

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/32006> holds various files of this Leiden University dissertation

Author: Paltansing, Sunita

Title: Antimicrobial resistance in Enterobacteriaceae : characterization and detection

Issue Date: 2015-02-18

The background of the entire page is a light gray field filled with numerous DNA double helix structures. These helices are oriented in various directions, some appearing as simple outlines and others with more detailed shading to show their three-dimensional form. Interspersed among the helices are individual nucleotide base pairs, represented by the letters A, C, G, and T in a clean, sans-serif font. The overall effect is a scientific and modern aesthetic.

Nederlandse samenvatting

Nederlandse samenvatting

Inleiding

In de gezondheidszorg wordt de behandeling van bacteriële infecties met antibiotica in toenemende mate bemoeilijkt door het voorkomen van bacteriën, die resistent zijn tegen meerdere soorten antibiotica. De zogenaamde eerste-, tweede- en soms ook derdelijns antibiotica zijn steeds vaker onbruikbaar als gevolg hiervan. Het in de afgelopen jaren sterk toegenomen gebruik van antimicrobiële middelen, zowel binnen als buiten het ziekenhuis, ligt zonder twijfel ten grondslag aan deze ontwikkelingen. Antibioticagebruik, en dan vooral suboptimaal, langdurig of herhaald, is de belangrijkste factor die leidt tot selectie en verspreiding van resistente bacteriestammen. Maar ook het gebruik ervan in de veeteelt kan via vleesconsumptie, direct contact met dieren of besmetting van het milieu leiden tot ongewenste verspreiding van resistente bacteriën. Tot slot kan reizen naar het buitenland leiden tot import van resistente bacteriën.

Het is duidelijk dat de ziektelast van resistentie in Europa toeneemt. Een schatting is dat dit neerkomt op zo'n 25.000 extra sterfgevallen per jaar en 2,5 miljoen extra ziekenhuisligdagen. Wanneer multiresistente bacteriën infecties veroorzaken, is de gebruikelijke behandeling met antibiotica soms onwerkzaam en treedt dus een vertraging op in de behandeling. Daarnaast vergt het geïsoleerd verplegen van deze patiënten extra inspanningen en is belastend voor zowel het ziekenhuispersoneel als voor de patiënt. Verder nemen ook de kosten voor verpleging en verzorging toe. Ook bij patiënten, die buiten het ziekenhuis een infectie oplopen en niet een medische voorgeschiedenis hebben waarin van antibioticumgebruik sprake is, wordt een multiresistente bacterie steeds vaker gevonden als oorzakelijk agens.

Bij een ernstige infectie wordt microbiologische diagnostiek ingezet om de oorzakelijke bacterie te determineren en tevens de gevoeligheid voor antibiotica te bepalen. Er zijn verschillende methoden om deze gevoeligheid te meten. Veelal wordt antibioticaresistentie bepaald door middel van geautomatiseerde apparatuur. Dit gebeurt op basis van optische meting van bacteriële groei in reeksen met verschillende antibioticaconcentraties. Zowel de kweek- als de geautomatiseerde methode levert een uitslag die verdeeld kan worden in gevoelig (S), intermediair

gevoelig (I) of resistent (R). Dit geeft echter geen informatie over de achterliggende resistentiemechanismen, die hieraan ten grondslag liggen. Ook duurt dit proces enkele dagen totdat de definitieve uitslag bekend is.

Resistentiemechanismen

Resistentie tegen antibiotica bij bacteriën kan een gevolg zijn van verschillende resistentiemechanismen. De bacteriële resistentiemechanismen zijn:

1. Productie van een enzym dat het antibioticum inactieveert.
2. Veranderingen in het aangrijpingspunt, waarop het antibioticum werkzaam is.
3. Een verhoogde activiteit van efflux pompen, waardoor het antibioticum naar buiten wordt gepompt.
4. Barrières om de bacterie binnen te dringen door een verandering in permeabiliteit van de celmembraan, bijvoorbeeld door verlies van buitenmembraaneiwitten op de bacteriële celwand, zodat een antibioticum niet meer wordt opgenomen.

Een bacterie kan zowel een intrinsieke als een verworven resistentie hebben tegen een antibioticum. Intrinsieke resistentie is een stabiele genetische eigenschap die gecodeerd is in het bacteriële chromosomale DNA. Intrinsieke antibiotica-resistentiegenen kunnen permanent actief zijn of geïnduceerd worden door de blootstelling aan een specifiek antibioticum. Een bacterie kan ook resistent zijn door een intrinsieke eigenschap zoals het ontbreken van een bindingsplaats voor een specifieke antibioticum. Bacteriën kunnen ook resistentie verwerven door een mutatie in het bacteriële chromosomale DNA. In de meeste gevallen van verworven resistentie hebben bacteriën verschillende stappen nodig, waarbij elke stap op zich slechts een lichte verandering in gevoeligheid geeft. Bestaande resistentiemechanismen kunnen ook actiever worden door bijkomende mutaties. Behalve door mutaties kunnen bacteriën resistentie ontwikkelen door het verwerven van nieuw genetisch materiaal. Sommige bacteriën wisselen chromosomaal DNA uit in een proces dat *transformatie* heet. Het nieuw ingebrachte DNA kan recombineren met vergelijkbare sequenties in het chromosomale DNA van de ontvangende bacterie. Transformatie zorgt voor genetische variatie die zich vooral verspreid van de 'moeder-' naar de 'dochtercel' (*verticaal*). Daarnaast kunnen bacteriën mobiele genetische elementen bevatten: plasmiden, (conjugatieve) transposonen en integronen. Genetische informatie die aanwezig is

in deze elementen kan worden overgedragen tussen verschillende stammen van één bacteriesoort en tussen verschillende bacteriesoorten. Dit wordt *horizontale genoverdracht* genoemd. De mobiele genetische elementen vergroten de mogelijkheid tot overdracht van resistentiegenen en resistentieontwikkeling.

Voor een effectief antibioticumbeleid is meer inzicht nodig in de epidemiologie van de onderliggende antimicrobiële resistentiegenen van multiresistente bacteriën, de verspreiding van deze resistentiegenen en de factoren die bijdragen aan de selectie en de transmissie van multiresistente bacteriën. Het identificeren en karakteriseren van resistentiegenen van een groot aantal isolaten is echter zeer arbeidsintensief. De nieuwe generatie sequencing-technologieën, de zogenaamde 'next-generation sequencing' (NGS) technieken, zijn in staat grotere stukken DNA tegelijkertijd te sequencen en dus geschikter voor het ontrafelen van hele genomen. Hierdoor kan binnen korte tijd een enorme hoeveelheid DNA-sequentie worden geproduceerd. In dit proefschrift zijn de resistentiemechanismen bij *Enterobacteriaceae* bestudeerd. *Enterobacteriaceae* zijn normale darmbewoners, die op andere plaatsen in het lichaam milde tot levensbedreigende infecties kunnen veroorzaken. *Enterobacteriaceae* zijn Gram-negatieve staven en de meest voorkomende zijn: *Escherichia coli*, *Klebsiella* en *Enterobacter*. Minder vaak worden *Proteus*, *Serratia*, *Citrobacter* en *Morganella* gevonden. Voor alle genoemde species geldt, dat ze over diverse resistentiemechanismen tegelijk kunnen beschikken en zich in toenemende mate manifesteren als multiresistente bacteriën.

De snel toenemende resistentie tegen antibiotica in deze groep van bacteriën is voor een belangrijk deel toe te schrijven aan de productie van extended-spectrum- β -lactamases (ESBLs) en AmpC β -lactamases. Deze enzymen zijn in staat de meest voorgeschreven antibiotica, cefalosporines, tegen infecties met *Enterobacteriaceae* onwerkzaam te maken. Een ander veelgebruikt antibioticum is ciprofloxacin, welke behoort tot de klasse van de fluoroquinolonen. Ciprofloxacin is een breed spectrum antibioticum dat zowel tegen Gram-positieve als Gram-negatieve bacteriën werkzaam is. Het blokkeert de DNA replicatie door te binden aan DNA gyrase, waardoor tweezijdige breuken in het DNA ontstaan. Selectie voor bacteriën met puntmutaties in de genen die coderen voor DNA gyrase en topoisomerase IV (*gyrA*, *gyrB*, *parC* and *parE*) zijn lang veronderstelt als belangrijkste oorzaak voor resistentie tegen ciprofloxacin. Naast puntmutaties op het bacteriële chromosoom

zijn ook plasmid-geassocieerde mechanismen, zoals de genen *qnr* en *aac(6')-Ib-cr*. Ook kan een verhoogde activiteit van effluxpompen en/of verlies van porines op de bacteriële celwand bijdragen aan resistentie tegen fluoroquinolonen.

Hoofdstuk 2

In hoofdstuk 2 is de moleculaire karakterisering van antimicrobiële resistentie genen in 68 multiresistente *Enterobacteriaceae*, afkomstig van verschillende LUMC-patiënten in het jaar 2008 beschreven. Met behulp van moleculaire technieken (PCR) zijn de chromosomale genen *gyrase A*, *gyrase B*, *parC* en *parE* in kaart gebracht. Daarnaast is onderzocht of deze bacteriën de plasmidaal-gecodeerde genen *qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, *aac(6')-Ib-cr* en *qepA* bevatten. Ook werd de aanwezigheid van ESBLs onderzocht. Tenslotte is clonale verwantschap van de *Escherichia coli* isolaten onderzocht.

In totaal werden 49 *E. coli*, 16 *Klebsiella pneumoniae* and 3 *Enterobacter cloacae* isolaten onderzocht. In alle *E. coli* isolaten werd een mutatie in het *gyrase A* gen gevonden. In 45 (92%) van de *E. coli* isolaten werd tenminste 1 mutatie in het *parC* gen gevonden. In 59% van de *E. coli* isolaten waren ook mutaties in het *parE* gen aanwezig. De meest voorkomende mutatie in het *parE* gen was I529L, welke was geassocieerd met *E. coli* met sequentie type 131 (ST131).

Bovendien werd in 29 *E. coli* isolaten een ESBL gen gevonden; de meest voorkomende was *bla*_{CTX-M-15}. In de onderzochte *Klebsiella* isolaten werden voornamelijk de plasmidaal gecodeerde *qnr*, en *aac(6')-Ib-cr* genen samen met ESBL genen (n=13; *bla*_{CTX-M} and *bla*_{SHV}) en/of *bla*_{ampC} (n=3; *bla*_{DHA-1}) aangetoond. *E. coli* isolaten hebben voornamelijk chromosomale mutaties, die leiden tot resistentie tegen fluoroquinolonen. De I529L mutatie in het *parE* gen komt in de meeste, maar niet in alle ST131 isolaten voor. In tegenstelling tot de *E. coli* isolaten komen plasmidale resistentie genen vaker voor bij de onderzochte *K. pneumoniae* isolaten.

Hoofdstuk 3

Het onderzoek in hoofdstuk 3 beschrijft een studie naar de verhoogde activiteit van effluxpompen in 47 *E. coli* stammen, met een verminderde gevoeligheid voor ciprofloxacin en cefalosporines, afkomstig van verschillende LUMC-patiënten in het jaar 2008. Het doel van deze studie was te onderzoeken of verhoogde efflux pompactiviteit bijdraagt aan resistentie tegen fluoroquinolonen in *E. coli* isolaten. De activiteit van effluxpompen is bestudeerd met een geoptimaliseerde fluorometrische methode met behulp van bisbenzimidazol als fluorescentiemarker. De expressie van effluxpomp genen zoals *acrA*, *acrB*, *tolC*, *yhiV* en *mdfA* zijn onderzocht met behulp van kwantitatieve real-time reverse transcriptie-PCR (qRT-PCR). Ook zijn de expressieniveaus van de buitenmembraan-eiwitten *ompF* en *ompX* bepaald.

Met behulp van de RT-PCR methode kon in 35 isolaten overexpressie van messenger RNA van ≥ 1 efflux pomp aangetoond worden. Met behulp van de fluorometrische methode werd in 6 isolaten een verhoogde efflux pomp activiteit aangetoond. Alleen de gecombineerde overexpressie van *acrAB-TolC* en *mdfA* correleerde met de resultaten van de fenotypische fluorometrische methode. De bijdrage van actieve effluxpomp activiteit aan de resistentie tegen fluoroquinolonen was beperkt.

Hoofdstuk 4

In een tweede onderzoek naar cefalosporine resistentie, beschreven in hoofdstuk 4, is in 49 klinische *E. coli* isolaten onderzocht of een verhoogde expressie van het AmpC enzym de oorzaak is van resistentie tegen cefoxitin en of dit van invloed is op de activiteit van 3^e generatie cefalosporinen.

Negen van 33 (27,2%) cefoxitin-resistente isolaten (minimaal remmende concentratie (MIC) > 8 mg/L) toonde hyperproductie van chromosomaal AmpC (c-AmpC) op basis van (i) ten minste twee positieve fenotypische testen met AmpC-remmers, (ii) mutaties in de promotor/attenuator gebieden en (iii) een 6,1 tot 163-voudige toename van c-AmpC expressie door kwantitatieve RT-PCR. In de ESBL-negatieve isolaten waren de MICs van ceftazidim en cefotaxim meestal boven wildtype niveau, maar onder het S/I breekpunt (EUCAST richtlijn), met uitzondering van één isolaat met MICs van 4 mg/L. Er werden geen plasmidaal gecodeerde AmpC

genen aangetoond. Periplasmatische extracten (uit de ruimte tussen de binnenste celmembraan en buitenste membraan) van 9 c-AmpC hyperproducerende isolaten werden vooraf geïncubeerd met of zonder cefuroxim of ceftazidim en met behulp van SDS-PAGE geanalyseerd. Cefuroxim en ceftazidim waren bestand tegen hydrolyse maar fungeerden als remmers van het enzym. Geen van deze isolaten toonde verlies van buitenmembraaneiwitten.

Uit deze studie is gebleken dat resistentie tegen cefoxitin niet specifiek is voor c-AmpC hyperproducerende stammen. c-AmpC hyperproducerende *E. coli* isolaten zijn meestal nog steeds gevoelig voor de 3^e generatie cefalosporinen, maar wel minder gevoelig dan wildtype *E. coli*. Monitoring van cefoxitin-resistente *E. coli* op de ontwikkelingen in de resistentie tegen de 3^e generatie cefalosporines wordt aangeraden.

Hoofdstuk 5

Nederlanders reizen steeds meer naar verre bestemmingen waar relatief veel resistente bacteriën voorkomen. In deze prospectieve cohortstudie is onderzocht in hoeverre resistente darmbacteriën worden opgelopen tijdens deze verre reizen, hoe lang men deze bacteriën bij zich blijft houden en of deze 'import-bacteriën' zich ook verspreiden onder niet-reizende huisgenoten. Het gaat hierbij om dragerschap van carbapenemase producerende *Enterobacteriaceae* (CP-E) en extended-spectrum- β -lactamase producerende *Enterobacteriaceae* (ESBL-E) en de geassocieerde risicofactoren. Er werden bij 370 Nederlandse reizigers van de Travel Clinic van het LUMC en de GGD Hollands Midden vragenlijsten en rectumuitstrijken afgenomen vóór en na terugkeer van een buitenlandse reis. De ESBL-enzymen werden gekarakteriseerd met behulp van een micro-array (Check-Points BV). Bovendien zijn alle *E. coli* isolaten getypeerd. Van 370 reizigers waren 32 (8,6%) gekoloniseerd met ESBL-E voor de reis, 113 (31%) verwierf een ESBL-E en 26 reizigers waren zes maanden na terugkeer nog gekoloniseerd. Er werden geen CP-E gevonden in deze studie. Onafhankelijke risicofactoren voor ESBL-E dragerschap waren reizen naar Zuid- en Oost-Azië. Typering van de *E. coli* isolaten toonde uitgebreide genetische diversiteit. CTX-M enzymen waren het overheersende ESBL-type, dat werd gevonden. Het percentage ESBL-E dragerschap na een buitenlandse reis in Nederlandse reizigers was hoog (31%). Actieve surveillance van ESBL-E en CP-E

en minimaal contactisolatie voorzorgsmaatregelen worden aanbevolen bij opname van patiënten, die in de afgelopen 6 maanden naar Azië hebben gereisd.

Hoofdstuk 6

De nieuwe generatie sequencing-technologieën, de zogenaamde 'next-generation sequencing' (NGS) technieken, zijn in staat grotere stukken DNA tegelijkertijd te sequencen en dus geschikt voor het ontrafelen van hele genomen. Hierdoor kan binnen korte tijd een enorme hoeveelheid DNA-sequentie worden geproduceerd. In hoofdstuk 6 zijn 10 goed gekarakteriseerde klinische *E. coli* isolaten geselecteerd voor sequentie analyse met behulp van de Ion Torrent bench-top sequencer.

In deze isolaten is de aanwezigheid van antimicrobiële resistentie mechanismen voor β -lactam antibiotica, fluoroquinolonen, aminoglycosiden en co-trimoxazol onderzocht. Bovendien werd Ion Torrent sequentie analyse gebruikt om de isolaten te typeren en de aanwezigheid van 13 virulentiegenen te bepalen. Resultaten werden vergeleken met conventionele PCR en sequenties voor 18 antimicrobiële resistentiegenen. Voor 17 antimicrobiële resistentiegenen waren de NGS resultaten vergelijkbaar met conventionele PCR en sequentieanalyse. Alleen de SHV genen waren moeilijk te identificeren vanwege een lage dekkinggraad van dit gen. Daarnaast is met behulp van NGS de aanwezigheid van 13 virulentiegenen geïdentificeerd. Tenslotte kon met deze techniek ook in alle gevallen het correcte sequentietype worden vastgesteld. NGS met behulp van de Ion Torrent sequencer van klinische isolaten maakt het mogelijk om het hele genoom van een bacterie te onderzoeken in één test.

Conclusie

Zoals weergegeven in alle hoofdstukken van dit proefschrift toont moleculaire karakterisering van antimicrobiële resistentie mechanismen de heterogeniteit aan van antimicrobiële resistentiemechanismen in multiresistente *Enterobacteriaceae*. Naast de belangrijke overdraagbare ESBL-enzymen, CTX-M, SHV, TEM, plasmidaal-gemedieerde AmpC β -lactamasen en carbapenemases zouden multiresistente isolaten in elk geval ook onderzocht moeten worden op de aanwezigheid van

andere resistentie genen, zoals de plasmidaal-gemedieerde resistentie genen *qnr* en *aac-6'-Ib-cr*.

Zoals beschreven in hoofdstuk 2, 3, en 4 is met moleculaire karakterisering gebleken dat chromosomaal gecodeerde resistentie, zoals de mutaties in *GyrA*, *ParC*, *ParE*, chromosomale efflux activiteit, *c-AmpC* met zijn promoter/attenuator regio ook een belangrijke rol spelen. Hoewel verschillende technieken als multiplex PCR en sequentieanalyse, qRT-PCR en microarrays zijn gebruikt in verschillende hoofdstukken van dit proefschrift, is het gebruik hiervan niet toereikend om alle betrokken genen te kunnen onderzoeken. In het huidige tijdperk van multiresistente bacteriën zijn moleculaire technieken nodig, die het hele genoom kunnen onderzoeken in één test.

De toepassing van NGS in een klinisch microbiologisch laboratorium zal alle informatie verstrekken: de identificatie van de species, de gevoeligheid voor antibiotica, de virulentie kenmerken en typering en tenslotte ook de hoeveelheid van de aanwezige species. Mogelijk kan NGS uiteindelijk de meeste, zo niet alle huidige fenotypische microbiologische methoden vervangen. Als NGS aan deze verwachtingen kan voldoen, zal dit een revolutie betekenen in de microbiologische diagnostiek en de klinische praktijk. Naast het gebruik van snelle en gevoelige detectie van resistentiemechanismen door niet-fenotypische testen, zal actieve realtime monitoring en surveillance belangrijker gaan worden.