



Nederlandse Samenvatting

Eenvoudig verhaal

De laatste 20 jaar zijn ziekenhuisuitbraken en infecties veroorzaakt door de - tot dan toe als onschuldig beschouwde - darmbacterie *Enterococcus faecium* sterk toegenomen. Wij hebben studies gedaan naar de genetische achtergrond van deze bacterie en daaruit bleek dat *E. faecium* stammen afkomstig van gezonde vrijwilligers genetisch verschillend waren van *E. faecium* stammen geïsoleerd uit ziekenhuispatiënten. *E. faecium* stammen geïsoleerd uit het ziekenhuis zijn doorgaans resistent voor verschillende antibiotica waaronder ampicilline (tot nu toe eerste keus voor behandeling) en bezitten een specifiek gen dat mogelijk bijdraagt aan betere verspreiding in ziekenhuizen. Uit epidemiologisch onderzoek uitgevoerd in het Universitair Medisch Centrum Utrecht en in 28 Nederlandse ziekenhuizen bleek dat het aantal ernstige infecties veroorzaakt door ampicilline resistente *E. faecium*, vooral bij ernstig zieke patiënten, de laatste 10 jaar opvallend is toegenomen. De toename is met name zichtbaar in universitaire ziekenhuizen. Dit heeft tot gevolg dat andere (meestal duurdere) antibiotica gebruikt moeten worden, die vaak ook meer bijwerkingen hebben en waartegen ook weer resistentie kan ontstaan. Verder onderzoek moet uitwijzen of verspreiding van deze bacteriën voorkomen kan worden of dat risicopatiënten – in de verre toekomst - gevaccineerd zouden kunnen worden tegen deze infecties.

Enterococcus faecium werd jarenlang als een relatief onschuldige, commensale darmbacterie beschouwd, die zo nu en dan infecties kon veroorzaken bij ernstig zieke patiënten. *Enterococcus faecalis* was verantwoordelijk voor 80-90% van de door enterokokken veroorzaakte infecties. Gedurende de laatste 20 jaar is vooral in de VS een sterke toename gezien van ziekenhuisuitbraken en infecties veroorzaakt door glycopeptide resistente enterokokken (zowel *E. faecium* als *E. faecalis*). Deze toename werd voorafgegaan door een toename van ampicilline resistente *E. faecium* (AREfm). Moleculaire typering van een, in eerste instantie, kleine set van vancomycine resistente *E. faecium* (VREF) isolaten wees uit dat ziekenhuis gerelateerde VREF isolaten apart groepeerden van VREF geïsoleerd uit feces van gezonde vrijwilligers. Ziekenhuis gerelateerde VREF werden verder gekenmerkt door resistentie voor ampicilline en chinolonen. Bovendien was de aanwezigheid van het variant *esp* gen sterk geassocieerd met deze uitbraak stammen. In 2001 werd *Esp* beschreven als een mogelijke virulentie factor van *E. faecalis* waarna werd aangetoond dat het *E. faecalis esp* op een zogenoemd "pathogenicity island" (PAI) ligt.

Dit proefschrift beschrijft de locale, Universitair Medisch Centrum Utrecht (UMCU), landelijke (Nederland) en mondiale moleculaire epidemiologie van *E. faecium*. Verder wordt er een snelle identificatie methode voor enterokokken en een snelle typeringsmethode voor het aantonen van genetische verwantschappen tussen *E. faecium* isolaten beschreven. Tenslotte is een chromosomale regio waar het *E. faecium esp* gen is gelokaliseerd bestudeerd.

Omdat de identificatie van enterokokken controversieel is, hebben we in **hoofdstuk 2** de accuraatheid van verschillende fenotypische testen vergeleken met een moleculaire referentiemethode. Hieruit bleek dat geen van de methoden een 100% betrouwbare identificatie geeft door het voorkomen van atypisch reagerende enterokokken. Het in ons lab ontwikkelde snelle (4 uur) en goedkope identificatieschema bestaande uit een combinatie van al 5 eerder beschreven fenotypische testen, lijkt met een accuraatheid van 92% een goed alternatief voor de duurere automatische microbiologische systemen en de API. Een andere fenotypische identificatie methode die nog in ontwikkeling is, Raman spectroscopy genaamd, is een veelbelovende methode, maar om de betrouwbaarheid van deze methode goed te kunnen bepalen zal de referentie database eerst uitgebreid moeten worden.

In **hoofdstuk 3** wordt multiple locus variable number tandem repeat analysis (MLVA) als nieuwe snelle typeermethode voor het aantonen van genetische verwantschappen tussen *E. faecium* isolaten beschreven. De methode werd vergeleken met het eerder door ons ontwikkelde multilocus sequence typing (MLST) schema. Deze laatste methode toonde dat ziekenhuis gerelateerde isolaten clusteren. Een nadeel is echter dat MLST duur en tijdrovend is. MLVA bleek in hoge mate congruent aan MLST, waarbij ook met MLVA ziekenhuis gerelateerde isolaten groeieren.

In het kader van infectiepreventie programma's in ziekenhuizen gebruiken veel laboratoria Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) als gouden standaard voor het bepalen van kruisbesmetting. PFGE kost echter veel tijd en de typeerresultaten zijn vaak moeilijk te interpreteren, waardoor vergelijking tussen laboratoria problematisch is. Om te onderzoeken of MLVA PFGE als standaard typeermethode in ziekenhuizen zou kunnen vervangen worden in **hoofdstuk 4** beide typeerschema's vergeleken. Hiervoor werden VREF isolaten getypeerd, die gedurende 2 maanden op een ICU waar VREF endemisch voorkomen verzameld waren en waar dus een hoge mate van genetische verwantschap verwacht kon worden. MLVA en PFGE bleken vergelijkbaar te zijn in kosten en het toewijzen van genotypen, maar het discriminerend vermogen van PFGE was iets beter. MLVA is sneller en heeft het grote voordeel dat genotypen vergeleken kunnen worden met een internationale database via Internet. De conclusie van deze studie was dat MLVA een goed alternatief voor PFGE is om verspreiding van isolaten in ziekenhuizen aan te tonen.

In **hoofdstuk 5** zijn de flankerende chromosomale regio's van het *E. faecium* *esp* gen geanalyseerd, waaruit bleek dat, net als in *E. faecalis*, *esp* in *E. faecium* op een PAI ligt. Op het *esp* gen en één ander gen, *araC*, na zijn de PAI's van beide species verschillend. Een ander belangrijk verschil tussen het *E. faecalis* en het *E. faecium* PAI is dat het *E. faecalis* PAI, ondanks dat het meer frequent voorkomt in klinische isolaten, ook wordt gevonden in feces isolaten van gezonde vrijwilligers en dieren. Het *E. faecium* PAI is tot nu toe alleen gevonden bij ziekenhuispatiënten. Dit suggereert dat het PAI bijdraagt aan verspreiding van *E. faecium* binnen ziekenhuizen. Uit sequentie analyse van het PAI, inclusief het *esp* gen, van verschillende isolaten bleek een grote mate van heterogeniteit in de vorm van inserties, deleties en mutaties. Dit suggereert een grote mate van genoom plasticiteit in *E. faecium*.

In **hoofdstuk 6** werd de populatie structuur van *E. faecium*, zowel VREF als vancomycine gevoelige *E. faecium* uit verschillende ecologische niches en landen/continenten, opgehelderd met behulp van MLST. Clustering van 175 verschillende genotypen, bepaald in 411 isolaten, met behulp van eBURST toonde één groot cluster van verwante ST's waarbinnen de meerderheid van ziekenhuisuitbraak – en klinische isolaten groepeerden in een subcluster. Omdat eBURST ST17 als vooroudertype van dit subcluster voorspelde, werd dit subcluster clonal complex-17 (CC17) genoemd. Uit het feit dat bijna al deze isolaten gekenmerkt worden door ampicilline resistentie, terwijl het PAI in ongeveer 60% van deze isolaten voorkomt, concludeerden we dat *E. faecium* waarschijnlijk eerst ampicilline resistentie heeft verworven. Dit resulteerde mogelijk in een selectief voordeel in het ziekenhuis, waarna het PAI werd verworven en deze isolaten nog beter in staat waren zich te verspreiden. Verder werd uit deze studie duidelijk dat in *E. faecium* recombinatie een veel belangrijkere rol speelt bij het genereren van genetische diversiteit dan mutaties. De aanwezigheid van CC17 in een panmictische populatie structuur zoals bij *E. faecium* lijkt paradoxaal maar zou verklaard kunnen worden door het feit dat CC17 relatief recent is ontstaan. Het is mogelijk dat in de toekomst CC17 door recombinatie weer zal verdwijnen als apart CC en zal opgaan in een netwerk van frequent recombinerende *E. faecium* populatie, waarin periodiek steeds andere succesvolle clones zullen domineren.

Een opvallende toename van bacteriëmieën veroorzaakt door ampicilline resistente *E. faecium* (AREfm) in het UMC Utrecht in 2003 was de aanleiding voor de studie beschreven in **hoofdstuk 7**. Uit deze studie bleek dat er de laatste 10 jaar een ecologische verschuiving heeft plaats gevonden waarbij er relatief meer infecties worden veroorzaakt door multiresistente CC17 *E. faecium* en minder door ampicilline gevoelige *E. faecalis*. Gedurende de studieperiode was het totaal aantallen invasieve enterokokken infecties afgenomen, maar de proportie invasieve AREfm was toegenomen. Verder nam het aantal *E. faecium* bloedisolaten toe ten koste van het aantal *E. faecalis* isolaten. Uit punt prevalentie studies, uitgevoerd op de afdelingen hematologie en nefrologie, bleek een hoog percentage patiënten drager van AREfm. Risicofactoren voor AREfm kolonisatie waren diabetes mellitus, 3 of meer opnames in het voorafgaande jaar en het gebruik van β -lactam antibiotica en chinolonen.

Om te bepalen of de toename van AREfm UMCU specifiek is, werd een landelijke studie gestart, welke beschreven staat in **hoofdstuk 8**. In deze studie

werd van 26 verspreid over Nederland liggende laboratoria data verkregen over de jaarlijkse aantallen invasieve ampicilline resistente enterokokken. Tevens waren 10 laboratoria bereid om bloed isolaten aan te leveren zodat de *E. faecium*/*E. faecalis* ratio in deze isolaten bepaald kon worden. Uit de analyses bleek dat in de laatste 10 jaar het gemiddelde aantal invasieve ampicilline resistente enterokokken is toegenomen, maar dat deze toename meer uitgesproken is bij universitaire ziekenhuizen. Ook de proportie AREfm in bloedisolaten is toegenomen, ook weer meer uitgesproken bij universitaire ziekenhuizen. Uit MLVA typering van alle *E. faecium* isolaten bleek dat 4 verschillende tot CC17 behorende genotypen in meer dan drie ziekenhuizen zijn voorgekomen. Eén van deze genotypen, MT159, werd in 2006 in minstens 9 verschillende ziekenhuizen gevonden. Verder bleek vanaf 2004 onder de meest frequent voorkomende MLVA typen een toename van *esp* positieve isolaten, wat suggereert dat *Esp* een rol speelt bij nosocomiale verspreiding van recente *E. faecium* stammen.