

Samenvatting

Samenvatting

Resistentie veroorzaakt door ESBL-producerende *Enterobacteriaceae* neemt, over de gehele wereld, snel toe. De oorzaken van deze toename zijn nog niet geheel opgehelderd. De studies uit dit proefschrift beschrijven de uitdagingen die gepaard gaan met de detectie en typering van ESBL-producerende *Enterobacteriaceae*, de prevalentie van kolonisatie in de Nederlandse bevolking en de mogelijke oorzaken van dragerschap van ESBL-producerende *Enterobacteriaceae* als groep, en van O25:ST131 *Escherichia coli* specifiek.

Detectie- en typeringsmethoden

Om te voorkomen dat ESBL-producerende *Enterobacteriaceae* zich kunnen verspreiden tussen patiënten, worden infectiepreventie maatregelen getroffen bij patiënten die gekoloniseerd zijn met een dergelijke bacterie of er een infectie mee hebben. Om deze maatregelen snel te kunnen treffen zijn gevoelige detectie methoden van groot belang. Snelle testuitslagen zijn ook van belang om zo nodig de juiste antibiotische therapie te kunnen starten. In de loop der jaren zijn er veel verschillende detectie- en confirmatie technieken ontwikkeld (**hoofdstuk 2.1**), maar weinig daarvan worden nog steeds gebruikt. De selectieve agar platen ChromID ESBL en EbSA daarentegen, worden tegenwoordig in de meeste Nederlandse microbiologische laboratoria gebruikt. Beide platen hebben een hoge sensitiviteit, echter de EbSA plaat heeft een hogere specificiteit. Het gebruik van selectieve media is conform de Nederlandse richtlijn voor de detectie van ESBL-producerende *Enterobacteriaceae*,¹ en vaak wordt de kweek voorafgegaan door een ophopingstap om de sensitiviteit van de kweek te optimaliseren.²

ESBL-productie zorgt voor resistentie tegen cefalosporinen. In vitro wordt deze resistentie teniet gedaan door de toevoeging van clavulaanzuur of een andere β -lactamase remmer. Dit fenomeen wordt gebruikt voor de fenotypische confirmatie van ESBL-productie in verdachte stammen. Wij hebben 2 confirmatietechnieken getest die gebaseerd zijn op dit principe (**hoofdstuk 2.1**), maar beide methoden waren onvoldoende robuust en slechts geschikt voor een beperkt aantal *Enterobacteriaceae*. De Nederlandse richtlijn raad disk diffusie of Etest aan voor de detectie van ESBL-productie in *Enterobacteriaceae*¹ en de door ons geteste methoden zijn niet langer beschikbaar.

Naast fenotypische confirmatie van ESBL-productie is detectie van de genen die coderen voor de ESBL-productie een goede confirmatie techniek. Een microarray (**hoofdstuk 2.2**) is een betrouwbare en efficiënte methode om te screenen op en typeren van de meest voorkomende groepen en subtypes van ESBL-genen, en deze methode kan in lokale laboratoria worden toegepast. Helaas wordt de microarray nog niet standaard toegepast in alle laboratoria, terwijl het gebruik kan helpen bij het krijgen van inzicht in de lokale genotypische epidemiologie en bij het ontdekken van

uitbraken veroorzaakt door horizontale gen-overdracht. Daarnaast kan inzicht in ESBL-genotype helpen bij het creëren van begrip over (inter)nationale ESBL epidemiologie. Typering van stammen is essentieel om uitbraken aan te tonen of (inter)nationale epidemiologische verbanden van ESBL-producerende *Enterobacteriaceae* te onderzoeken. AFLP en MLST zijn hiervoor veelgebruikte methoden, maar beide methoden zijn duur en tijdrovend. Wij hebben 2 nieuwe typeringsmethoden getest, die beide makkelijker in gebruik zijn, en ook in lokale settings ingezet kunnen worden. De eerste methode, © Diversilab, geeft goede resultaten als het gaat om onderzoek naar lokale epidemiologie en lokale uitbraken (**hoofdstuk 3.1**). © SpectraCell RA daarentegen, is geen goede methode om klonale relaties tussen stammen op populatieniveau aan te tonen (**hoofdstuk 3.2 en 5.3**). Het is belangrijk om te realiseren dat verspreiding van ESBL-productie op verschillende manieren kan gebeuren. Naast verspreiding van ESBL-producerende stammen kan ook verspreiding van ESBL-genen door horizontale gen- of plasmide-overdracht een rol spelen bij de epidemiologie. Typering op stamniveau alleen is daarom onvoldoende bij het bestuderen van uitbraken en (inter)nationale epidemiologie. Wij hebben daarom typering op stamniveau gecombineerd met ESBL-genotypering bij onze epidemiologische onderzoeken.

ESBL in de algemene bevolking

Tot 2000 waren ESBL-producerende *Enterobacteriaceae* met name *Klebsiella spp.* en *Enterobacter spp.*, en werden ze gevonden bij patiënten op intensieve zorg afdelingen, op basis van nosocomiale verspreiding. De ESBL-productie werd toen nog veroorzaakt door mutaties in het TEM en SHV gen. Echter, na 2000 heeft de prevalentie ESBL-genotype CTX-M een vlucht genomen en dit genotype komt ook zeer frequent voor in *E. coli* isolaten. *E. coli* isolaten met dit genotype geven ook geregeld infecties bij patiënten uit de algemene bevolking. Waar mensen met bijvoorbeeld onderliggende ziekte, recent antibiotica gebruik of frequent contact met zorginstellingen, extra vatbaar zijn voor infectie,^{3,4} vinden we in de gezonde helft van de algemene bevolking mensen die gekoloniseerd zijn met ESBL-producerende bacteriën. Wij hebben fecale monsters van patiënten die bij de huisarts kwamen met gastro-intestinale klachten selectief getest op ESBL, en vonden een opvallend hoog percentage ESBL-dragerschap (10,1%) (**hoofdstuk 4.1**). Alhoewel dit wellicht een overschatting is van de totale dragerschapsprevalentie in de Nederlandse bevolking, geeft deze studie aan dat ook in Nederland dragerschap met ESBL-producerende *Enterobacteriaceae* voorkomt in de algemene bevolking.

Bij een prevalentiemeting in het ziekenhuis vonden we een prevalentie van 4.9% dragerschap, met ESBL-producerende *E. coli* als de belangrijkste veroorzaker van dragerschap. Ook vonden we dat opvallend veel in Nederland verkocht vlees, m.n. kipvlees, gecontamineerd was met ESBL-producerende bacteriën, m.n. *E. coli* (**hoofdstuk 5.1, 5.2 en 5.3**). Bij het vergelijken van de *E. coli* en *Klebsiella pneumoniae* isolaten uit het kipvlees met de stammen gevonden in de ziekenhuispopulatie, zagen

we een grote overlap met betrekking tot stam type en ESBL-genotype. Nadere analyse van ESBL-producerende *E. coli* isolaten uit kipvlees, menselijke dragerschapskweken en bloedkweken leverde ook een grote overlap in virulentie genen, plasmide kenmerken en huishoudgenen. Deze studies laten zien dat in ieder geval een deel van de kolonisatie en infecties van mensen met ESBL-producerende bacteriën veroorzaakt wordt door de contaminatie van kipvlees. Dat *E. coli* bacteriën uit kipvlees de menselijke darm konden koloniseren was reeds langer bekend,⁵ maar het werd lang betwijfeld of ESBL-producerende *Enterobacteriaceae* uit de voedselketen een relatie konden hebben met infecties bij mensen.⁶ Onze studies laten zien dat ESBL-producerende *E. coli* uit kipvlees wel degelijk infecties bij mens kunnen veroorzaken. Sommige subtypes *E. coli* veroorzaken gemakkelijker een infectie dan anderen.⁷ Fylotype B2 *E. coli* isolaten veroorzaken vaker een infectie dan andere fylotypes (**hoofdstuk 5.2 en 6.1**). Waarschijnlijk zijn het deze isolaten die in de gezonde populatie een infectie kunnen veroorzaken, terwijl de andere fylotypes pas een infectie kunnen veroorzaken als de weerstand van een patiënt verminderd is, of barrières kunstmatig worden doorbroken door bijvoorbeeld urinekatheters of chirurgische wonden. Subgroep O25:ST131 neemt een speciale plaats in binnen de fylotype B2 *E. coli* isolaten. Deze groep heeft zich wereldwijd verspreid en wordt gezien als de veroorzaker van de ESBL-pandemie.⁸ Deze kloon dankt zijn succes aan het ESBL-fenotype (**hoofdstuk 6.1**) en is vrijwel niet aanwezig onder wildtype *E. coli* isolaten. Het is heel lang onduidelijk geweest waarom deze kloon zo succesvol is. Onze studie (**hoofdstuk 6.2**) laat zien dat langdurig dragerschap de mogelijke succesfactor is voor O25:ST131, aangezien transmissierisico vergelijkbaar was met andere *E. coli* isolaten en ook omgevingscontaminatie verwaarloosbaar was.

Oorzaken en mogelijke oplossingen: antibiotica gebruik

Het ontstaan van resistentie wordt altijd voorafgegaan door het gebruik van antibiotica. De hoeveelheid antibiotica die gebruikt wordt is gerelateerd aan de snelheid waarmee resistentie ontstaat. Vaak wordt de introductie van een antibioticum gevolgd door een langere periode met relatief weinig resistentie, daarna volgt een periode met snelle toename van resistentie wat leidt tot een equilibrium van <100% resistentie.⁹ Tussen de Europese landen is er een enorm verschil in de hoeveelheid antibiotica gebruik in de algemene bevolking. Landen waar veel antibiotica worden gebruikt zijn ook de landen waar veel resistentie wordt gezien.^{10,11} In Nederland is het antibiotica gebruik laag en mede daardoor hebben we een lage prevalentie van resistentie bij mensen. Echter, ook in Nederland is de prevalentie van resistentie aan het toenemen, en niet alle antibioticagebruik is correct.^{12,13}

Resistentie in bacteriën als *Mycobacterium Tuberculosis* ontstaat door mutaties in reeds bestaande genen van de bacterie onder druk van antibiotica bij patiënten die worden behandeld voor een infectie. Dit model is lang aangehouden als oorzaak voor alle resistentieontwikkeling, maar in het geval van ESBL is dit model niet geldig. De

toename van ESBL wordt veroorzaakt door acquisitie van nieuwe genen door horizontale genen-overdracht vanuit vaak niet-pathogene micro-organismen die veelvuldig in de omgeving voorkomen. Hierdoor zijn het indirecte mechanismen die aan de grondslag liggen van selectie van resistentie op populatie niveau. Deze mechanismen spelen zelfs een rol als behandeling met antibiotica op het niveau van de individu kan zorgen voor een dekolonisatie van de patiënt. Oftewel, antibiotica gebruik in de ene persoon verhoogt het risico op kolonisatie of infectie met resistente bacteriën in andere personen.¹⁴

Antibiotica worden niet alleen gebruikt om patiënten te behandelen, maar worden ook veelvuldig ingezet in de veterinaire sector. Jarenlang werden antibiotica gebruikt als groeibevorderaars, maar ook sinds het verbod hierop in 1999 werd aangekondigd en in 2006 werd geëffectueerd, wordt er nog veel antibiotica gebruik in de veterinaire sector. Onder de naam van “groepsbehandeling”, behandeling van alle dieren in de stal, is tot 2007 het totale antibiotica gebruik in de Nederlandse veterinaire sector blijven toenemen. In dat jaar werd op ministerieel niveau een doelstelling gezet om het totale antibiotica gebruik te halveren in 6 jaar tijd. Deze doelstelling was in 2012 reeds gerealiseerd. Aangezien indirecte mechanismen ten grondslag liggen aan de resistentieontwikkeling, is de hoeveelheid antibioticagebruik in de veterinaire sector van belangrijke invloed op de snelheid waarmee ESBL-resistentie opkomt bij de mens.¹⁵ In het geval van ESBL is het gebruik van ceftiofur, een cefalosporine wat m.n. veel in de pluimvee industrie wordt gebruikt, van invloed op het ontstaan van ESBL-productie in *Enterobacteriaceae*.¹⁶

Lang werd gedacht dat het ontwikkelen van resistentie ten koste ging van de virulentie van een bacterie. De verminderde virulentie zou veroorzaakt worden doordat het resistentiemechanisme gebruikt maakt van het normale metabolisme van de bacterie en/of doordat het resistentiemechanisme extra voedingsstoffen vraagt van de bacterie.¹⁷ Hierdoor zou de aanwezigheid van resistentie alleen persisteren onder een continue antibiotica druk en zou het verwijderen van deze antibiotica druk ervoor zorgen dat de resistentiegraad weer afneemt.¹⁸ Onderzoeken die deze theorie ondersteunen betreffen onderzoeken naar resistentie veroorzaakt door mutaties in het bacterie-DNA in bijvoorbeeld *M. tuberculosis*. Nieuwe data suggereren dat resistente *E. coli* geen verlies aan virulentie hebben en zelfs net zo virulent zijn als de wildtype varianten.¹⁹ Het is daarom niet te verwachten dat het verminderen van de antibioticadruk snel zal zorgen voor een vermindering van resistentie.

Feit blijft dat het gebruik van antibiotica zorgt voor het ontstaan van resistentie en daarom is een terughoudend antibioticabeleid, zowel in de humane als in de veterinaire sector, van belang om resistentieontwikkeling tegen te gaan. Desondanks worden antibiotica veelvuldig ingezet. Dit kan het best worden verklaard met behulp van de theorie van de “common goods”: antibiotica zijn goedkoop en voor iedereen toegankelijk en het is op individueel niveau het beste om er gebruik van te maken. Mensen willen antibiotica gebruiken als ze ziek zijn in de hoop dat ze snel weer beter

zijn, zelfs als antibiotica niet persé nodig zijn om beter te worden. In de veterinaire sector is het in het belang van de boer om zijn dieren antibiotica te geven, aangezien zieke dieren niet verkocht kunnen worden. Maar hoe meer antibiotica we gebruiken, hoe sneller resistentie ontstaat, en dan heeft niemand meer iets aan antibiotica.^{20,21}

Search en Destroy

Nederland staat bekend om haar effectieve infectiepreventie beleid. Het “search en destroy” beleid in combinatie met terughoudend antibioticagebruik heeft ervoor gezorgd dat de prevalentie van MRSA en andere resistente bacteriën hier erg laag is. Echter, we zijn niet erg effectief in het indammen van de opkomst van ESBL. Alhoewel de prevalentie hier nog steeds iets lager is dan in onze buurlanden, neemt de prevalentie gestaag toe en kunnen we ons “search en destroy” aanpak niet toepassen. Er zijn geen goede risicofactoren beschikbaar die effectief zijn om (bijna) alle patiënten die een infectie hebben met een ESBL-producerend micro-organisme, of die hiermee gekoloniseerd zijn, te traceren. Hierdoor is “search” vrijwel onmogelijk. Klassieke risicofactoren, zoals langdurige ziekenhuisopname of recent gebruik van cefalosporines zijn niet van toepassing op *bla*CTX-M. En aangezien ESBL-producerende *Enterobacteriaceae* tegenwoordig ook vaak gevonden worden bij huisartspatiënten met een infectie, betekent dat de afwezigheid van klassieke risicofactoren ESBL dragerschap absoluut niet uitsluit.²²⁻²⁵ Verspreiding van resistentie tussen huisgenoten gebeurt veel vaker dan verspreiding binnen het ziekenhuis, dit kan een verklaring zijn voor kolonisatie en infectie in de algemene bevolking.^{26,27}

Sommige risicogroepen kunnen we echter nog wel aanwijzen. Studies over prevalentie van ESBL-kolonisatie in reizigers laten hoge prevalenties zien, dit kan een verklaring zijn voor kolonisatie en infectie in de algemene bevolking.²⁸ Daarom worden patiënten gescreend op dragerschap wanneer ze afkomstig zijn uit buitenlands ziekenhuis, of opgenomen hebben gelegen op een afdeling waar een uitbraak heerste. Dit is belangrijk omdat nosocomiale transmissie goed te voorkomen is door het inzetten van infectiepreventie-maatregelen.²⁹

Het tweede deel van het “search en destroy” beleid is in het geval van ESBL ook niet goed toepasbaar, aangezien er (nog) geen goede methoden zijn om patiënten te dekoloniseren. Rectaal dragerschap van ESBL-producerende *Enterobacteriaceae* kan jaren aanhouden,³⁰ en onze data laten zien dat mede daarom actieve dekolonisatie de meest effectieve manier is om de verspreiding van ESBL tegen te gaan (hoofdstuk 6.2). Alhoewel antibiotische dekolonisatie strategieën veelbelovend zijn,³¹ tonen nieuwere studies aan dat het succes daarvan slechts tijdelijk is³² en patiënten op de lange duur de kolonisatie niet kwijtraken. Experimentele dekolonisatie strategieën als probiotica en fecestransplantatie moeten nog verder onderzocht worden alvorens ze op grotere schaal te kunnen worden ingezet.^{33,34}

Conclusie

Zowel internationaal als in Nederland neemt de prevalentie van ESBL toe. Snelle en gevoelige detectie en typeringsmethoden zijn belangrijk bij het onderzoeken van de oorzaken van deze toename en zijn ook belangrijk om infectiepreventiemaatregelen te kunnen implementeren en verspreiding binnen de ziekenhuis setting te voorkomen. Selectieve agar platen zijn erg bruikbaar voor een snelle en gevoelige detectie van ESBL-dragerschap. Nieuwe typeringsmethoden voor stamtypering zijn veelbelovend maar nog niet overal beschikbaar, terwijl de micro-array voor ESBL-genotypering wel al in sommige laboratoria aanwezig is. Stamtypering en genotypering zijn belangrijk om begrip te krijgen over de epidemiologie van ESBL op lokaal, nationaal en internationaal niveau.

Kolonisatie en infectie met ESBL-producerende bacteriën zijn niet alleen een probleem binnen ziekenhuizen maar heeft zich ook verspreid in de algemene bevolking. Deels kan dit verklaard worden door de aanwezigheid van grote hoeveelheden ESBL in kipvlees. Stammen gevonden op kippenvlees zijn in veel opzichten vergelijkbaar met isolaten die mensen koloniseren of die infecties veroorzaken bij de mens. Alhoewel dit zeker niet de volledige prevalentie van ESBL-kolonisatie en infectie kan verklaren, zijn maatregelen om de aanwezigheid van ESBL in kipvlees te verminderen belangrijk en deze maatregelen zouden zowel nationaal als internationaal ingevoerd moeten worden.

Van alle ESBL-producerende bacteriën is de ESBL-producerende O25:ST131 *E. coli* een bijzondere variant. Deze kloon is erg effectief in het koloniseren van patiënten en het veroorzaken van infecties. De stam heeft zich goed aangepast aan de mens en kan de menselijke darm gedurende jaren koloniseren. Eradicatie therapieën zouden moeten worden gezocht aangezien eradicatie waarschijnlijk de beste methode is om de toename van ESBL in te dammen.