spuit en patiënt.



Figuur30; Dendrogram typering Diversilab® praktijk 5.

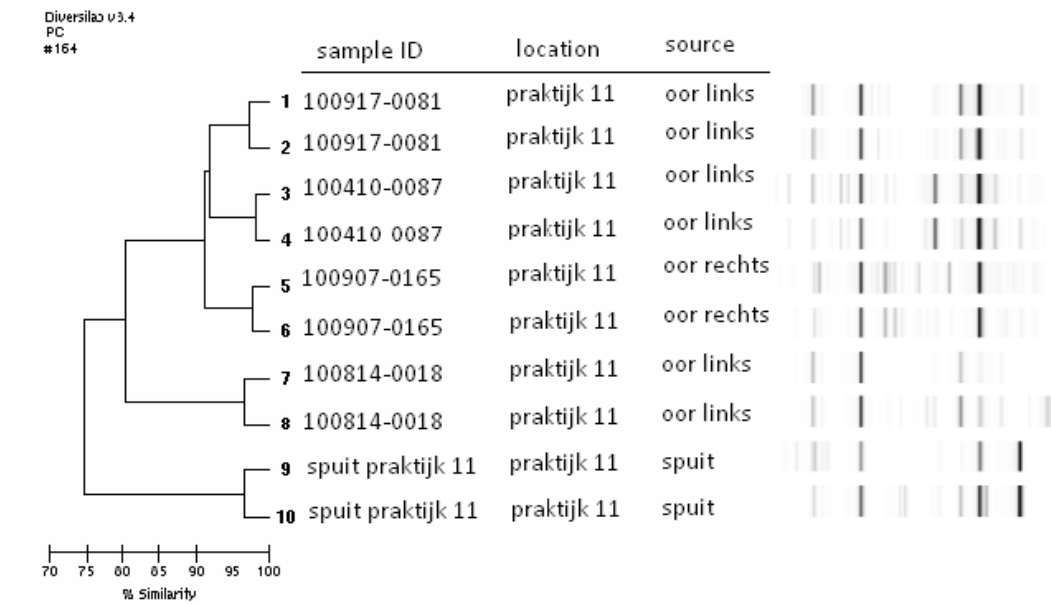
Resultaten typering Diversilab® praktijk 7.

Overeenkomst tussen spuit en patiënt 101021-0181.



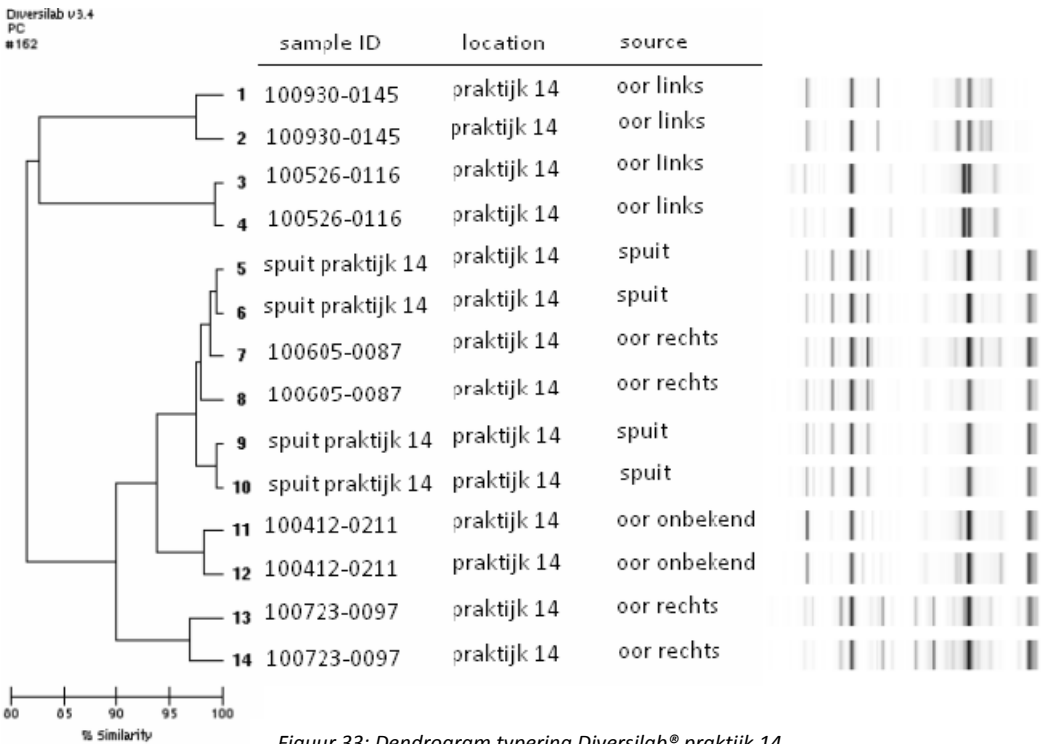
Figuur 31; Dendrogram typering Diversilab® praktijk 7.

Resultaten typering Diversilab® praktijk 11.
 Geen overeenkomst gevonden tussen verschillende patiënten of tussen spuit en patiënt.



Figuur 32; Dendrogram typering Diversilab® praktijk 11.

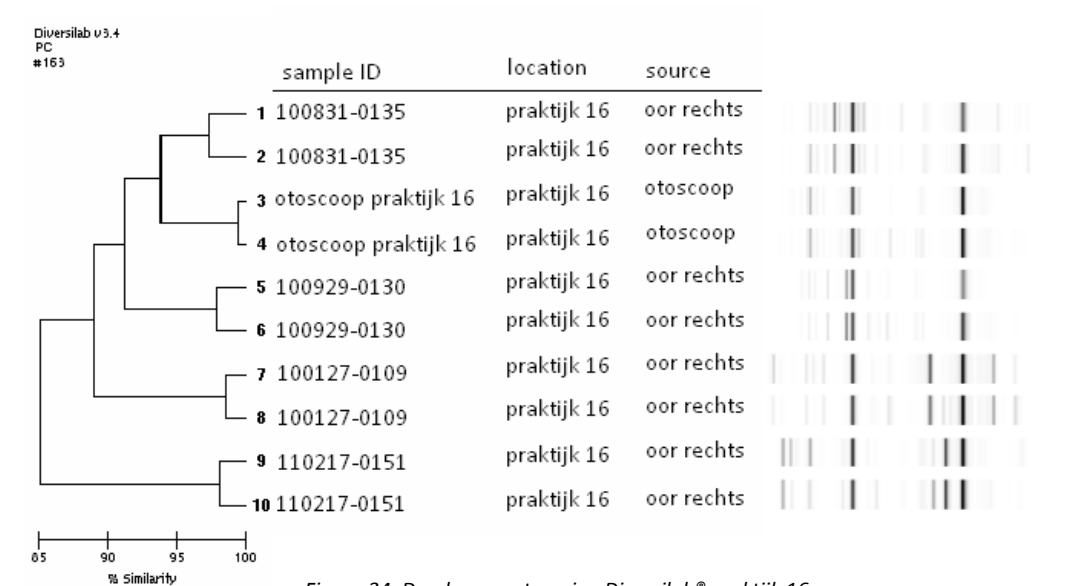
Resultaten typering Diversilab® praktijk 14.
 Overeenkomst tussen spuit en patiënt 100605-0087



Figuur 33; Dendrogram typering Diversilab® praktijk 14.

Resultaten typering Diversilab® praktijk 16.

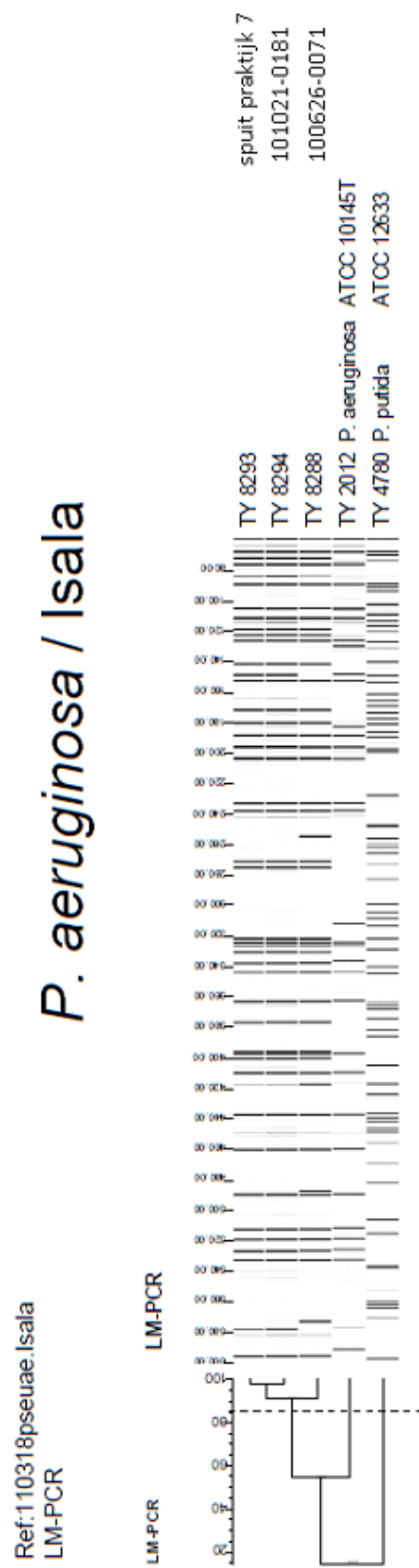
Geen overeenkomst gevonden tussen verschillende patiënten of tussen otoscoop en patiënt.



Figuur 34; Dendrogram typering Diversilab® praktijk 16.

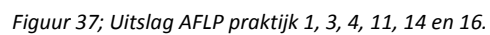


Figuur 35; Uitslag AFLP praktijk 1 en praktijk 3.



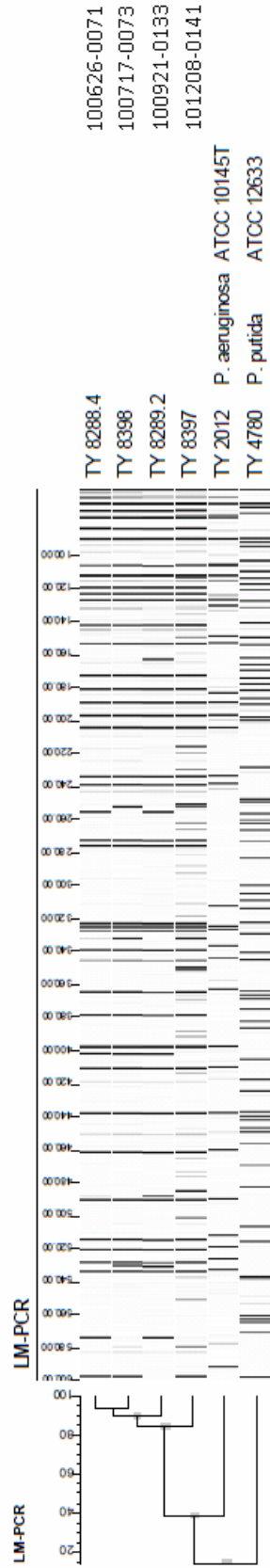
Figuur 36; Uitslag AFLP praktijk 7.

Ref:110401pseuae.Isala
LM-PCR



Ref:110415pseuae.Isala
LM-PCR

P. aeruginosa / Isala



Figuur 38; Uitslag AFLP patiënten praktijk 3.

Bijlage 6; aanbevelingen.

1. Gebruik van oorspuiten

- Indien mogelijk raden wij aan het oor uit te zuigen i.p.v. een cerumenlavage (dit wordt aangeraden omdat er bij deze techniek geen water in het oor van de patiënt wordt gespoten. De puntjes die gebruikt worden bij een uitzuigapparaat dienen na gebruik gesteriliseerd te worden in een autoclaaf. Op de KNO afdeling wordt deze techniek ook toegepast in plaats van cerumenlavage)
- Wanneer er wel gebruik wordt gemaakt van een oorspuit, raden wij aan een oorspuit te gebruiken die gemakkelijk uit elkaar te halen is, zodat zowel de buitenkant als de binnenkant goed gereinigd en gedroogd kan worden.
- Een voorbeeld hiervan is de gewone metalen hand oorspuit van bijvoorbeeld het merk Schimmelbusch. Deze kan gemakkelijk gereinigd en gedroogd worden.



Figuur 39; Schimmelbusch oorspuit

2. Gebruik van disposables

- Bij het gebruik van disposable opzet puntjes voor otoscopen raden wij aan minimaal 1 puntje per patiënt te gebruiken. Na gebruik dient het puntje weggegooid te worden, het is niet de bedoeling dat deze schoongemaakt en hergebruikt worden.
- Wanneer er geen gebruik wordt gemaakt van disposable puntjes maar van reusable puntjes of vaste punten raden wij aan deze na iedere patiënt te reinigen.

3. Volgorde oren bekijken

- Let bij het bekijken van de oren op de volgorde waarop de oren worden bekeken. Kijk altijd eerst in het oor zonder klachten, en vervolgens in het oor met klachten. Wanneer eerst in het oor met klachten wordt gekeken gebruik dan een ander disposable puntje (of wanneer gebruik wordt gemaakt van een reusable of vaste punt eerst reinigen) voor het andere oor. Zo wordt de mogelijke overdracht van micro-organismen beperkt.

4. Reiniging

- De spuit dient na elk gebruik gereinigd te worden (dus na iedere patiënt). Hiervoor raden wij aan om eerst de spuit te reinigen met een reinigingsmiddel dat geschikt is voor medische instrumenten en vervolgens de spuit te desinfecteren.
- Na het reinigen moet de spuit worden gedroogd, zowel van binnen als van buiten voordat de spuit wordt gedesinfecteerd. Volgens de richtlijnen is reiniging van het instrumentarium bij een niet ontstoken oor voldoende, toch raden wij aan de spuit altijd te desinfecteren na het reinigen, het is bijvoorbeeld niet altijd zichtbaar of er al een infectie gaande is. Uit dit onderzoek is ook gebleken dat alleen reiniging niet afdoende is om micro-organismen zoals *Pseudomonas aeruginosa* en andere non-fermenters te verwijderen.
- Bij het gebruik van een elektrische oorspuit raden wij aan om de oorspuit door te spoelen met een goed reinigingsmiddel. De punt van de oorspuit raden wij aan eerst te reinigen en te drogen en vervolgens te desinfecteren.

- Denk bij het gebruik van elektrische oorspuiten ook aan het reinigen en drogen van de waterbakjes waar het schone water in gaat. Laat hier na het gebruik van de oorspuit geen water in staan.
- Tijdens het onderzoek hebben we kweken afgenomen van afwasborstels die gebruikt worden bij het reinigen van oorspuiten. Uit deze kweken zijn geen micro-organismen geïsoleerd. Wel raden wij aan de afwasborstels regelmatig te vervangen. Het is verstandig duidelijke afspraken te maken over de vervangingsfrequentie.
- Wanneer er gebruik wordt gemaakt van een oorspuit met een slang waar het water mee opgezogen wordt, adviseren wij deze slang regelmatig te vervangen. Zorg er na gebruik voor dat er geen water in de slang blijft staan en spoel deze ook door bij het reinigen van de spuit. Uit de kweken is gebleken dat in de slang een schimmel kan uitgroeien (te zien als zwarte aanslag in de slang)



Figuur 40; oorspuit met slang

5. Reinigingsmiddelen

- Tijdens de bezoeken hebben we geconstateerd dat er vaak gebruik wordt gemaakt van reinigingsmiddelen als Hibicet en Dettol. Dit zijn echter ontsmettingsmiddelen voor de huid, deze zijn niet bedoeld voor het schoonmaken van medisch instrumentarium.
- Wij adviseren gebruik te maken van een reinigingsmiddel dat geschikt is voor de reiniging van medisch instrumentarium. Bijvoorbeeld
 - Reinigen met Sekusept Cleaner, dit is een reinigingsmiddel voor medische instrumenten, en vervolgens na het drogen desinfecteren met 70% alcohol.
http://catalogus.medeco.nl/framework/modules/Catalog/media/products/Sekusept-Cleaner-NL_171109.pdf
 - Een ander voorbeeld is Sekusept forte dit is een reinigingsmiddel voor medische instrumenten en bevat tegelijkertijd een desinfectans, zo hoeft de spuit na het drogen niet meer met 70% alcohol gedesinfecteerd te worden.
http://catalogus.medeco.nl/framework/modules/Catalog/media/products/Sekusept-Forte-NL_171109.pdf
- Bij het gebruik van losse potjes en flesjes met bijvoorbeeld schoonmaak oplossingen (zoals alcohol) adviseren wij er duidelijk op te vermelden wat er in zit en hier een verloopdatum op te noteren. Het beste is om schoonmaakmiddelen in de oorspronkelijke verpakkingen te bewaren. Wanneer het in flesjes wordt overgegoten, dan moeten deze flesjes voor het opnieuw vullen gereinigd worden.
- Het gebruik van sterillium® (handenalkohol) voor het desinfecteren van instrumentarium wordt afgeraden. Deze bevat namelijk een terug-vetter voor de huid, waardoor er op het instrumentarium een vet laagje achter blijft waar micro-organismen zich gemakkelijk in kunnen nestelen.

6. Protocol

- Wij raden aan om een protocol op te stellen voor de procedure, en hierin te vermelden hoe de oorspuit schoongemaakt dient te worden. Het is opgevallen dat binnen één praktijk ieder hier zijn eigen methode voor heeft. Door de procedure voor het schoonmaken vast te leggen in een protocol hopen we dat er één manier wordt gehanteerd voor het reinigen van de oorspuiten.

7. WIP

- Graag willen we u wijzen op de WIP richtlijnen (Werkgroep Infectie Preventie). Deze werkgroep heeft speciale richtlijnen opgesteld voor infectie preventie in de huisartsenpraktijk. Deze richtlijnen zijn te vinden op www.wip.nl.
(http://www.wip.nl/free_content/Richtlijnen/090218%20Huisartsenpraktijk%20def.pdf)

8. Reiniging/desinfectie protocol

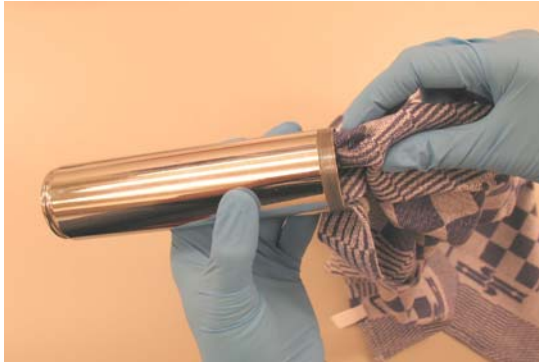
- Maak een oplossing van het te gebruiken reinigingsmiddel (bijvoorbeeld Sekusept).
- Haal de oorspuit uit elkaar (figuur 41).
- Reinig de oorspuit, zowel de punt als de binnenkant van de oorspuit.
(Gebruik bij de reiniging een borstel waarmee ook de binnenkant gereinigd kan worden zie figuur 42).
- Elektrische oorspuit
 - reinigingsmiddel in waterbakje en oorspuit goed doorspuiten.
 - punt van de oorspuit na het drogen, desinfecteren met 70% alcohol.
- Oorspuit met een slang om water mee op te zuigen
 - spoel bij het reinigen van de oorspuit ook de slang door met het reinigingsmiddel.
- Laat de oorspuit drogen of droog deze met een daarvoor bestemde doek (figuur 43).
- Desinfecteer de oorspuit met 70% alcohol (figuur 44).
- Laat de oorspuit drogen aan de lucht (figuur 45).
- Zet de oorspuit weer terug in elkaar (figuur 46).
- Bewaar de oorspuit op een droge plek.



Figuur 41; Haal de spuit uit elkaar.



Figuur 42. Reinig de oorspuit van binnen en buiten met een geschikt reinigingsmiddel.



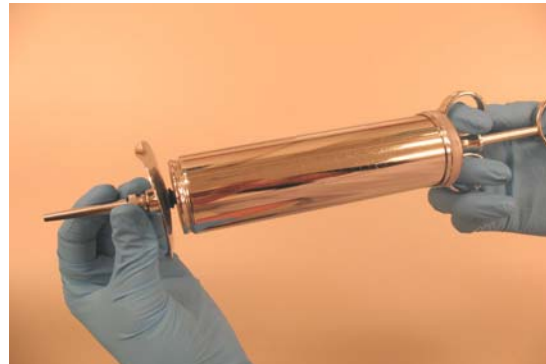
Figuur 43; Oorspuit drogen met geschikte doek.



Figuur 44. Oorspuit desinfecteren met 70% alcohol.



Figuur 45. Oorspuit laten drogen aan de lucht.



Figuur 46. Oorspuit weer terug in elkaar zetten en droog bewaren.

Bijlage 7; Antwoorden uit de huisartsenpraktijk, KNO-afdeling en Huisartenpost.

Tabel 17; Vragen en antwoorden uit de huisartspraktijken, de KNO-afdeling en de huisartsenpost.

			Verantwoordelijk voor uitspuiten, protocol aanwezig? Controle arts	rekening gehouden met volgorde bekijken oren	Onderling gebruik instrumentariu m	Gebruik disposable puntjes (otoscoop)	Reiniging oorspuit	Autoclaveren oorspuit	Validatie autoclaaf	WIP- richtlijnen	Indicatie uitspuiten	infectie na uitspuit en	infectie eerst één later dubbel zijdig
Praktijk	Datum	Soort spuit (en)											
1	26-01-2011	1x A*	Assistente verantwoordelijk, protocol aanwezig, controle arts bij zien van infectie	Nee	Ja	Arts wel, assistente niet	Dettol en afwasborstel	Wel aanwezig, oorspuit niet geautoclaveerd.	Niet bekend bij assistente	Assistente niet arts wel	Cerumenprop	Komt wel eens voor	Nee
2	26-01-2011	1x A	Assistente verantwoordelijk, geen protocol, handeling niet gecontroleerd door arts	Nee	Ja	Ja, één puntje per patiënt	Afwasmiddel en afwasborstel, punt met hibicet	Wel aanwezig, oorspuit niet geautoclaveerd	Niet bekend bij assistente	Wel bekend, niet gebruikt in praktijk	Cerumenprop, schilfering	Nee	Nee
3	02-02-2011	11x A	Assistente verantwoordelijk, geen protocol, alleen gecontroleerd bij zien infectie	Nee	Ja, grote praktijk, veel spuiten	Arts wel, assistentes hergebruiken disposable puntjes reinigen in vaatwasser	Schoonmaakmiddel (niet specifiek) of alcohol, afwasborstel. In praktijk Dettol en Hibicet aanwezig	Wel aanwezig, oorspuit niet geautoclaveerd	1x Per jaar	Assistente niet, arts weet van bestaan kent inhoud niet	Cerumenprop	Ja, geen verband gelegd met spuit	Nee
4	02-02-2011	2x A, 1x B*, 1x C*	Assistente verantwoordelijk, protocol aanwezig, controle bij problemen	Verschilt per assistente	Ja	Artsen en assistentes hergebruiken disposable puntjes.	Handspuit met Dettol afwasborstel, elektrische spuit Meliseptol rapid. Water bakje elektrische spuit niet gereinigd	Wel aanwezig, oorspuit niet geautoclaveerd	1x Per jaar	Niet bekend	Cerumenprop	Ja	Nee
5	16-02-2011	1x A, 2x B	Assistente verantwoordelijk, geen protocol, geen controle	Nee	2 artsen onderling gebruik	Artsen en assistentes hergebruiken disposable puntjes	Afwasmiddel en afwasborstel, soms sterillium. Dettol aanwezig.	Wel aanwezig, oorspuit niet geautoclaveerd	Niet bekend bij assistente	Niet bekend	Cerumenprop	Nee	Nee
6	16-02-2011	1x A, 1x B	Assistente verantwoordelijk, geen protocol, controle alleen bij problemen	Nee	Ja	Artsen en assistentes gebruiken disposables.	Huishoudelijk, water en afwasmiddel. Elektrische spuit met Sekusept	Wel aanwezig, oorspuit niet geautoclaveerd	Nee	Niet bekend	Cerumenprop	Nee	Nee
7	23-02-2011	1x A	Assistente verantwoordelijk, geen protocol, handeling niet gecontroleerd.	Nee	Ja, in praktijk, uitzuigapparaat hele gebouw	Ja, één puntje per patiënt	70% Alcohol buitenkant, of chloorhexidine, sekusept, afwasborstel	Wel aanwezig, oorspuit 1x per maand in autoclaaf	1x Per jaar	Niet bekend	Cerumenprop	Nee	Wel eens

			Verantwoordelijk voor uitspuiten, protocol aanwezig? Controle arts	rekening gehouden met volgorde bekijken oren	Onderling gebruik instrumentarium	Gebruik disposable puntjes (otoscoop)	Reiniging oorspuit	Autoclaveren oorspuit	Validatie autoclaaf	WIP- richtlijnen	Indicatie uitspuiten	infectie na uitspuiten	infectie eerst één later dubbel zijdig
8	23-02-2011	1x A	Assistente verantwoordelijk, geen protocol, controle alleen bij problemen	Nee	Ja	1 otoscoop reusable punt, disposable punt hergebruikt	Spuut met water door gespoten, puntjes met hibicet	Wel aanwezig, oorspuit niet geautoclaveerd	2x Per jaar	Niet bekend	cerumen prop	Paar keer per jaar	Ja, niet vaak
9	02-03-2011	1x A	Assistente verantwoordelijk, protocol aanwezig, controle alleen bij infectie	Nee	Ja	Ja, één puntje per patiënt	Afwasmiddel en afwasborstel, daarna sekusept	Wel aanwezig, oorspuit niet geautoclaveerd	1x Per jaar	Assistente niet, arts wel.	Cerumen prop	1 arts valt het regelmatig op.	Ja, niet vaak
10	02-03-2011	1x B (metalen punt)	Assistente verantwoordelijk, geen protocol, controle alleen bij infectie	Nee	Ja	Disposable puntjes hergebruikt. Arts wel eens 1 puntje bij 2 patiënten.	Elektrische spuit metalen punt, schoongemaakt afwasmiddel en alcohol (waterbakje niet schoongemaakt)	Wel aanwezig, oorspuit niet geautoclaveerd	1x Per jaar	Niet bekend	Cerumen prop	Ja, wel eens	Nee
11	02-03-2011	1x A	Assistente verantwoordelijk, geen protocol, geen controle, arts spuit zelf ook wel eens uit, ook met visites gaat spuit mee	Nee	Ja, ook visites	Ja, één puntje per patiënt	Dettol + naspoelen met water. Binnenkant niet gedroogd	Wel aanwezig, oorspuit niet geautoclaveerd	Ja, niet bekend hoe vaak	Niet bekend	Cerumenprop	Niet bekend	Niet bekend
12	02-03-2011	2x A, 1x B	Assistente verantwoordelijk, protocol aanwezig, controle bij problemen	Nee	Ja	Hergebruiken disposables	Met Dettol oplossing spuit doorspoelen, punt 70% alcohol	Wel aanwezig, oorspuit niet geautoclaveerd	1x Per jaar	Niet bekend	Cerumen prop	Ja, wel eens	Nee
13	09-03-2011	1x A, 1x B	Assistente verantwoordelijk, niet bekend of er een protocol is, controle alleen bij infectie.	Nee	Ja	Ja, één puntje per patiënt	Hibicet en afwasborstel, afspoelen met water. Soms ultrasoon.	Wel aanwezig, oorspuit niet geautoclaveerd	1x Per jaar	Niet bekend	Cerumen prop	Gebeurt af en toe	Nee
14	09-03-2011	2x A	Assistentes verantwoordelijk, protocol aanwezig, controle door arts alleen bij problemen	Nee	Ja	Ja, één puntje per patiënt, reusable punt na gebruik geautoclaveerd	Wanneer reden uitspuiten cerumen prop punt spuit schoongemaakt met papiertje en dettol, reden uitspuiten otitis punt spuit geautoclaveerd.	Wel aanwezig, punt na otitis geautoclaveerd	1x Per jaar	Niet bekend	Cerumen prop en otitis externa	Nee	Nee
15	09-03-2011	2x A	Assistentes verantwoordelijk, protocol aanwezig, controle alleen bij problemen	Nee	Ja	Ja, één puntje per patiënt	Dettol en afwasborstel	Wel aanwezig, oorspuit niet geautoclaveerd	1x Per jaar	niet bekend	Cerumen prop	Nee	Nee

			Verantwoordelijk voor uitspuiten, protocol aanwezig? Controle arts	rekening gehouden met volgorde bekijken oren	Onderling gebruik instrumentarium	Gebruik disposable puntjes (otoscoop)	Reiniging oorspuit	Autoclaveren oorspuit	Validatie autoclaaf	WIP- richtlijnen	Indicatie uitspuiten	infectie na uitspuiten	infectie eerst één later dubbel zijdig
16	09-03-2011	3x A, 1x B	Assistente verantwoordelijk, geen protocol, controle arts alleen bij zien van infectie e.d.	Nee	Ja	Reusable puntjes hergebruikt.	Huishoudelijk met afwasborstel, sekusept aanwezig	Wel aanwezig, oorspuit niet geautoclaveerd	1x Per jaar	Niet bekend	Cerumen prop	Soms	Nee
17	09-03-2011	1x B	Assistente verantwoordelijk, protocol aanwezig, controle bij van infectie.	Nee	Ja	Assistentes en artsen wel, niet altijd weg gegooid na gebruik. Arts otoscoop zonder dopjes ,wordt niet na iedere patiënt schoongemaakt.	Punt met alcohol, water doorspoelen, waterbakje (meestal) leeg	Wel aanwezig, oorspuit niet geautoclaveerd	1x Per jaar	Niet bekend	Cerumen prop	Soms	Nee
HA post	23-03-2011	1x A	Assistente en arts spuiten allebei uit, protocol aanwezig, controle bij infectie.	Niet bekend, steeds andere arts en assistente	Ja 1 spuit aanwezig die gebruiken alle artsen als ze dienst hebben	Ja, één puntje per patiënt	Huishoudelijk sekusept en afwasborstel	Wel aanwezig, niet bekend spuit geautoclaveerd	1x Per jaar	Ja, protocollen op afgesteld	Cerumen prop	nvt	nvt
KNO	22-02-2011	Kno unit	Geen protocol aanwezig	Nee	Ja	Ja, één puntje per patiënt	nvt	CSA	CSA	nee	infectie, soms cerumen	wel na uitspuiten bij huisarts, na zelf behandelen niet	Wel eens
			*A= hand oorspuit B= elektrische oorspuit C= 100cc plastic spuit. Zie resultaten figuur 13 t/m 16.										