

Cover Page



Universiteit Leiden

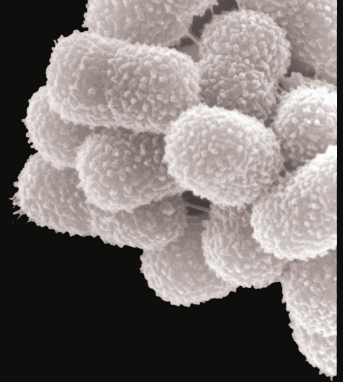


The handle <http://hdl.handle.net/1887/19114> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Breij, Anastasia de

Title: Towards an explanation for the success of *Acinetobacter baumannii* in the human host

Issue Date: 2012-06-20



Chapter 9

Dutch summary (Nederlandse samenvatting)

Inleiding

Acinetobacter baumannii is een belangrijke ziekenhuisbacterie die vooral bij ernstig zieke patiënten, zoals patiënten op intensive care afdelingen, aanleiding kan geven tot kolonisatie en infecties. Infecties veroorzaakt door deze bacterie variëren van pneumonie, urineweg-, huid- en wondinfecties tot bacteriëmie met sepsis. Behandeling kan problemen geven omdat stammen dikwijls resistent zijn voor meerdere of zelfs alle bruikbare antibiotica. Het zijn vooral de antibiotica-resistente stammen die zich epidemisch onder patiënten kunnen verspreiden. Er zijn drie groepen van genetisch verwante *A. baumannii* stammen, de zogenaamde Europese klonen I, II en III, die verantwoordelijk zijn voor epidemieën in ziekenhuizen wereldwijd.

Naast *A. baumannii* zijn er twee nauw verwante species, *A. pittii* en *A. nosocomialis*, die relatief vaak in klinische materialen kunnen voorkomen en soms ook antibiotica-resistent zijn. Sommige van de overige *Acinetobacter* species kunnen ook bij de mens voorkomen en infecties geven, maar het beloop van zulke infecties is vaak mild en goed behandelbaar. Of de aanwezigheid van acinetobacters bij een patiënt tot ziekte leidt, wordt bepaald door de balans tussen de weerstand van de gastheer en de virulentie van de bacterie. Er is vooralsnog weinig bekend over de factoren die geassocieerd zijn met de pathogenese van *A. baumannii* infecties. De studies beschreven in dit proefschrift hadden tot doel meer inzicht te krijgen in deze factoren.

Dit proefschrift

Aangezien hechting een cruciale eerste stap is in het kolonisatieproces, hebben wij onderzocht of er verschil bestaat in het vermogen van diverse *Acinetobacter* stammen en species om te hechten aan humaan luchtwegepitheel. De resultaten in **hoofdstuk 2** tonen dat zowel *A. baumannii* stammen als stammen van de klinisch minder relevante species *A. junii* kunnen hechten aan luchtwegepitheel. De mate van hechting varieerde sterk tussen de stammen binnen de twee species. Nadat bacteriën gehecht zijn aan een biotisch of abiotisch oppervlak kunnen zij zich vermenigvuldigen, microkolonies vormen en een beschermende slijm laag (bestaande uit o.a. exopolysacchariden) produceren. Dit kan leiden tot een gestructureerd netwerk van bacteriën ingebed in een polysaccharidenlaag: een biofilm. Bacteriën in een biofilm zijn resistenter voor factoren van buitenaf, zoals antibiotica en effectorcellen van het immuunsysteem. Het vermogen van een groot aantal *Acinetobacter* stammen en species om biofilm te vormen op een abiotisch oppervlak is vergeleken in **hoofdstuk 2**. Ondanks het verschil in de mate van biofilmvorming tussen

individuele stammen was er geen verschil tussen de klinisch relevante species *A. baumannii*, *A. pittii* en *A. nosocomialis* en de klinisch minder relevante species *A. junii* en *A. calcoaceticus*. Deze studie toont dat hechting aan slijmvlies en biofilmvorming op een abiotisch oppervlak een algemeen kenmerk is van *Acinetobacter* stammen, ongeacht de species.

Tijdens epidemieën vormt de gekoloniseerde huid een belangrijk reservoir van *A. baumannii*. In **hoofdstuk 5** en **7** is een driedimensionaal humaan huidmodel gebruikt om de hechting aan en biofilmvorming op een fysiologisch relevant biotisch oppervlak nader te bestuderen. Zowel stammen van *A. baumannii*, *A. pittii*, *A. nosocomialis* als de klinisch minder relevante *A. junii* konden hechten aan de huidcellen en zich vermenigvuldigen. Opvallend was dat een stam van de klinisch niet-relevante *A. calcoaceticus* niet kon persisteren op het huidmodel. Hoewel al deze stammen een biofilm vormden op plastic, ontwikkelden uitsluitend de drie klinisch relevante species een biofilm op de huidmodellen. Dit suggereert dat biofilmvorming ook afhankelijk is van het oppervlak waaraan de bacteriën gehecht zijn.

Om de verschillen in de mate van hechting en biofilmvorming tussen *Acinetobacter* stammen te kunnen verklaren, onderzochten we mogelijke mechanismen die een rol spelen bij deze kolonisatieprocessen. Pili, haarachtige structuren op het oppervlak van de bacterie, maken hechting van bacteriën aan (a)biotische oppervlakken en aan andere bacteriën mogelijk. In **hoofdstuk 3** is beschreven dat de zogenaamde CsuA/BABCDE-pili, waarvan bekend is dat zij noodzakelijk zijn voor hechting en biofilm vorming van de *A. baumannii* tpeestam op plastic, geen rol spelen in de hechting van deze stam aan luchtwegeepitheel. Ook voor een grotere set *A. baumannii* stammen was er geen relatie tussen de aanwezigheid van pili en de mate van hechting aan epitheel of biofilm vorming op plastic (**hoofdstuk 2**).

Hechting van bacteriën aan de huid of slijmvliesen van de gastheer kan een ontstekingsreactie opwekken, gekenmerkt door de productie van ontstekingsmediatoren zoals chemokines en cytokines en de recruterende van ontstekingcellen naar het geïnfecteerde weefsel. Deze ontstekingscellen spelen in het algemeen een belangrijke rol in het verwijderen van de bacteriën. In **hoofdstuk 2** is de productie vergeleken van specifieke ontstekingsmediatoren door luchtwegeepitheelcellen in reactie op *A. baumannii* en *A. junii*. Hoewel stammen van beide species even goed konden hechten aan deze cellen, wekten *A. baumannii* stammen significant minder ontstekingsmediatoren (interleukine (IL)-6) en chemokines (IL-8) op dan *A. junii* stammen. Dit verschil was nog groter in humane macrofagen, die behoren tot de eerste ontstekingscellen waar bacteriën mee in aanraking komen in het weefsel. Aangezien de productie van ontstekingsmediatoren cruciaal wordt geacht voor het verwijderen van de bacteriën,

veronderstelden wij dat *A. baumannii* stammen mogelijk kunnen overleven en persisteren in de luchtwegen van patiënten en ziekte kunnen veroorzaken doordat zij een zwakke ontstekingsreactie opwekken. Deze hypothese hebben wij in **hoofdstuk 4** getoetst met behulp van een muismodel voor pneumonie. Binnen *A. baumannii* was er een duidelijk verschil in het beloop van de luchtweginfectie te zien: *A. baumannii* stammen behorend tot Europese kloon I en II waren zeer virulent, en veroorzaakten hoge morbiditeit en mortaliteit. Een Europese kloon III stam en een sporadische, antibiotica-gevoelige stam vermenigvuldigden zich in dezelfde mate in de longen en verspreidden zich in de bloedbaan van de muis. Echter, deze laatste twee stammen veroorzaakten minder symptomen. De stam behorend tot de laag-virulente species *A. junii* werd snel verwijderd uit de longen en veroorzaakte geen ziekte. Dit zou verklaard kunnen worden door de effecten van een sterke ontstekingsreactie opgewekt door deze stam zoals in vitro het geval was. De typestam van *A. baumannii*, een stam die veelvuldig gebruikt wordt in virulentiestudies, overleefde ook niet in de muis en veroorzaakte geen ziekte. Deze bevindingen benadrukken dat er een groot verschil is in virulentie tussen *A. baumannii* stammen. Met behulp van dit muismodel konden we ook vaststellen dat het aangeboren immuunsysteem van de gastheer verschillend reageert op *A. baumannii* stammen. Zo wekten de minder virulente *A. baumannii* stammen meer specifieke ontstekingsmediatoren (de ontstekingsstimulerende IL-12p40 en IL-23 en het ontstekingsremmende IL-10) op dan de virulente stammen. Verdere studies zullen de rol van deze ontstekingsmediatoren in het beloop van *A. baumannii* infecties moeten ophelderen.

Ook zonder direct contact kunnen bacteriën de gastheercel beïnvloeden, namelijk door middel van blaasjes afgesnoerd van hun buitenmembraan (vesicles), die door de gastheercel kunnen worden opgenomen. Deze vesicles kunnen virulentiefactoren bevatten die langs deze weg in de gastheercel terecht komen. In **hoofdstuk 6** is de productie van membraanvesicles door de typestam van *A. baumannii* onderzocht met behulp van electronen-microscopische technieken. Deze *A. baumannii* stam vormde verschillende typen membraanvesicles, afhankelijk van de groeifase van de bacterie. Vervolgstudies moeten uitwijzen of deze verschillende membraanvesicles virulentiefactoren bevatten en de gastheer beïnvloeden.

Om mogelijke species-specifieke kenmerken te identificeren die het verschil in klinisch gedrag tussen *Acinetobacter* species kunnen verklaren, is een zogenaamde systeemstudie uitgevoerd, waarbij genomische, metabolische en virulentiestudies werden gecombineerd binnen een internationaal samenwerkingsproject (**hoofdstuk 5**). Een divers repertoire aan genen die een rol spelen in het metabolisme werden geïdentificeerd in alle zes geteste *A. baumannii* stammen. Slechts enkele van deze genen waren uniek voor *A.*

baumannii in vergelijking met klinisch minder relevante *Acinetobacter* species. Echter, wanneer het genoom van één *A. baumannii* stam vergeleken werd met dat van een *A. calcoaceticus* stam, werden meerdere unieke genclusters geïdentificeerd, waaronder het *csu* operon (dat codeert voor de hierboven beschreven CsuA/BABCDE-pili) en een gencluster dat een rol speelt bij ijzeropname. Daarnaast lieten de metabolische studies zien dat de *A. baumannii* stam efficiënter stikstofbronnen kon gebruiken en resistenter was voor pH, osmotische en antibiotica stress dan *A. pittii*, *A. nosocomialis* en *A. calcoaceticus* stammen. *A. baumannii* en *A. pittii* konden minder goed fosfaatbronnen gebruiken om te groeien dan *A. nosocomialis* en *A. calcoaceticus*. Juist deze laatstgenoemde species konden niet overleven in een muismodel van een dijbeenspierinfectie. Deze resultaten suggereren dat het klinische succes van *Acinetobacter* species afhankelijk is van genetische verschillen die een functionele impact hebben op metabolische en virulentie-eigenschappen.

Conclusie

De aanwezigheid van meerdere virulentiefactoren in zowel *A. baumannii* als klinisch minder relevante *Acinetobacter* species, toont aan dat het klinische succes van *A. baumannii* niet alleen verklaard kan worden door deze virulentiefactoren. Het vermogen van bepaalde *A. baumannii* stammen om een specifieke gastheerrespons op te wekken in combinatie met hun genetische flexibiliteit, metabolische verscheidenheid en antibiotica-resistentie zijn waarschijnlijk alle belangrijke factoren die geassocieerd zijn met het klinische succes van deze bacterie. Het werk beschreven in dit proefschrift is een stap naar het ophelderen van de factoren die een rol spelen in de pathogenese van *A. baumannii*, wat essentieel is voor de ontwikkeling van nieuwe diagnostische en therapeutische strategieën ten aanzien van infecties door deze bacterie.