

..... Samenvatting en discussie

Sinds enkele decennia wordt methicilline-resistentie bij *S. aureus* gezien als een menselijk probleem. Vroeger was het beperkt tot de zorgsector, maar later werd het ook een probleem in de algemene bevolking. Dit veranderde in 2005 door veegerelateerde MRSA CC398 bij varkens en varkenshouders in Nederland. Deze onverwachte ontdekking gaf aanleiding tot een wereldwijd onderzoek en toonde MRSA CC398 in verschillende dieren aan, voornamelijk in de intensieve veehouderij met een hoog antibioticagebruik, zoals in de varkens-, vleeskalveren-, melkvee- en vleeskuikenindustrie. Mensen die direct contact hebben met besmette dieren, dragen vaak MRSA CC398. Gezien de wereldwijde verspreiding van MRSA CC398 onder voedselproductie dieren, is het onwaarschijnlijk dat dit eenvoudig kan worden verminderd. De opkomst van MRSA CC398 vormt een bedreiging voor de succesvolle bestrijdingsstrategie in Nederland. Om de mogelijke gevolgen van MRSA CC398 te bepalen is het noodzakelijk de dynamiek, overdraagbaarheid en virulentie van deze MRSA kloon te onderzoeken. Het onderzoek in dit proefschrift heeft als doel meer inzicht te krijgen in de dynamiek en ziektelast van MRSA CC398 dragerschap bij dierenartsen. Daarnaast hebben we geprobeerd om de overdracht van MRSA CC398 van dierenartsen naar hun gezinsleden en de determinanten te bepalen.

..... Detectie en gevoeligheidsbepalingen van MRSA CC398

Bij MRSA CC398 isolaten is wereldwijd een grote diversiteit van feno- en genotypische antimicrobiële resistentie waargenomen. Deze verscheidenheid komt waarschijnlijk door de verhoogde capaciteit van de CC398 kloon om extern DNA op te nemen, gecombineerd met het feit dat MRSA CC398 isolaten wereldwijd zijn onderworpen aan verschillende antimicrobiële selectiedruk. Er zijn een groot aantal resistentiegenen in MRSA CC398 waargenomen, zoals genen die typerend zijn voor zowel menselijke en dierlijke stafylokokken. De overgrote meerderheid van de MRSA CC398 stammen zijn relatief gevoelig voor de meeste niet-beta-lactam antibiotica. Behalve tetracycline, waarvoor deze stammen bijna altijd resistent zijn. Dit komt waarschijnlijk door het uitgebreide gebruik van dit antibiotica in de veehouderij. Ook zijn zink en andere metalen vaak in diervoer gebruikt en hierdoor worden MRSA CC398 stammen die het *czrC* zink resistentiegen dragen uitgeselecteerd. Deze hypothese wordt ondersteund doordat de meeste MRSA CC398 stammen SCC*mec* type Vc dragen die het *czrC* gen

bevat. Omdat tigecycline een derivaat is van tetracycline, is het belangrijk om de activiteit van dit nieuwe geneesmiddel voor MRSA CC398 te bepalen.

In het onderzoek werd aangetoond dat tigecycline een brede *in vitro* activiteit heeft tegen een verzameling MRSA isolaten uit Nederland, waaronder veegeassocieerde stammen (hoofdstuk 2). Met de aanbevolen methode werden drie resistente stammen gevonden. Echter, de resultaten voor tigecycline worden beïnvloed door de concentratie van mangaan in het medium. Aanvullend onderzoek toonde aan dat deze stammen gevoelig waren wanneer Iso-Sensitest medium werd gebruikt. Dit verschil verdient nader onderzoek naar de beste testomstandigheden omdat de interpretatie van de *in vitro* gevoeligheid voor tigecycline wezenlijk anders is.

De uitbreiding van MRSA buiten de bekende grenzen vormt een extra uitdaging voor microbiologische laboratoria om hun screeningstrategieën te verbeteren. De methoden om MRSA aan te tonen in klinische monsters hebben idealiter een hoge sensitiviteit en specificiteit in combinatie met een korte rapportagetijd. Er zijn selectieve media ontwikkeld om *S. aureus* eenvoudiger en betrouwbaar uit verontreinigde monsters te identificeren. Hoofdstuk 3 beschrijft de evaluatie van de *in vitro* sensitiviteit en specificiteit van het nieuwe selectieve medium Oxoid *Brilliance*TM MRSA. Hiervoor werd een goed gedefinieerde verzameling gebruikt bestaande uit 266 MRSA stammen, 257 methicilline-gevoelige *S. aureus* (MSSA) stammen en 265 coagulase-negatieve stafylokokken (CNS). Oxoid *Brilliance*TM MRSA bleek een zeer betrouwbare screeningsmethode te zijn voor de detectie van MRSA.

Er zijn meerdere klinische studies uitgevoerd om verschillende selectieve media te evalueren voor de detectie van MRSA uit klinische monsters. Oxoid *Brilliance*TM MRSA Agar en bioMérieux chromID® MRSA medium werden geëvalueerd op hun vermogen om methicilline-resistente *Staphylococcus aureus* te identificeren in klinische monsters (hoofdstuk 4). Er werden neus- en keelmonsters ($n = 629$) van dierenartsen en hun gezinsleden genomen. De sensitiviteit van Oxoid *Brilliance*TM MRSA Agar en chromID® MRSA medium waren na 20 uur incubatie 63,6 en 64,5% en de specificiteit waren 94,1 en 99,4%. Na een ophopingsstap werd de sensitiviteit verhoogd tot 96,3 en 97,2%, maar de specificiteit daalde naar 88,7 en 98,5%. In een andere klinische evaluatie werd Bio-Rad MRSASelectTM medium beoordeeld op haar vermogen om MRSA aan te tonen van neusmonsters van varkenshouders en hun gezinsleden (hoofdstuk 5). In totaal werden 257 monsters geënt op Bio-Rad MRSASelectTM medium met én zonder bouillonophoping en op chromID® MRSA met bouillonophoping. De sensitiviteit van Bio-Rad MRSASelectTM medium zonder bouillonophoping was 63,9%. Met bouillonophoping werd de sensitiviteit verhoogd tot 98,4%. De specificiteit was 95,4% zowel met als zonder bouillonophoping. Oxoid *Brilliance*TM MRSA Agar, Bio-Rad

MRSASelect™ medium en chromID® MRSA medium zijn allen gevoelige methoden voor het screenen van MRSA in combinatie met bouillonophoping. Positieve resultaten dienen nog wel bevestigd te worden. Ondanks de commerciële inspanningen om nieuwe media te ontwikkelen met een hoge sensitiviteit, toonden de studies in dit proefschrift, evenals anderen, een aanzienlijke toename van de sensitiviteit na ophoping in vergelijking met directe kweken. Daarom blijft bouillonophoping noodzakelijk voor een betrouwbare detectie van MRSA.

..... Prevalentie van MRSA CC398

Uit een case-control studie van Loo et al. is gebleken dat direct contact met varkens en vleeskalveren de belangrijkste risicofactor is voor MRSA CC398 dragerschap. Deze studie leidde in juli 2006 tot een wijziging van het Nederlandse 'search en destroy' beleid. Hierin werd gesteld dat patiënten die in contact komen met levende varkens of vleeskalveren bij een ziekenhuisopname gescreend en geïsoleerd dienen te worden. Enkele jaren later rapporteerden diverse Nederlandse studies MRSA CC398 prevalenties van positieve bedrijven variërend van 23% tot 81%, terwijl de prevalentie bij individuele varkens varieert van 11 tot 39%. Ook werd in de vleesklaverensector een hoge MRSA CC398 prevalentie gevonden: 88% van de bedrijven en 28% van de kalveren waren namelijk positief getest. De extreem hoge MRSA CC398 prevalentie onder vee resulteert in een zeer hoog dragerschap bij mensen die in contact komen met deze dieren. Broens et al. hebben aangetoond dat de prevalentie in de varkensstapel van 30% in begin 2007 naar 75% aan het eind van 2008 is gestegen. Ook de prevalentie van MRSA CC398 bij varkenshouders in recentere gepubliceerde studies zijn hoger dan oudere studies: van 29% in 2007 tot 63% in 2010. Bovendien, het dragerschap percentage van MRSA CC398 bij dierenartsen in hoofdstuk 8 is hoger dan alle eerdere studies (MRSA prevalentie in dierenartsen varieert van 12,5 % tot 45% in verschillende internationale studies).

Om te beoordelen hoe de verspreiding van deze nieuwe variant van MRSA in de algemene bevolking is, zijn er mensen gescreend die het hoogste risico van dragerschap hebben. Deze studie onderzocht of MRSA CC398 verspreid is van de boerderijen naar de rest van de gemeenschap in gebieden met een extreem hoge dichtheid van varkensbedrijven. De resultaten van deze studie worden beschreven in hoofdstuk 6. Met behulp van een mailing in 3 geselecteerde gemeenten in Nederland, werden volwassenen gevraagd een vragenlijst in te vullen en een neuskweek af te nemen. In totaal werd er van 583 personen volledige informatie verkregen. Slechts één

van de 534 personen zonder veecontact werd (0,2%; 95% CI <0,01–1,2) positief getest op MRSA. In tegenstelling, 13 (26,5%; 95% CI 16,1–40,4) van de 49 personen met veecontact (ofwel werken op of leven op een veehouderij) werd positief getest op MRSA. Alle gevonden MRSA stammen hadden *spa*-typen die tot de bekende veegeassocieerde CC398 kloon behoren.

..... Oorsprong en epidemiologie van de CC398 kloon

Op een groot aantal CC398 isolaten werden microarrays en whole genome sequencing toegepast en hierbij worden twee varianten binnen de CC398 kloon onderscheiden. Het betreft de klassieke veegeassocieerde variant, deze isolaten zijn verantwoordelijk voor frequente kolonisatie bij veehouders en dierenartsen, echter veroorzaken sporadisch infecties; en een menselijke variant. Deze menselijke variant bestaat weer uit twee subpopulaties: het voorouderlijke subtype en het aan de mens aangepaste niet-veegerelateerde subtype. Deze laatste veroorzaakt in toenemende mate wereldwijd ernstige infecties bij mensen zonder diercontact en die daarbij eenvoudig lijkt te verspreiden tussen mensen. Price et al. suggereren dat veegerelateerde MRSA CC398 afkomstig is van de menselijke MSSA CC398 variant die pas recent het *mecA* gen heeft overgenomen tijdens zijn overgang naar het dierenrijk. Deze mens-op-dier overgang ging gepaard met het verlies van immune evasion cluster (IEC) genen én tegelijkertijd werving van tetracycline resistentie door het *tet(M)* gen.

De twee CC398 varianten worden gekenmerkt door verschillende profagen. Veegeassocieerde CC398 isolaten dragen vaak $\phi 2$ en $\phi 6$, of een $\phi Av\beta$ profaag. Isolaten die daarentegen behoren tot de menselijke variant bevatten een β -omzetting $\phi 3$ profaag die coderen voor twee menselijke specifieke virulentiegenen (*chp* en *scn*). Er is nu bewijs dat de aan de mens aangepaste subpopulatie verschilt van de voorouderlijke menselijke subpopulatie door de extra profaag functies ($\phi 1$, $\phi 2$, $\phi 5$ of $\phi 7$).

Deze menselijke CC398 variant wordt nu steeds vaker gevonden in ziekenhuizen. Ook is er een sterke stijging in de prevalentie van *S. aureus* CC398 in bloedbaaninfectie waargenomen in een recente studie. Zeventien van de 18 bloedbaaninfectie isolaten waren methicilline-gevoelig en geen enkele behoorde tot de veel voorkomende veegeassocieerde *spa*-types t011, t034 of t108. De wijze waarop de *S. aureus* isolaten CC398 door de patiënten zijn verkregen blijft onduidelijk. Bovendien werden alle *S. aureus* CC398 bloedbaaninfecties gediagnosticeerd bij patiënten die niet blootgesteld

waren aan vee. Deze ernstige infecties zijn geassocieerd met MSSA CC398 *spa*-type t571. Deze resultaten werden ook bevestigd door onze studie (hoofdstuk 7). Er werden in totaal 612 opeenvolgende episoden van *S. aureus* bloedbaaninfecties geïncubeerd. Drie stammen (2 MSSA en MRSA 1) die werden geïsoleerd uit bacteriële patiënten tussen 2010–2011 waren positief met een CC398-specifieke PCR. Er was een duidelijke toename in prevalentie van *S. aureus* CC398 bloedbaaninfecties tussen 2010–2011 ten opzichte van de collecties die werden geïsoleerd tussen 1996–1998 en 2002–2005 (3/157, 1.9% vs. 0/455, 0,0%; $p = 0,017$). Wij concluderen dat *S. aureus* CC398 een toenemende oorzaak van invasieve stafylokokken ziekte zou kunnen zijn. Onze resultaten zijn gelijk aan andere bevindingen dat bepaalde *S. aureus* isolaten CC398, vooral *spa*-type t571, invasieve infecties kunnen veroorzaken bij mensen.

..... Dynamiek van MRSA CC398 dragerschap

Er is nog steeds discussie over de dynamiek van MRSA CC398 dragerschap bij mensen met regelmatig veecontact. Vraag is of een MRSA CC398 positief persoon echt gekoloniseerd is of alleen maar MRSA besmette stof heeft ingeademd tijdens het werk, zonder daarbij echt gekoloniseerd te zijn. Dit is een belangrijk onderscheid, omdat kolonisatie met MRSA CC398 waarschijnlijk minder vaak tot infecties leidt en dat personen deze mogelijk sneller weer kwijt raakt na een periode van niet-blootstelling. Cuny et al. vonden een extreem hoge MRSA CC398 neuskolonisatie van 45% bij dierenartsen. Dragerschap kan ook langdurig zijn, zoals in een recent rapport uit Duitsland, waar de meerderheid van de varkenshouders (59%) hun MRSA CC398 niet kwijt raakte na de vakantie. In tegenstelling tot dit, als vrijwilligers actief werden gekoloniseerd met methicilline-gevoelige *S. aureus* (MSSA) CC398 droegen ze deze vaak voor langere perioden. We hebben een prospectieve cohort studie gedurende twee jaar uitgevoerd met 137 dierenartsen die vooral werken met varkens en vleeskalveren (hoofdstuk 8). Deze studie toonde een gemiddelde MRSA CC398 prevalentie van 44% aan (bereik 42–46%). In totaal werden er bij 88 dierenartsen (65%) tenminste eenmaal MRSA CC398 gevonden. Tweeëndertig dierenartsen (23%) hadden MRSA-positieve testresultaten gedurende de gehele onderzoeksperiode en 18 van hen (56%, 13% van alle dierenartsen) hadden vijf identieke MLVA types en kunnen dus worden beschouwd als persisterende MRSA CC398 dragers. Aan de andere kant zijn er diverse studies die aantonen dat MRSA CC398 geen goede kolonisator van mensen is. Een studie onder veldwerkers met kortdurende blootstelling aan varkens en vleeskalveren vond een hoge mate van voorbijgaande verontreiniging, zonder

substantiële persistente kolonisatie. Een andere studie toonde aan dat de prevalentie van MRSA bij vleeskalveren sterk afnam (58%) na afwezigheid van dierlijk contact. De redenen voor deze tegenstrijdige bevindingen zijn onduidelijk en vereisen nader onderzoek.

Wij concluderen echter dat regelmatig contact met vee inderdaad kan leiden tot persistente kolonisatie met MRSA CC398. Dierenartsen die vooral werken met varkens en vleeskalveren dragen vaak dezelfde stam voor langere periodes.

..... Mens-op-mens overdracht van MRSA CC398

Mens-op-mens overdracht is de belangrijkste determinant voor de verspreiding naar de algemene populatie. De omvang van de bedreiging van de volksgezondheid is voornamelijk afhankelijk van deze eigenschap, in combinatie met stamvirulentie. Verschillende recente studies hebben aangetoond dat MRSA CC398 in een ziekenhuis omgeving 4–6 keer minder vaak overdraagt in vergelijking met ziekenhuisgerelateerde MRSA stammen. Dit beperkt de gevolgen voor de volksgezondheid en het aanpassen van de controlemaatregelen zou gerechtvaardigd zijn. Op dit moment is de mens-op-mens overdraagbaarheid van MRSA CC398 in een huishoudelijke omgeving echter nog onduidelijk. Daarbij is het bestuderen van de mens-op-mens overdraagbaarheid van MRSA CC398 lastig, omdat het reservoir van MRSA CC398 beperkt is tot mensen die direct contact hebben met dieren. De meerderheid van deze personen leven op boerderijen samen met hun gezinnen. Deze gezinsleden hebben meestal zelf direct diercontact. Daarom zijn dierenartsen een uitstekende groep voor het bestuderen van de mens-op-mens overdraagbaarheid van MRSA CC398 omdat hun gezinsleden zelf geen direct contact hebben met varkens of vleeskalveren. We hebben een prospectieve cohort studie bij Nederlandse dierenartsen en hun gezinsleden uitgevoerd (hoofdstuk 9). Ons onderzoek toonde een relatief hoge gemiddelde MRSA CC398 kolonisatie van 4,0% bij de gezinsleden. In totaal werd er bij 36 gezinsleden (9,3%), afkomstig uit 28 gezinnen (20,4%), tenminste één keer MRSA CC398 aangetoond tijdens de studieperiode van één jaar. Deze gegevens bevestigen de resultaten van een in Duitsland eerdere uitgevoerde studie waar een MRSA CC398 prevalentie van 9,0% onder de gezinsleden van dierenartsen werd gevonden. In ons onderzoek bleek de MRSA CC398 dragerschap bij gezinsleden sterk afhankelijk van de dragerschap status van de dierenarts te zijn.

Om daarnaast de overdraagbaarheid van MRSA CC398 stammen te vergelijken met andere MRSA isolaten, werd een cross-sectionele studie uitgevoerd in MRSA-positieve patiënten en hun gezinsleden. De MRSA prevalentie onder de gezinsleden was significant hoger bij controle patiënten met MRSA niet-CC398 stammen dan bij dierenartsen met MRSA CC398 (prevalentie risico ratio 6,0; 95% CI 2,4–15,5). Deze gegevens suggereren dat MRSA CC398 zich minder eenvoudig verspreidt tussen mensen dan andere MRSA isolaten in een huishoudelijke omgeving.

Ondanks het omvangrijke reservoir bij dieren én mensen die werken met vee, is de MRSA CC398 prevalentie onder mensen die niet direct betrokken zijn in de veeteelt opvallend laag. Eén van de eerste studies die het leven in een veerijk gebied onderzocht vond dit geen risicofactor (hoofdstuk 6). In deze cross-sectionele studie bleek dat slechts 0,2% van de volwassenen zonder veecontact positief waren voor MRSA CC398. Inmiddels zijn er een aantal recente studies waaruit blijkt dat MRSA CC398 zich al wel heeft verspreid in de algemene bevolking. De manieren waarop MRSA CC398 kan worden overgedragen aan mensen zonder veecontact zijn direct contact met MRSA-positieve personen, omgevingsverontreiniging en eten of hanteren van besmet vlees. In een recente studie van Lekkerkerk et al. bleek dat MRSA van onbekende oorsprong (MUO) aan het toenemen is. De nationale gegevens van de MRSA surveillance (2008–2009) werden geanalyseerd op epidemiologische determinanten en genotypische kenmerken. Een kwart (24%) van de 5545 MRSA isolaten waren MUO, d.w.z. niet behorend tot één van de bekende risicogroepen. Twee verschillende genotypische MUO groepen werden onderscheiden: MUO CC398 (352, 26%) en MUO niet-CC398 (998, 74%). Dit suggereert een verspreiding van MUO CC398, echter niet door direct contact met dieren (varkens, vleeskalveren), maar door andere risicofactoren.

Ook is verspreiding van MRSA CC398 binnen een gezondheidszorginstelling in verschillende studies waargenomen. De eerste beschreven ziekenhuisgeassocieerde uitbraak van MRSA CC398 heeft zich voorgedaan in Nederland. De auteurs vonden vijf patiënten met MRSA CC398 kolonisatie en/of infectie. Alle stammen behoorden tot CC398 en hadden *spa*-type t567. Verder wordt er in hoofdstuk 10 een uitbraak van MRSA CC398 in een verpleeghuis in Nederland beschreven. Er werden zeven bewoners en twee werknemers in de gezondheidszorg met MRSA CC398 geïdentificeerd. De MRSA stam die verantwoordelijk was voor deze uitbraak had *spa*-type t011, welke behoort tot de CC398 kloon. De meest waarschijnlijke menselijk bron woonde tot voor kort op een varkensbedrijf, voordat hij naar het verpleeghuis verhuisde. Hij meldde nog regelmatig op bezoek te gaan naar het varkensbedrijf van zijn zoon.

Echter zijn MRSA CC398 isolaten moeilijk te onderscheiden door de huidige moleculaire typeringstechnieken, zoals *spa*-typen, MLST en MLVA. Hoewel de PFGE met restrictie enzym *Cfr9I* een veel betere differentiatie van CC398 geeft, is deze methode omslachtig en levert gegevens op die niet eenvoudig elektronisch uitgewisseld kunnen worden. Dit belemmert studies naar mogelijke verspreidingen en uitbraken door deze MRSA kloon. In hoofdstuk 11 wordt de typeringsmethode whole genome mapping (WGM) beschreven. WGM heeft een hoog onderscheidend vermogen waardoor deze geschikt lijkt om MRSA CC398 verspreiding te identificeren. Het onderscheidend vermogen werd bevestigd doordat WGM de MRSA CC398 isolaten van epidemiologisch ongerelateerde dierenartsen kon differentiëren waarvan *spa*- en MLVA-typering geen duidelijk onderscheid kon maken. Verder werd WGM uitgevoerd om te beoordelen of deze techniek geschikt was om overdracht van MRSA CC398 in een huishoudelijke omgeving te identificeren. Er werden vrijwel identieke WGMs van de isolaten afkomstig van dierenartsen en hun gezinsleden gevonden. Wij concluderen dat WGM een geschikte methode is om overdracht van MRSA CC398 te identificeren, die niet mogelijk zou zijn geweest met behulp van *spa*-typering of MLVA. Bij gebruik van PFGE zou er veel meer onzekerheid zijn geweest. We zijn momenteel bezig WGM uit te voeren van een groter aantal isolaten van dierenartsen en hun gezinsleden om MRSA CC398 overdracht nader te bestuderen.

..... Virulentie van MRSA CC398

De capaciteit van veegerelateerde MRSA CC398 om infecties bij de mens te veroorzaken is reeds beschreven. Deze variëren van relatief kleine of gelokaliseerde infecties tot meer ernstige of invasieve infecties (hoofdstuk 6). Ondanks de diversiteit aan soorten infecties wordt er gesuggereerd dat MRSA CC398 minder virulent is dan andere menselijke MRSA stammen. Toch is de exacte ziektelast die geassocieerd is met MRSA CC398 dragerschap bij relatief gezonde personen grotendeels onbekend. Gezien de grote verspreiding van MRSA CC398 bij mensen met veecontact is er behoefte aan het bestuderen van infecties die veroorzaakt worden door MRSA CC398.

Onze prospectieve cohort studie toont aan dat persisterende MRSA CC398 evenals persisterende *S. aureus* dragers significant meer huid- en weke delen infecties hadden dan *S. aureus* niet-dragers tijdens een studie van twee jaar (hoofdstuk 12). Onze gegevens bevestigen de resultaten van verschillende studies dat MRSA CC398 dragerschap vooral matige tot ernstige huid- en weke delen infecties veroorzaakt. Een

andere recente studie heeft aangetoond dat MRSA CC398 niet minder pathogeen was voor de mens dan *S. aureus* in het algemeen.

Wij vonden een vergelijkbaar risico op huid- en weke delen infecties tijdens de onderzoeksperiode onder MRSA CC398 en MSSA dragers. Dit betekent dat de huid- en weke delen infecties alleen door *S. aureus* dragerschap zijn veroorzaakt en niet doordat deze stammen methicilline-resistent zijn. Hoofdstuk 8 beschrijft een opmerkelijk hoge gemiddelde *S. aureus* dragerschap (72%) bij dierenartsen, dit is zeer hoog in vergelijking met de algemene bevolking. Dierenartsen hebben meer kans om een huid- en weke delen infectie te ontwikkelen in vergelijking met de algemene bevolking en hierdoor zou *S. aureus* dragerschap (MRSA CC398 en MSSA) kunnen gezien worden als een beroepsrisico.

..... Bedreiging van de volksgezondheid door MRSA CC398

De voorgaande alinea's hebben aangetoond dat er een gevaar voor de volksgezondheid kan ontstaan door veegerelateerde MRSA CC398. Op dit moment lijkt MRSA CC398 in de gezondheidszorginstellingen onder controle te zijn. De gevolgen voor de volksgezondheid van MRSA CC398 lijken op het moment laag te zijn, dit blijkt uit de beperkte verspreiding in de gemeenschap en de minimale hoeveelheid van ernstige invasieve infecties door MRSA CC398, zoals beschreven in hoofdstukken 6 en 7. Terwijl de prevalentie in de veehouderij waarschijnlijk dicht bij het verzadigingspunt is, leidt MRSA CC398 zelden tot ernstige problemen in ziekenhuizen. Toch maken experts zich zorgen dat de mogelijke snelle evolutie van MRSA CC398 kan resulteren in nieuwe eigenschappen in de nabije toekomst, omdat MRSA CC398 mobiele genetische elementen tussen stammen kan uitwisselen. Dit suggereert dat deze kloon zich snel zou kunnen aanpassen aan veranderingen. Een studie met whole genome sequencing heeft aangetoond dat veegerelateerde MRSA CC398 ontstaan is in de mens, en bij het overgaan naar de veestapel een aantal genen verloor, terwijl het resistentiegenen erbij kreeg. Dit baart zorgen over een mogelijke omgekeerde gebeurtenis (overname van virulentiefactoren met behoud van resistentie eigenschappen) vanuit het immense reservoir in de veestapel. Er is nu bewijs uit een recente studie dat veegerelateerde MRSA CC398 zich kan aanpassen aan de mens. Hybridisatie van DNA met microarrays toonde in deze studie geen resten van veegeassocieerde profagen in het genoom van de voorouderlijke menselijke subpopulatie. Daarentegen delen de aan de mens aangepaste isolaten en de

veegeassocieerde isolaten bepaalde profaag elementen wat een dierlijke oorsprong suggereert. Deze bevindingen vereisen echter nader onderzoek om dit te bevestigen.

..... Toekomstig onderzoek

De twee jaar durende prospectieve cohort studie die in hoofdstukken 8, 9 en 12 wordt beschreven bevat waardevolle epidemiologische informatie. MRSA en MSSA isolaten werden verzameld uit dierenartsen en hun gezinsleden die geen contact met vee hadden. Verdere moleculaire karakterisatie met geavanceerde typeringsmethoden kunnen meer inzicht geven in de exacte mechanismen van persistierend MRSA CC398 dragerschap, hogere overdraagbaarheid en virulentie factoren. Op dit moment proberen we met behulp van whole genome sequencing van een groot aantal MRSA en MSSA CC398 isolaten het risico in te schatten van het ontstaan van een groot reservoir van veegeassocieerde *S. aureus* CC398 in de algemene bevolking.

Daarnaast hebben we een aantal dierenartsen gevonden die nooit gekoloniseerd zijn geweest met *S. aureus* gedurende de studie van twee jaar, ondanks een zeer hoge blootstelling aan MRSA CC398 en MSSA in de varkens- en vleeskalveren stallen. Deze individuen lijken "immuun" voor kolonisatie te zijn. De bepaling van de genetische kenmerken en het microbiome van de neus van deze niet-dragers zouden kunnen leiden tot doelstellingen voor nieuwe geneesmiddelen of vaccins om kolonisatie en infecties te voorkomen.

Om te evalueren of de MRSA CC398 prevalentie bij mensen zonder veecontact in een gebied met een hoge dichtheid van varkensbedrijven toeneemt, dient het cross-sectionele onderzoek na vijf jaar nogmaals te worden uitgevoerd.

..... Conclusies

Het onderzoek in dit proefschrift heeft geleid tot meer inzicht in de detectie, dynamiek, overdraagbaarheid en de virulentie van MRSA CC398 in dierenartsen met veecontact. Het heeft ook bijgedragen aan een beter begrip van de mogelijke bedreiging voor de volksgezondheid. De volgende belangrijke conclusies kunnen worden getrokken uit dit proefschrift: (1) Oxoid *Brilliance*TM MRSA Agar, Bio-Rad *MRSASelect*TM medium en

chromID® MRSA medium zijn allen gevoelige methoden voor het screenen van MRSA CC398 in combinatie met bouillonophoping, echter positieve resultaten hebben bevestiging nodig. Onze studies toonden een aanzienlijke verhoging van de sensitiviteit na ophoping in vergelijking met directe kweken. Daarom blijft een bouillonophoping onmisbaar voor een betrouwbare MRSA detectie. (2) Regelmatig veecontact kan inderdaad leiden tot persisterende kolonisatie met MRSA CC398. Dierenartsen die vooral werken met varkens en vleeskalveren dragen vaak dezelfde stam voor langere periodes. (3) Een relatief hoge gemiddelde prevalentie van MRSA CC398 kolonisatie van 4,0% werd gevonden onder gezinsleden. Bovendien bleek de prevalentie van MRSA CC398 dragerschap bij gezinsleden sterk afhankelijk te zijn van de dragerschap status van de dierenarts. MRSA CC398 verspreidt zich minder eenvoudig tussen mensen met beroepsmatig veecontact en hun gezinsleden dan andere MRSA isolaten in een huishoudelijke omgeving (prevalentie risico ratio 6,0; 95% CI 2,4–15,5). (4) De cross-sectionele studie in gebieden met een extreem hoge varkensdichtheid vond dat slechts 0,2% van de volwassenen zonder diercontact positief waren voor MRSA CC398. Dit is vergelijkbaar met de dragerschap prevalentie van de algemene bevolking. (5) Whole genome sequencing kan MRSA CC398 onderscheiden en identificatie van overdracht. (6) Dierenartsen met persisterende MRSA CC398 en persisterende *S. aureus* dragerschap hadden significant meer huid- en weke delen infecties dan *S. aureus* niet-dragers tijdens een studie van twee jaar.

..... Aanbevelingen

Het Nederlandse 'search en destroy' beleid werd in december 2012 herzien, en alle gezinsleden van bevestigde MRSA patiënten moeten nu worden gescreend op MRSA bij een ziekenhuisopname. Toch worden gezinsleden van dierenartsen nog niet onderzocht bij een opname in een ziekenhuis. Maar wij hebben aangetoond dat ze relatief vaak MRSA dragen in vergelijking met de Nederlandse bevolking, onafhankelijk van de MRSA dragerschap status van de dierenarts. Daarom pleiten wij ervoor dat gezinsleden van dierenartsen ook moeten worden gescreend op de aanwezigheid van MRSA dragerschap bij een ziekenhuisopname.

Vanuit het volksgezondheid oogpunt wordt een permanente monitoring van de virulentie, antimicrobiële resistentie profielen en menselijke kolonisatie capaciteit van MRSA CC398 sterk aanbevolen. Aanpassing aan de mens door veegerelateerde CC398 zou een grote bedreiging voor de volksgezondheid kunnen zijn vanwege het enorme reservoir bij vee, en omdat dat deze kloon vrij eenvoudig vreemd DNA lijkt te

verwerven. Dit zou grote aanpassingen van de bestaande richtlijnen in de gemeenschap en zorginstellingen vereisen. Het is de vraag of de huidige strategie in Nederland in dit scenario kan worden gehandhaafd. In ieder geval zullen de kosten dan aanzienlijk gaan stijgen.