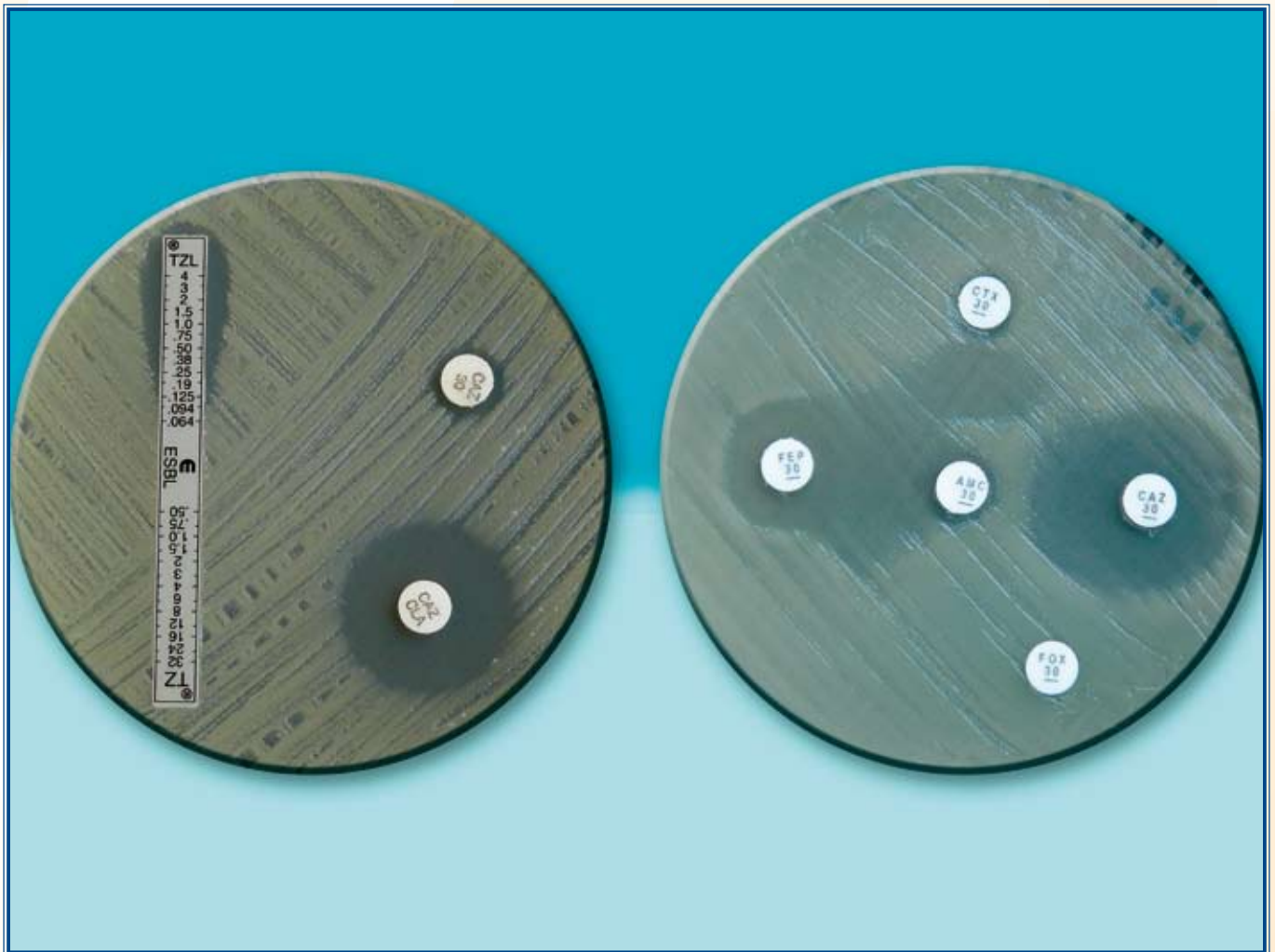


NEDERLANDS TIJDSCHRIFT VOOR  
**MEDISCHE MICROBIOLOGIE**



Fecaal dragerschap van ESBL-producerende Enterobacteriaceae onder verpleeghuisbewoners

HOMM of kuit, de bomen en het bos

*Klebsiella pneumoniae* carbapenemases: epidemiology, clinical microbiology and available antibiotics

How pathogenic are viruses? Still problems with fulfilling Koch's postulates

# Advertentie Ecalta

## Colofon

**Nederlands Tijdschrift voor Medische Microbiologie**  
Het Nederlands Tijdschrift voor Medische Microbiologie is het officiële orgaan van de Nederlandse Vereniging voor Medische Microbiologie (NVMM). Het doel van het tijdschrift is de lezers te informeren over ontwikkelingen betreffende het vakgebied. In het tijdschrift worden zowel fundamentele als klinische aspecten van de medische microbiologie belicht. Daarnaast biedt het plaats voor promoties e.d., nieuws over evenementen en mededelingen uit de (werkgroepen van de) vereniging.

**NVMM-secretariaat**  
Postbus 21020, 8900 JA Leeuwarden  
Tel. (058) 293 94 95  
Fax. (058) 293 92 00  
E-mail: nvmm@knmg.nl  
Internet: www.nvmm.nl

**Hoofdredactie**  
Dr. C.W. Ang en dr. M. van Rijn  
**Redactie**  
Mw. dr. I.A.J.M. Bakker-Woudenberg,  
dr. A. Fleer, dr. J.G. den Hollander,  
J.A. Kaan, dr. J.S. Kalpoe,  
mw. L.M. Kortbeek, dr. J.F.G.M. Meis,  
dr. G.J.H.M. Ruijs, mw. dr. A. van 't Veen,  
dr. C. Vink, dr. H.F.L. Wertheim

**Redactiesecretariaat**  
Mw. M.S. Kapteyn-Brus  
Van Zuiden Communications B.V.  
Postbus 2122,  
2400 CC Alphen aan den Rijn  
Tel. (0172) 47 61 91  
Fax. (0172) 47 18 82  
E-mail: ntm@zuidencom.nl

**Advertentie-exploitatie**  
Van Zuiden Communications B.V.  
Dhr. D. Mackay  
Tel. (0172) 47 61 91

**Oplage en frequentie**  
900 exemplaren, 4x per jaar

**Abonnementen**  
Gratis voor leden van de Nederlandse Vereniging voor Medische Microbiologie (NVMM) en leden van de Vereniging voor Infectieziekten (VIZ). Niet-leden NVMM of VIZ in Nederland: € 36,- per jaar  
Buiten Nederland, in Europa: € 42,50 per jaar  
Losse nummers: € 10,20  
Opgave abonnementen:  
Tel. (0172) 47 61 91



© 2009, Van Zuiden Communications B.V.

Alle rechten voorbehouden. Niets uit deze uitgave mag worden verveelvoudigd, opgeslagen in een geautomatiseerd gegevensbestand of openbaar gemaakt, in enige vorm of op enige wijze, hetzij elektronisch, mechanisch, door fotokopieën, opnamen, of enige andere manier, zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van de uitgever. Uitgever en redactie verklaren dat deze uitgave op zorgvuldige wijze en naar beste weten is samengesteld; evenwel kunnen uitgever en redactie op geen enkele wijze instaan voor de juistheid of volledigheid van de informatie. Uitgever en redactie aanvaarden dan ook geen enkele aansprakelijkheid voor schade, van welke aard ook, die het gevolg is van bedoelde informatie. Gebruikers van deze uitgave wordt met nadruk aangeraden deze informatie niet geïsoleerd te gebruiken, maar af te gaan op hun professionele kennis en ervaring en de te gebruiken informatie te controleren.

**Algemene voorwaarden**  
Op alle aanbiedingen, offertes en overeenkomsten van Van Zuiden Communications B.V. zijn van toepassing de voorwaarden die zijn gedeponeerd bij de Kamer van Koophandel te Leiden.

ISSN 0929-0176

## Inhoud

### Van de redactie

Prikken of slikken 4

### Groeten uit Vietnam

But... 5

*H.F.L. Wertheim*

### Artikelen

Steekproef naar fecaal dragerschap van ESBL-producerende Enterobacteriaceae onder verpleeghuisbewoners 6

*B.B. Wintermans en Y.J. Debets-Ossenkopp*

HOMM of kuit, de bomen en het bos 11

*B.C. van Hees (namens de werkgroep HOMM)*

*Klebsiella pneumoniae* carbapenemases: epidemiology, clinical microbiology, and available antibiotics 15

*G. Patel, A. Endimiani, R.A. Bonomo*

How pathogenic are viruses? Still problems with fulfilling Koch's postulates 22

*C.R. Madeley*

### Ingezonden

Samenvattingen van de lezingen tijdens de Najaarsvergadering NVMM/VIZ 27

24 november 2009 te Zeist

### Rubrieken

Samenvattingen proefschriften 32, 33

Promoties 34

Oraties 34

Dubbeloratie 34

Personalia 35

Agenda 35

Foto omslag: Loes van Damme, Roel Verkooijen, Wil Goessens, Erasmus MC, Afdeling Medische Microbiologie & Infectieziekten, Erasmus MC, Rotterdam.

Fenotypische confirmatie van ESBL-positiviteit in *Klebsiella pneumoniae* (links) en in *Enterobacter cloacae* (rechts). Afkortingen geteste antibiotica: TZ = ceftazidim; TZL = ceftazidim + clavulaanzuur; CAZ = ceftazidim; CAZ CLA = ceftazidim + clavulaanzuur; FEP = cefpime; CTX = cefotaxim; AMC = amoxicilline + clavulaanzuur; FOX = cefoxitine.

## Prikken of slikken

Een opmerkelijke uitzending van Nova op 20 november jl. Michael Rutgers, directeur van het Astmafonds, deed namens zijn achterban een moreel appel aan ziekenhuismedewerkers om zich te laten vaccineren tegen de Mexicaanse griep. Wat de uitzending zo bijzonder maakte, was dat Rutgers voorstelde dat patiënten bij ziekenhuismedewerkers zouden kunnen informeren naar hun vaccinatiestatus, en bij een ontkennend antwoord om een andere verzorgende zouden kunnen vragen. Ik zou het idee toejuichen. Vaccinatie van ziekenhuismedewerkers is, naast fysieke beschermingsmiddelen zoals eenpersoonskamers, mondkapjes en handschoenen, de meest voor de hand liggende strategie om nosocomiale transmissie van influenza te voorkomen. Het is dan ook schokkend om in kranten, op websites en in eerdergenoemde televisieuitzending zorgverleners te zien en horen beweren dat wel of niet vaccineren een keuze is die ieder voor zich moet maken. Die keuzevrijheid leidt er toe dat de vaccinatiegraad in ziekenhuizen en verpleeghuizen varieert tussen de 20 en 75%. Het UMC St Radboud te Nijmegen kan als lichtend voorbeeld dienen. Door een uitgebreide campagne weet dit ziekenhuis vier van de vijf medewerkers te vaccineren. In verschillende zorginstellingen in Twente was dat veel lager. Ik vind het dapper van de vaccinatiecoördinator van Zorggroep Twente dat ze dat durft te melden in een regionale krant. Eerdere enquêtes onder artsen en verpleegkundigen kwamen uit op een score van 50%. Als vaccinatie voor influenza ter sprake komt in gesprekken met collega-artsen en -verpleegkundigen hoor ik bijna nooit dat de prik niet wordt gehaald. Blijkbaar geeft de helft het sociaal gewenste antwoord maar laat de spuit daarna aan zich voorbijgaan. Hoe kan dat nou? Wat is dat voor hersenkronkel? Moeten we vaccinatie tegen influenza dan, tegengrondwettelijk, verplicht stellen? Laten we hepatitis-B als voorbeeld nemen. Bij die ziekte wordt het risicovormers min of meer onmogelijk gemaakt handelingen uit te voeren waarbij risico op transmissie van het hepatitis-B-virus

optreedt. Daar kan het dus wel. Ik pleit ervoor om een vergelijkbaar beleid te formuleren voor influenza, want H1N1 zal vanaf dit jaar wel onder ons blijven. En zorgverleners die niet willen prikken, die moeten dan maar slikken.

Het was ook even slikken toen de storm over het hoofd van Ab Osterhaus losbarstte. Belaagd door de Partij voor de Vrijheid (PVV) en een hele internethorde, zag minister Ab Klink zich genoodzaakt met een brief te komen waarin de onafhankelijkheid van de adviezen werd benadrukt. Het Erasmus MC heeft op zijn website zelfs een pagina met 'veelgestelde vragen' over Osterhaus. Het ergste is nog wel dat het de overheid zelf is die, via de Vereniging van Nederlandse Universiteiten (VSNU), samenwerking tussen universiteitsonderzoekers en commerciële instellingen toejuicht. Onder de term 'kennisvalorisatie' worden onderzoekers aangemoedigd, soms bijna gedwongen, met hun bevindingen de markt op te gaan. In dit geval leidt het dus tot baanbrekend onderzoek, publicaties in *high-impact* wetenschappelijke tijdschriften en verkettering door journalisten en politici die alleen oog hebben voor het scoren van een artikel op de voorpagina, mediazendtijd en stemmen van rancuneuze complotdenkers. Het wordt hoog tijd om weer een illusie door te prikken.

Dan rest mij als laatste niets anders dan u veel leesplezier te wensen bij dit laatste nummer van het NTMM, dat ditmaal twee Engelstalige artikelen bevat. Het eerste betreft carbapenemases van *Klebsiella pneumoniae*, dagelijkse kost in New York en zojuist ook geïntroduceerd in Nederland. Daaropvolgend een artikel om voor de haard met een goed glas wijn tot u te nemen. Dick Madeley deelt zijn visie op het definiëren van de pathogeniciteit van virussen met ons. Hopelijk kunnen we u volgend jaar weer, zoals vertrouwd, een viertal nummers brengen. In de tussentijd surfen we verder op de griepgolf.

Wim Ang,  
hoofdredacteur

## But...

H.F.L. Wertheim

In ons laboratorium zijn de analisten dagelijks hard bezig de stroom van *swine flu*-rtRT-PCR-aanvragen te verwerken. Uiteindelijk kwamen we uit op meer dan 20 aanvragen per dag, waarvan 80% positief was voor de nieuwe influenza A/H1N1.

Elke positieve patiënt wordt opgenomen in het ziekenhuis, ongeacht de ernst en krijgt oseltamivir toegediend. Velen liggen op veldbedden in de gang (er is ook nog een Dengue-uitbraak aan de gang). Dit beleid is op kosten van

de staat. Pas als de patiënt koortsvrij is en RT-PCR negatief, wordt hij/zij uit het ziekenhuis ontslagen. Men leeft in de veronderstelling dat de verspreiding noch ingedamd noch kan worden gestopt. Ik vrees dat dat op een teleurstelling zal uitkomen.

Behalve de aanvragen van nieuwe patiënten krijgen wij dus ook een stroom aanvragen van follow-upmonsters te verwerken voor *swine flu*, aangezien de opnameduur van de patiënt daarvan afhangt. Ongeveer een kwart is nog positief op dag 5 (met name kinderen) en wordt vervolgens nog vijf dagen doorbehandeld. Gelukkig zijn ze wel negatief op dag 10. Dit is uiteraard geen doelmatige besteding van zeer kostbare *resources* in een *resource-constrained* setting. Een rRT-PCR voor influenza volgens een enigszins uitgekilde CDC-protocol kost rond de 100 USD per patiënt. Maar goed, de landelijke richtlijn zegt dat het moet, en aldus geschiedt.

Dagelijks komen de analisten boven met een stapeltje uitslagen van de griepstesten (en gelukkig ook nog enkele andere dingen). Ze beginnen dan met alles dat goed is gegaan. Maar dan komt altijd de gevreesde 'But...'. 'But...' betekent dat er een apparaat kapot is, of dat een essentieel reagens op is en de nieuwe bestelling nog niet binnen. Uiteindelijk hadden de analisten wel door dat 'But' niet mijn favoriete woord was en vroegen dan ook: "You do not like the word 'but'?" De volgende dag na alle uitslagen en dergelijke te hebben bekeken, vervolgde de analist: 'However...'.  
  

Dr. H.F.L. Wertheim, arts-microbioloog, Oxford University Clinical Research Unit, National Institute of Infectious and Tropical Diseases, Bach Mai Hospital, 78 Giai Phong Street, Hanoi, Vietnam, e-mail: hwertheim@oucru.org.



Groepsfoto van een swine flu-diagnostiektraining in Pasteur Institute, Nha Trang, Vietnam. Ik was uitgenodigd door het National Institute of Hygiene and Epidemiology (NIHE) in Hanoi om training te geven voor nieuwe H1N1-rtRT-PCR-diagnostiek voor vier referentielaboratoria in Vietnam. In dezelfde week van de training werden de eerste swine flu-gevallen in Vietnam gedetecteerd.

# Steekproef naar fecaal dragerschap van ESBL-producerende Enterobacteriaceae onder verpleeghuisbewoners

B.B. Wintermans en Y.J. Debets-Ossenkopp

## Samenvatting

Infecties in verpleeghuizen worden vaak veroorzaakt door extended-spectrum bèta-lactamase-producerende (ESBL) Enterobacteriaceae. Doel van het onderzoek was een steekproef te nemen naar het voorkomen van fecaal ESBL-dragerschap in Nederlandse verpleeghuizen en revalidatiecentra. In twee verpleeghuizen en één revalidatiecentrum werd het onderzoek uitgevoerd. In de periode van april tot en met juli 2008 zijn 75 bewoners uit verpleeghuizen/revalidatiecentrum gescreend op ESBL-dragerschap in feces. Fecesmonsters werden direct geënt op screeningsagars. De ESBL-screeningsagar (EbSA) is geëvalueerd. Van alle morfologisch verschillende fermentatieve gramnegatieve staven die groeiden op de selectieve platen is een ESBL-confirmatietest met de *Double Disc Combination Test* (DDCT) gedaan conform de richtlijnen van de Nederlandse Vereniging voor Medische Microbiologie (NVMM). Van Enterobacteriaceae-stammen, positief in de DDCT, werd een PCR op HSV-, TEM- en CTX-M-type ESBL en een sequentieanalyse gedaan. Bij 11 van de 75 bewoners toonden wij in de feces Enterobacteriaceae aan die ESBL-positief waren in de DDCT-confirmatietest. Vier van deze 11 stammen waren van het ESBL-type TEM of CTX-M in de PCR en sequentieanalyse.

Conclusie: Vier van de 75 bewoners (5%) waren drager van een ESBL-positieve stam van het ESBL-type TEM of CTX-M.

**Trefwoorden:** ESBL, verpleeghuizen, fecaal dragerschap, EbSA

## Introductie

ESBL-enzymen hydrolyseren bèta-lactamantibiotica zoals penicillines en cefalosporines (cefuroxim, ceftazidim, ceftriaxon, cefotaxim, cefepim) en aztreonam, een monobactam. ESBL's zijn niet effectief tegen cefamycines en carbapenems.<sup>1</sup> Er zijn verschillende ESBL-types, het TEM-type (> 150 varianten), SHV-type (> 110) en CTX-M-type (> 80) behoren tot de moleculaire klasse-A (Ambler-classificatie) en vormen voornamelijk de grootste groep. Klasse-A wordt geremd door clavulaanzuur. Het

OXA-type (> 120) behoort tot klasse-D; deze wordt slechts in geringe mate geremd door clavulaanzuur en hydrolyseert oxacilline. Dan is er nog een kleine groep 'overige' (zoals VEB, PER), klasse-A, deze komen sporadisch voor.<sup>2,3</sup> De toename van het aantal ESBL-producerende micro-organismen is de laatste tijd vooral te wijten aan een toename van het aantal dat bèta-lactamases produceert van het CTX-M-type.<sup>2,4</sup> Het CTX-M-gen dat hiervoor codeert, zit op een plasmide en is zodoende gemakkelijk overdraagbaar van bacterie op bacterie van hetzelfde genus dan wel van een ander genus.

Er zijn weinig gegevens over de prevalentie van ESBL-dragerschap onder verpleeghuisbewoners in Nederland.<sup>5</sup> Onderzoek in 2006, in Amsterdamse ziekenhuizen, leverde een prevalentie van 7,8% ESBL-dragerschap op.<sup>4</sup>

In een verpleeghuis zijn veel risicofactoren en indicatoren voor ESBL-kolonisatie aanwezig. Deze populatie bewoners heeft regelmatig te maken met recidiverende urineweg-infecties, frequent antibioticagebruik en daarnaast urine-verblijfskatheters, decubitus en diabetes mellitus. Al deze factoren worden beschouwd als risicofactoren voor het verkrijgen van ESBL-producerende micro-organismen.<sup>6</sup>

Uit onderzoek, verricht in verschillende landen, blijkt dat verpleeghuisbewoners een belangrijk reservoir zouden kunnen zijn van ESBL-positieve stammen. Zo bleek uit een puntprevalentieonderzoek dat 18 van de 39 patiënten (46%) in een verpleeghuis in Chicago, is gekoloniseerd met ceftazidim-resistente *Escherichia coli*.<sup>7</sup> We gaan er vanuit dat deze cijfers in de Nederlandse verpleeghuizen lager liggen gezien het restrictieve antibioticabeleid en het actieve infectiepreventiebeleid dat in Nederland wordt gehanteerd.<sup>8-10</sup>

Drs. B.B. Wintermans, afdeling Medische Microbiologie en Infectiepreventie, VU medisch centrum Amsterdam.  
Correspondentieadres: dr. Y.J. Debets-Ossenkopp, arts-microbioloog  
VU medisch centrum Amsterdam, De Boelelaan 1118, 1007 MB  
Amsterdam, e-mail: yj.debets@vumc.nl.

Het doel van dit onderzoek is inzicht te krijgen in de mate van voorkomen van dragerschap van ESBL-positieve Enterobacteriaceae onder verpleeghuisbewoners en long stay care-instellingen. Tevens biedt dit onderzoek ons de gelegenheid een nieuwe ESBL-screeningsplaat, de EbSA-plaat van Alfa-Omega, te vergelijken met onze huidige routinematig gebruikte ESBL-screeningsplaat.<sup>11</sup> Optredende infecties met ESBL-positieve Enterobacteriaceae verdienen extra aandacht, omdat ze vaak alleen nog kunnen worden behandeld met intraveneus of intramusculair toegediende antibiotica van de klasse carbapenems en een recent geregistreerd antibioticum, tigecycline, een afgeleide van tetracycline.<sup>12</sup>

## Materiaal en methode

De directie en de medische staf van de verpleeghuizen zijn schriftelijk benaderd; hen werd om medewerking aan het onderzoek gevraagd. Aan de Medisch Ethische Commissie van het VU medisch centrum is de studie voorgelegd en de commissie heeft toestemming verleend. Van de zes aangeschreven instellingen hebben vier toegezegd en drie verleenden daadwerkelijk medewerking. Na instructie door de auteurs, aan de verpleging heeft de verpleging aan de bewoners of aan diens vertegenwoordiger om toestemming voor participatie aan het onderzoek gevraagd en daarbij is een informatiebrief uitgereikt. Deze brief bevatte beknopte inhoudelijke informatie over het onderzoek, de anonimiteit bij deelname en de procedure.

Gedurende drie maanden (april-juli 2008) is patiëntenmateriaal verzameld bij twee verpleeghuizen, regio Noord-Brabant (NB1, NB2) en een revalidatiecentrum uit de regio Noord-Holland (NH). Van elke patiënt werd één fecesmonster gevraagd.

De 75 fecesmonsters werden gescreend op ESBL-positieve micro-organismen zoals later beschreven. Verdachte stammen werden getest op ESBL-productie. De toegepaste methode is gebaseerd op de NVMM-richtlijnen voor screenen en confirmatie van ESBL in Enterobacteriaceae.<sup>1</sup> Indien de feces niet dezelfde dag nog kon worden verwerkt, werd het ingevroren bij -20 °C.

## Feces

0,3 gram feces werd gesuspenseerd in 3 ml fysiologisch zout. Van de fecesmonsters van NB2 en NHf werd 2x200 µl geënt op zowel de screeningsplaten EbSA als de BLSE. Bij NB1 is enkel de BLSE-plaat gebruikt (dit vanwege logistieke redenen).

De platen werden geïncubeerd bij 37 °C en na 24 en 48 uur afgelezen. Bij groei werd van elke morfologisch verschillende kolonie een oxidasetest uitgevoerd ter uitsluiting van de niet-fermentatieve staven zoals *Pseudomonas*. Enterobacteriaceae zijn oxidasenegatief. Oxidasenegatieve stammen werden rein gekweekt op *MacConkey*-agar en na 24 uur incubatie werd van de stam een ESBL-confirmatietest ingezet met de DDCT-methode.

## ESBL-screeningsplaten

Er zijn twee screeningsplaten gebruikt, de bèta-lactamase-screeningsagar (BLSE) van *AES Laboratory France* en de ESBL-screeningsagar (EbSA) van *Alpha-Omega Instruments-Diagnostics*. De BLSE is een tweevlaksplaat met op de ene helft Drigalski-agar met 1,5 mg/l cefotaxim en op de andere helft *MacConkey*-agar met 2 mg/l ceftazidim, de routinematig gebruikte plaat. De EbSA-plaat is recent op de markt gebracht; deze is meegenomen in deze studie om de prestatie hiervan te vergelijken met die van de BLSE-plaat. De EbSA kon uiteindelijk om logistieke redenen alleen worden gebruikt voor de fecesmonsters van NB2 en NHf (een totaal van 53 fecesmonsters, 1 fecesmonster/persoon is ermee gescreend). De EbSA-plaat is eveneens een tweevlaksplaat met op de ene helft *MacConkey*-agar met ceftazidim (1 mg/l) en op de andere helft *MacConkey*-agar met cefotaxim (1 mg/l). In beide helften zit bovendien cloxacilline (400 mg/l) en vancomycine (64 mg/l). Deze plaat heeft als voordeel dat de cloxacilline in de agar de groei van micro-organismen die AmpC-β-lactamase produceren en geen ESBL-enzym, remt. Toevoeging van cloxacilline verhoogt de selectiviteit van de plaat met ongeveer 25%.<sup>11</sup>

## DDCT-fenotypische ESBL-confirmatietest

Clavulaanzuur remt de ESBL's van klasse-A. Van deze eigenschap wordt gebruikgemaakt in deze test om *in vitro* de productie van ESBL door de bacterie aan te tonen.<sup>13</sup> *Mueller Hinton*-platen (Difco) werden met een wattenstok geënt met een bacteriesuspensie met een dichtheid van 0,50-0,55 McFarland, van de ESBL-positiefverdachte stam. Op deze plaat werden vervolgens tabletten gelegd van cefotaxim, ceftazidim en cefepim met en zonder clavulaanzuur. Na 24 uur incubatie bij 37 °C werden de remmingszones rond de tabletten gemeten, als diameter in millimeters. De test wordt als positief beoordeeld indien bij één of meer van de drie combinaties cefalopsorine/clavulaanzuur, de remmingszone rond de clavulaanzuurbevattende tablet 5 mm of groter is dan die van de clavulaanzuurvrije tablet, dit conform de Nederlandse richtlijnen.<sup>1</sup> Door te testen met verschillende cefalosporines verhoogt men de sensitiviteit van de test.

De cefepimcombinatie hebben we direct meebepaald in deze studie, omdat stammen die zowel AmpC als ESBL produceren, fenotypisch moeilijker als ESBL-positief zijn te detecteren met de cefotaxim/ en/of ceftazidim/clavulaanzuurcombinatie dan met de cefepim/clavulaanzuurcombinatie in vergelijking tot stammen die alleen ESBL produceren. Met cefepim lukt dit beter, omdat cefepim beter bestand is tegen hydrolyse door de bèta-lactamase van het AmpC-type, waardoor het effect van de clavulaanzuur beter te zien blijft in de test.

De gevoeligheid voor cefoxitin wordt bepaald om AmpC-productie aan te tonen, stammen die AmpC produceren zijn cefoxitinresistent. Stammen die alleen ESBL produceren zijn cefoxitingevoelig.

Vervolgens werden de als ESBL-positief beoordeelde stammen met het GN-panel VITEK 2® (BioMérieux) geïdentificeerd. Tevens werd van elke stam het antibiogram met de AST-20-panel VITEK 2® bepaald. Hierna zijn de Enterobacteriaceae geïncubeerd en de oxidase-negatieve niet-fermenterende micro-organismen (zoals de Acinetobacters) geëxcludeerd, omdat deze micro-organismen niet door middel van deze fenotypische methode kunnen worden getest op ESBL-productie (figuur 1).

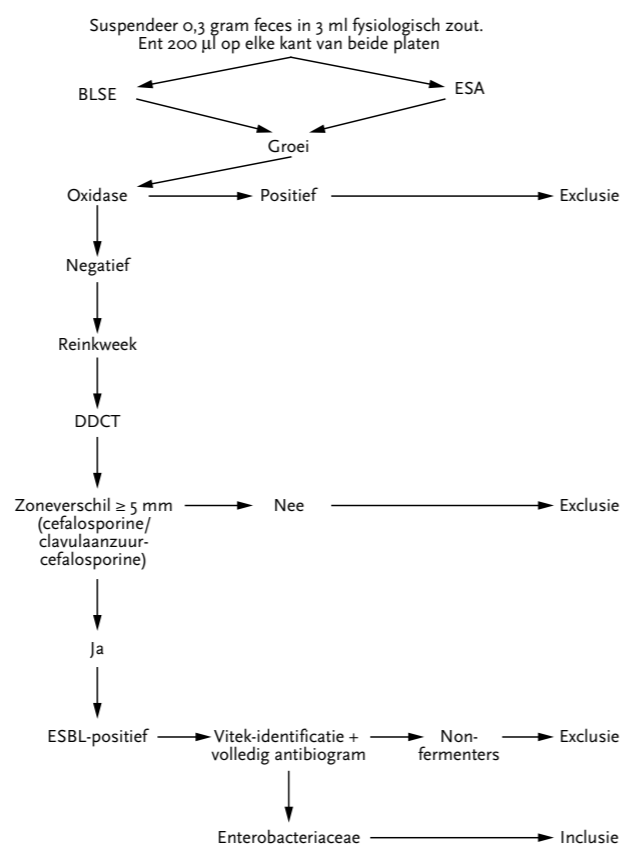
### Genotyping

Van alle stammen ESBL, positief met de DDCT, werd een PCR gedaan op TEM-, SHV-, CTX-M-type ESBL. Deze types zijn de meest voorkomende in Enterobacteriaceae, de groep 'overige' van klasse-A (zoals VEB, PER, GES, BES) en de OXA-type (klasse D) hebben wij niet meegenomen in dit onderzoek; deze komen het meest voor bij de niet-fermentatieve gramnegatieve staven.

De gebruikte primers voor SHV, TEM en CTX-M zijn de primers beschreven in het artikel van Al Naiemi, zo ook de gebruikte sequentieanalyse.<sup>14</sup>

Het CTX-M-gen codeert voor ESBL-productie. Bij het vinden van de genen SHV en TEM is het mogelijk dat het om een ESBL-positieve stam gaat. Er moet worden gezocht naar de specifieke aminozuursubstituties die ESBL-productie tot gevolg hebben. Daarvoor werd een sequentieanalyse gedaan van het PCR-product.

Figuur 1. Schematische weergave ESBL-confirmatietest



Tabel 1. Overzicht PCR- en sequenceresultaten

	CAZ	CAZ-CL	CTX	CTX-CL	CEX	CPM	CPM-CL	VERSCHIL IN REMMINGSZONE (MM)	MICRO-ORGANISME	PCR SEQUENCE
1*	11	17	17	14	12	29	30	6,-3,1	<i>Citrobacter freundii</i>	Geen
2*	20	26	26	24	21	35	35	6,-2,0	<i>Escherichia coli</i>	Geen
3*	11	16	18	15	15	30	29	5,-3,-1	<i>Citrobacter freundii</i>	Geen
4	34	34	30	36	30	35	35	0,6,0	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	SHV 11
5**	10	28	10	30	25	13	35	18,20,22	<i>Escherichia coli</i>	CTX-M, TEM
6*	10	11	10	16	10	27	26	1,6,-1	<i>Enterobacter cloacae</i>	Geen
7	10	15	20	16	28	28	28	5,-4,0	<i>Hafnia alvei</i>	Geen
8**	18	30	9	32	29	21	33	12,23,12	<i>Escherichia coli</i>	CTX-M, TEM
9**	20	28	15	30	26	22	31	8,15,9	<i>Escherichia coli</i>	CTX-M, TEM
10*	25	30	35	36	33	29	33	5,1,4	<i>Escherichia coli</i>	Geen
11**	17	31	19	32	30	26	34	14,13,8	<i>Escherichia coli</i>	TEM 52

\* Met PCR geen ESBL-genen gevonden

\*\* Met PCR/sequencing als definitief ESBL+

CAZ: ceftazidim, CAZ-CL: ceftazidim plus clavulaanzuur, CTX: cefotaxim, CTX-CL: cefotaxim plus clavulaanzuur CEX: cefoxitine, CPM: cefepim, CPM-CL: cefepim plus clavulaanzuur

## Resultaten

### Fenotypisch

Van alle fecesmonsters (n=75) werd bij 42 verschillende patiënten (NB1: 13, NB2: 18, NHf: 11) een totaal van 59 ceftazidim- en/of cefotaximresistente micro-organismen gevonden (NB1: 15, NB2: 30, NHf: 14). Van deze 59 micro-organismen bleken er 29 oxidase-negatief te zijn. Hiermee is verder gegaan. Elf stammen (van elf bewoners) van deze 29 stammen zijn positief in de fenotypische ESBL-confirmatietest (DDCT). Elf van de 75 bewoners waren op grond van deze fenotypische bevinding drager in de feces (14,7%), tabel 1).

### Genotypisch

De PCR- en sequenceresultaten zijn in tabel 1 weergegeven. Zes van de 11 fenotypisch positieve stammen waren negatief in de PCR. Drie van de 11 stammen hadden een CTX-M-gen en konden worden geclassificeerd als ESBL. De sequentieanalyse van de overige twee stammen toonde een stam met TEM<sub>52</sub> en een stam met SHV<sub>11</sub> aan. TEM<sub>52</sub> is door Poyart et al. (1998) als ESBL geclassificeerd.<sup>15</sup> Volgens eerder onderzoek van Nuesch-Inderbinen et al. (1997) codeert het SHV<sub>11</sub>-gen niet voor ESBL.<sup>16</sup> In totaal waren vier stammen ESBL-positief met PCR en sequencing.

We zagen een discrepantie tussen de fenotypische en de genotypische bevindingen. Het revalidatiecentrum NHf had met de fenotypische confirmatietest 5/23 positief en met de moleculaire methoden waren 3/23 ESBL positief. Het verzorgingshuis NB1 had fenotypisch 3/22 en genotypisch 0/22 ESBL positief. Het verzorgingshuis NB2 had fenotypisch 3/30 en genotypisch 1/30 ESBL positief.

Op grond van deze genotypische bevindingen zijn slechts vier van de 75 bewoners (5%) drager in tegenstelling tot de 14,7% met de fenotypische methode.

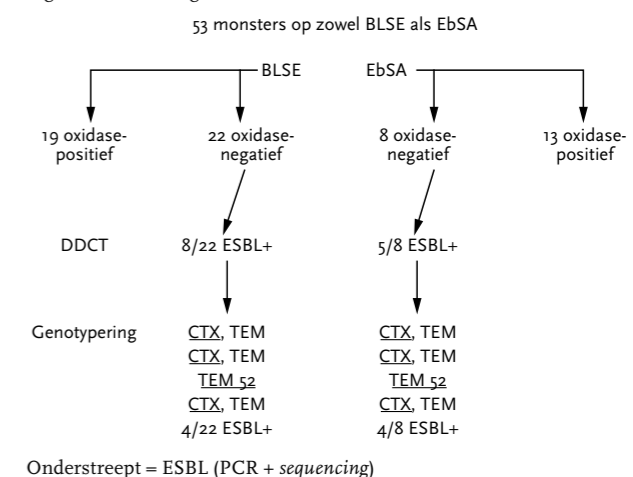
Alle zes stammen die negatief waren met de SHV-, TEM- en CTX-M-PCR hadden (bij herhaling) in de ESBL-DDCT-confirmatietest slechts voor één van de drie cefalosporine/clavulaanzuurcombinaties een remmingszoneverschil van 5 of 6 mm, precies op het breekpunt, hierdoor wél geclassificeerd als ESBL-positief. Vier van deze zes stammen (*E. coli*: 1 x, *Citrobacter freundii*: 2 x en *Enterobacter cloacae*: 1 x) waren cefoxitinresistent, augmentinresistent (MIC > 32 mg/l) en hadden een MIC > 1 mg/l voor één of beide oxyiminocefalosporines en voor cefepim een MIC < 1 mg/l. Dit antibiogram past meer bij een bèta-lactamase van het AmpC-type. Van de overige twee stammen was er één keer een *E. coli* en één keer een *Hafnia alvei*. De *E. coli* was cefoxitingevoelig, augmentinresistent (MIC > 64 mg/l), een MIC van 4 mg/l voor ceftazidim en voor cefotaxim en cefepim een MIC < 1 mg/l. De *H. alvei* was cefoxitingevoelig, augmentinresistent (MIC > 64 mg/l), ceftazidime en cefotaxim MIC > 64 mg/l en voor cefepim gevoelig (MIC < 1 mg/l).

De *Klebsiella pneumoniae*, positief in de PCR voor SHV<sub>11</sub>(geén ESBL) had een MIC < 1 mg/l voor alle cefalosporines en was positief voor één van de DDCT-combinaties.

### Evaluatie EbSA-platen

Screeningsresultaten van 53 fecesmonsters zijn samengevat in figuur 2.

Figuur 2. Screeningsresultaten



Op de BLSE-screeningsplaat zijn 19 oxidase-positieve en 22 oxidase-negatieve kolonies gegroeid. Van deze 22 oxidase-negatieve isolaten waren acht stammen ESBL-positief met de DDCT-test. Met de genotypische methode zijn vier van deze acht stammen ESBL-positief.

Op de EbSA-screeningsplaat zijn 13 oxidase-positieve en acht oxidase-negatieve kolonies gegroeid. Vijf van deze acht oxidase-negatieve stammen waren ESBL-positief met de DDCT-test. Met de gebruikte genotypische methode zijn vier van deze vijf stammen ESBL-positief.

### Discussie

In vergelijking met eerdergevonden resultaten in Nederlandse ziekenhuizen (7,8%)<sup>4</sup> hebben we met de gebruikte fenotypische methode een twee keer hoger ESBL-dragerschap in feces gevonden onder de onderzochte verpleeghuizen/revalidatiecentrum, 14,7% (11/75). Na genotypische bevestiging met PCR en sequencing vonden wij echter slechts bij vier van de 75 bewoners (5%) een dragerschap.

Er moet hierbij wel worden opgemerkt dat de genotypische uitslagen mogelijk een onderschatting van de incidentie weergeeft, omdat niet is gezocht met PCR naar de kleine groep 'overige' van de klasse-A ESBL's en naar de OXA-type ESBL's.

Daartegenover staat dat het antibiogram van de meerderheid van de stammen met de discrepante bevindingen meer past bij stammen met een AmpC-type bèta-lactamase- en/of clavulaanzuurresistentie. Het is dan van belang om bij een volgend onderzoek PCR en sequentieanalyse van alle ESBL-typen te includeren om

# HOMM of kuit, de bomen en het bos

B.C. van Hees (namens de werkgroep HOMM)

op deze manier meer inzicht te krijgen in de betekenis van deze kleine verschillen in remmingszones, rond het afbreekpunt van 5 mm, met de DDCT-test.

In het revalidatiecentrum ligt het percentage ESBL-dragerschap ten opzichte van de verpleeghuizen hoger. Risicofactoren en risico-indicatoren zoals langdurige opname, intensieve verzorging, urineverblijfskatheter, decubitus, diabetes mellitus en vaak het krijgen van antibiotica gedurende een langere tijd, kunnen hieraan ten grondslag liggen.

## De screeningsplaten

De EbSA presteerde even goed als de BLSE voor het direct screenen van feces op ESBL-positieve stammen. De EbSA heeft als voordeel dat er veel minder niet-ESBL-stammen op de plaat groeien dan op de BLSE-plaat, waardoor er minder vaak een confirmatietest hoeft te worden ingezet hetgeen kosten- en arbeidsbesparend werkt. De stam op de EbSA met de discrepante fenotypische/genotypische bevindingen was een *E. cloacae* (MIC cefepim <1 mg/l).

## Conclusie

Een totaal van 75 bewoners in verpleeghuizen en een revalidatiecentrum is getest op ESBL-fecaal dragerschap. Vier bewoners (5%) waren drager van een ESBL-positieve stam van het ESBL-type-TEM of CTX-M.

## Summary

Infections caused by extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) producing Enterobacteriaceae are of increasing concern in nursing homes.

**Objectives:** To assess the prevalence of fecal carriage of ESBL producing Enterobacteriaceae in Dutch nursing homes/rehabilitation centre.

**Settings:** Two community nursing homes and one rehabilitation centre.

**Methods:** Between April and July 2008, 75 nursing home/rehabilitation centre inhabitants/patients were screened for ESBL carriage in feces. Fecal samples were directly plated onto ESBL screening agars. Moreover, a new ESBL screening agar (EbSA) was evaluated. Enterobacteriaceae colonies were confirmed for ESBL production with the Double Disk Diffusion Test (DDCT) according to the guidelines of the Dutch Association of Medical Microbiology. All isolates that were positive in the DDCT test were confirmed for the presence of TEM-, SHV- or CTX-M type ESBL genes with PCR and sequence analysis.

**Results:** In 11 of the 75 inhabitants, we found Enterobacteriaceae that were ESBL positive by DDCT confirmation tests. Molecular analysis showed that 4 of these strains carried TEM- or CTX-M type ESBL genes.

**Conclusion:** Four of 75 inhabitants (5%) were fecal carriers of ESBL producing Enterobacteriaceae of the TEM- or CTX-M type.

## Literatuur

- Al Naiemi N, Cohen Stuart J, Leverstein van Hall M. NVMM-richtlijn voor screening en confirmatie van Extended-Spectrum Beta-Lactamases (ESBL's) in Enterobacteriaceae. <http://www.nvmm.nl/nvmm/nvmmcms.nsf/viewdoc/dc9c2b8fba0b7a8c12571ff0037bed>.
- Lahey Clinic. Amino acid sequences for TEM, SHV and OXA extended-spectrum and inhibitor resistant  $\beta$ -lactamases. <http://www.lahey.org/studies/webt.asp>.
- Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for  $\beta$ -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000;39:1211-33.
- Al Naiemi N, Bart A, Jong MD de, Vandenbroucke-Grauls CM, Rietra PJGM, Debets-Ossenkopp YJ, et al. Widely distributed and predominant CTX-M extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in Amsterdam, The Netherlands. *J Clin Microbiol.* 2006;44:3012-14.
- Wulf M, Kaan JA, Balen R van, CoxClaessens JHM van, Delden JJM van, Voss A. Verpleeghuizen worstelen met ESBL. *Med Contact.* 2006;49:1989-91.
- Rodrigues-Bano J, Navarro MD, Romero L, Martinez-Martinez L, Munian MA, Perea EJ, et al. Epidemiology and clinical features of infection caused by ESBL producing *E. coli* in nonhospitalized patients. *Clin Microbiol.* 2004;42:1089-94.
- Wiener J, Quinn JP, Bradford PA, Goering RV, Nathan C, Bush K, et al. Multiple antibiotic-resistant *Klebsiella* and *Escherichia coli* in nursing homes. *JAMA.* 1999;281(6):517-23.
- Rahal, JJ, Urban C, Horn D. Class restriction of cephalosporin use to control total cephalosporin resistance in nosocomial *Klebsiella*. *JAMA.* 1998;280:1233-7.
- Peña C, Pujol C, Ardanuy A, Ricart R, Pallares JA, Liñares, et al. Epidemiology a successful control of large outbreak due to *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum  $\beta$ -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 1998;42:53-8.
- Rice LB. Successful interventions for gram-negative resistance to extended-spectrum  $\beta$ -lactam antibiotics. *Pharmacother.* 1999;19:1205-8.
- Al Naiemi N, Murk JL, Savelkoul PHM, Vandenbroucke-Grauls CMJE, Debets-Ossenkopp YJ. Extended-spectrum beta-lactamases screening agar with AmpC inhibition, *Eur J Clin Microbiol.* 2009;28:989-90.
- Naesens R, Ursi JP, Van Schaeren J, Jeurissen A. In vitro activity of tigecycline against multidrug-resistant Enterobacteriaceae isolates from a Belgian hospital. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2009;28(4):381-4. Epub 2008 Sep 19.
- Livermore D, Woodford N. Laboratory detection and reporting of bacteria with extended spectrum beta-lactamases. <http://www.hpa-standardmethods.org.uk/documents/qsop/pdf/qsop51.pdf>.
- Al Naiemi N, Duim B, Savelkoul PHM, Spanjaard L, Jong E de, Bart A, et al. Widespread transfer of resistance genes between bacterial species in an intensive care unit: Implications for hospital epidemiology. *J Clin Microbiol.* 2005;43:4862-4.
- Poyart C, Mugnier R, Quesnes G, Berche R, Trieu-Cuot P. A novel extended-spectrum TEM-type  $\beta$ -lactamases (TEM-52) associated with decreased susceptibility to moxalactam in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1998;42:108-13.
- Nuesch-Inderbinen MT, Kayser FH, Hachler H. Survey and molecular genetics of SHV  $\beta$ -lactamases in Enterobacteriaceae in Switzerland: two novel enzymes, SHV-11 and SHV-12. *Antimicrob Agents Chemother.* 1997;41:943-9.

## Samenvatting

De modernisering van de medisch-specialistische vervolgoopleidingen is in volle gang. De herstructurering van de opleidingen tot medisch specialist is een wettelijke plicht waaraan ook de Nederlandse Vereniging voor Medische Microbiologie (NVMM) zal moeten voldoen en hetgeen zal moeten worden gevolgd door nieuwe opleidingseisen. In november 2005 werd door het Concilium en de NVMM in Groningen een studiedag georganiseerd. Het programma van die dag was gewijd aan de vraag of de specialistische opleiding aan herziening toe was; dit in het licht van de gewijzigde wetgeving en de opdracht van de CCMS (Centraal College Medische Specialismen). Vanuit deze achtergrond is de projectgroep HOMM (Herstructurering van de Opleiding Medische Microbiologie) van start gegaan. De aanwijzingen van de CCMS zijn gebruikt als leidraad voor het ontwerpen van een nieuw opleidingsplan. Samengevat gaat het om:

### Opleidingsstructuur:

- gebruik van algemene en vakspecifieke competenties in het curriculum;
- een modulaire opleidingsstructuur dan wel lijnstructuur voor het curriculum;
- gebruik van gestructureerd cursorisch onderwijs.

### Toetsing en beoordeling:

- voortgangsgesprekken;
- instelling van zogenoemde korte praktijkbeoordelingen (KPB's) gedurende de hele opleiding, minimaal één per maand;
- bijhouden van een portfolio;
- schriftelijke kennistoetsing;
- docentprofessionalisering.

**Trefwoorden:** herstructurering opleiding, competenties

## Inleiding

Portfolio, KPB, CCMS, BBOV, MOBG, 360° beoordeling, competenties, toetsing, HOMM....

Er speelt een heleboel in opleidingsland. Door de grote veranderingen in onze maatschappij is het onderwijs sinds de jaren zestig van de vorige eeuw in beweging. Modernisering van de opleiding tot specialist is niet

nieuw. Nadat de nieuwe curricula voor de vorming van student tot basisarts waren ingevoerd, werd het duidelijk dat ook de vervolgoopleidingen moesten worden vernieuwd, omdat de aansluiting van een specialistische opleiding op de basisopleiding dreigde verloren te gaan. Tegelijkertijd gaan ook de ontwikkelingen in de maatschappij en in de zorg door. Zij stellen steeds hogere eisen aan de kennis en vaardigheden van specialisten, die vervolgens ook nog toetsbaar moeten zijn. Daarbij moet worden geanticipeerd op transparantie bij het aannemen van assistenten, op heldere opleidingsdoelen en op het bijbrengen van betere communicatieve vaardigheden en attitude.<sup>1,2</sup> Dit proces wordt versneld en dwingender van aard door de kaderbesluiten van het wetgevende CCMS.<sup>3</sup> Verder zijn er beleidsdirectieven vanuit het ministerie van VWS die worden uitgevoerd via de MOBG (de stuurgroep Modernisering Opleidingen Beroepen Gezondheidszorg).

## Wat voorafging

'*Vernieuwing van de beroepen- en opleidingenstructuur in de zorg is leidend thema voor de komende jaren. De weg van die vernieuwing moet zonder aarzeling, maar met grote zorgvuldigheid gelopen worden*'.

Dat was de boodschap van de minister van Volksgezondheid, Welzijn en Sport (VWS) in zijn brief van 31 oktober 2003 aan de Tweede Kamer, als reactie op een aantal rapporten. Al geruime tijd ontplooiën de drie Colleges van de KNMG<sup>4</sup> ieder voor zich en gezamenlijk initiatieven om de opleiding van specialisten te moderniseren.

In oktober 2002 verscheen het rapport *De arts van straks* van de commissie Meyboom<sup>5</sup> en in juli 2003 het rapport *De zorg van morgen* van de commissie Legrand.<sup>6</sup> In deze rapporten worden aanbevelingen gedaan voor de herstructurering van de artsenopleiding. In het voorwoord van *De arts van straks* schrijft Prof. dr. Meyboom:

Correspondentie-adres: B.C. van Hees, arts-microbioloog, namens de werkgroep HOMM, e-mail: b.van.hees@gelre.nl.

'De tijd van 'kijk maar hoe ik het doe, dan leer je het vanzelf', waardoor het veel tijd kost voordat iemand gespreksvaardigheden, diagnostische handelingen of therapeutische technieken onder de knie heeft, is voorbij. Deze overweging is de drijfveer geweest om een nieuw medisch opleidingscontinuüm te ontwikkelen, waarbij de initiële opleiding tot basisarts en de vervolgoopleidingen op elkaar moeten aansluiten en opnieuw gestructureerd moeten worden.'

Ter implementatie van de Arts van Straks werd de Commissie Implementatie Opleidingscontinuüm en Taakherschikking (Commissie Legrand) in het leven geroepen.

Het advies 'De zorg van morgen, flexibiliteit & samenhang', van Commissie Legrand uit juli 2003 bevat tien aanbevelingen gericht op de doelmatigheid van de zorgorganisatie met een optimale benutting van de potentiële product capaciteit.

Mede op grond van deze rapporten kreeg het Centraal College voor de Medische

Specialismen (CCMS) de regie om de wetenschappelijke verenigingen te helpen tot het komen van een uniform stramen voor de opleiding met een betere aansluiting op de geneeskundestudie. Het doel van de modernisering is het maken van een competentiegericht curriculum dat leidt tot transparant en flexibel onderwijs.

Op 21 april 2004 heeft de Minister van VWS de stuurgroep voor de Modernisering van de Opleidingen en de Beroepsuitoefening in de Gezondheidszorg (MOBG) geïnstalleerd die de modernisering vorm moet geven. Tijdens de installatie heeft minister Hoogervorst zijn verwachting uitgesproken dat de stuurgroep gaandeweg het proces al zaken voor elkaar krijgt en op onderdelen liefst snel met concrete resultaten komt. "Vooral niet wachten met invoeren van wat al kan worden ingevoerd". Ook gaf Hoogervorst aan dat de bestaande beroepen- en opleidingenstructuur wat hem betreft fundamenteel mag veranderen. "U hoeft daarbij van mij niet per se heilige huisjes omver te schoppen. Maar als u vindt dat dat nodig is, heeft u mijn zegen."

#### Waarom vernieuwen?

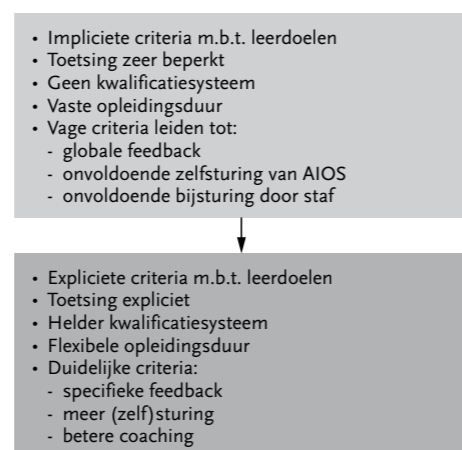
Volgens minister Hoogervorst is de nieuwe structuur hard nodig om meer samenhang te brengen in de opleidingen, om te zorgen dat de beroepen en opleidingen beter aansluiten bij de vraag uit de samenleving en om dreigende personeelstekorten in de zorg tegen te gaan.

Door de krappe arbeidsmarkt en een toenemende vraag naar individuele invulling van onderwijs wordt een steeds grotere flexibiliteit van de specialistenopleidingen gevraagd.

De Colleges bewaken de kwaliteit van de opleiding door middel van regelgeving. Inhoudelijk zal de vernieuwingsslag vooral een sterke wissel trekken op beroeps- en wetenschappelijke verenigingen, opleiders, opleidingsinrichtingen

en opleidingsinstituten. Het vergt inzet en tijd, maar het is tegelijkertijd noodzakelijk een moderne opleiding tot specialist te realiseren die aansluit bij of beter nog, vooruitloopt op de toekomstige positie van de specialist.

Figuur 1. Overgang van huidige naar nieuwe opleiding

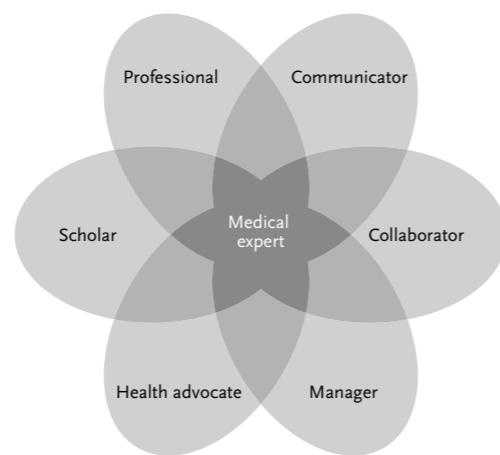


#### Hoe vernieuwen?

##### Eisen CCMS

Het nieuwe opleiden zal competentiegericht en transparant moeten zijn. Het bijhouden van een portfolio is verplicht, alsook een vaststaand aantal voortgangs- en beoordelingsgesprekken. Competenties beperken zich niet tot competenties die specifiek zijn voor een bepaald medisch specialisme. Ook vakoverstijgende competenties zijn een voorwaarde om een goede specialist te worden en volgens het advies van het College dienen deze te worden gebaseerd op de competentie-indeling, zoals beschreven in de CanMEDS2000.<sup>7</sup> CanMEDS 2000 beschrijft zeven competentiegebieden die bij elk specialisme terugkomen (figuur 2). Deze competentiegebieden zijn tot stand

Figuur 2. Competenties volgens CanMEDS 2000



gekomen naar aanleiding van een onderzoek in Canada, waarbij men aan de bevolking heeft gevraagd welke kenmerken men voor een dokter van belang vindt.

Voor het nieuwe opleidingsplan dienen de aanwijzingen van het CCMS te worden gebruikt als leidraad. Het gaat om de volgende onderwerpen:

##### Opleidingsstructuur:

- gebruik van algemene en vakspecifieke competenties in het curriculum;
- een modulaire opleidingsstructuur dan wel lijnstructuur voor het curriculum;
- gebruik van gestructureerd cursorisch onderwijs;

##### Toetsing en beoordeling:

- voortgangsgesprekken;
- instelling van zogenaamde korte praktijkbeoordelingen (KPB's) gedurende de hele opleiding, minimaal één per maand;
- bijhouden van een portfolio;
- schriftelijke voortgangstoetsing;
- docentprofessionalisering.

##### Te onderscheiden competenties:

1. Medisch handelen	Kennis en vaardigheden van het vak
2. Communicatie	Met patiënt, familie, professionals en medewerkers
3. Kennis en wetenschap	Evidence-based medicine, onderwijs geven, het publiek informeren, wetenschappelijk onderzoek doen
4. Samenwerking	Met collega's en zorgverleners binnen en buiten de kliniek
5. Organisatie	Doelmatig werken met anderen; zorglogistiek optimaliseren
6. Maatschappelijk handelen	Preventie, kennis en toepassen van het juridisch kader, risicomanagement, omgaan met fouten
7. Professionaliteit	Ethiek, reflectie, het kennen van de eigen grenzen

Alle competenties komen bij elk specialisme terug.

##### Commissie HOMM

Vanuit deze achtergrond is de projectgroep HOMM (Herstructurering van de Opleiding Medische Microbiologie) van start gegaan.

In november 2005 werd door het Concilium en de NVMM in Groningen een studiedag georganiseerd. Het programma van die dag was gewijd aan de vraag of de specialistische opleiding aan herziening toe was; dit in het licht van de gewijzigde wetgeving en de opdracht van de CCMS. Deze studiedag leidde tot het verzoek aan het bestuur van de NVMM om een projectgroep in het leven

te roepen die als opdracht kreeg het specialisme medische microbiologie te herzien volgens de richtlijnen van het CCMS.

Op 21 juni 2006 vond de eerste werkconferentie van de projectgroep plaats. Tijdens deze bijeenkomst is vooral gesproken over de werkwijze en zijn de uitgangspunten geformuleerd:

- De opleiding moet direct aansluiten op het beschreven beroepsprofiel;
- De te verwerven competenties en de verschillende beroepsspecifieke thema's dienen te worden gedefinieerd;
- Er dient een opleidingsplan te worden geschreven dat kan rekenen op een maximaal draagvlak;
- HOMM moet leiden tot een pragmatisch document waar opleiders en zij die worden opgeleid, zich in kunnen herkennen;
- HOMM moet leiden tot een plan dat op OOR-niveau vrijheden toelaat en ruimte biedt aan een 'couleur locale';
- HOMM biedt een opleidingsplan aan, maar heeft niet de ambitie alles te willen regelen.

##### Opleidingsthema's

De leerdoelen worden bereikt door competent te worden in de specialismespecifieke thema's van de medische microbiologie. Thema's zijn onderdelen van het leerprogramma. Deze thema's bestrijken het hele vakgebied van de medische microbiologie. Per thema worden de relevante competentiegebieden omschreven in 'themakaarten'. De hoofdpijlers van het vakgebied medische microbiologie omvatten negen hoofdthema's. Deze thema's zijn gebaseerd op de verschillende stades en onderdelen die gedurende de opleiding worden doorlopen. Deze thema's lopen synchroon met het opleidingsschema van de AIOS, zoals vastgelegd in het Besluit Medische Microbiologie (CCMS, artikel B2)<sup>8</sup> en zijn gebaseerd op het Beroepsprofiel<sup>9</sup> van de NVMM.

##### Thema's medische microbiologie

1. Bacteriologie
2. Virologie
3. Parasitologie
4. Mycologie
5. Infectiologie en intercollegiale consulten
6. Infectiepreventie en ziekenhuishygiëne
7. Openbare gezondheidszorg
8. Wetenschappelijke vorming
9. Laboratoriummanagement

Per thema is een thema- en een toetskaart opgesteld. Tevens correspondeert elk thema met een hoofdstuk uit het logboek. De themakaart geeft een goed overzicht van de

inhoud van de stage en op de toetskaart kunnen de KPB's en andere toetsmomenten worden aangegeven.

Een KPB heeft als doel het vastleggen en nabespreken van het functioneren van AIOS op onderdelen van competenties door middel van observatie met behulp van een gestructureerd beoordelingsformulier. Een KPB kan op ieder moment gedurende de stage worden afgenomen. Observatiemomenten worden primair bepaald door de mogelijkheden die de bedrijfsvoering biedt. Als regel geldt dat bij elke AIOS eenmaal per maand een KPB wordt afgenomen met een minimum van 10 per jaar. De inhoud van een KPB beperkt zich tot het beoordelen van een beperkt aantal competenties.

#### Voorbeeld van KPB's

##### Thema Bacteriologie

- Microscopische preparatentoets;
- Stamentoets; het zelfstandig determineren van 10 onbekende stammen;
- Zelfstandig kunnen afhandelen van een tafel/station.

##### Thema Infectiologie en intercollegiale consulten

- Observatie van supervisor tijdens multidisciplinair overleg;
- Uitwerking van vijf klinische casus inclusief follow-up, nabespreken met supervisor;
- Dienstoverdracht na het doen van dienst;
- Overzicht van consultverslagen van een dag bespreken met supervisor.

Het invulling geven aan de KPB's wordt voor een deel overgelaten aan de opleidinginrichting en de 'couleur locale'. Uiteindelijk zal iedere AIOS alle thema- en toetskaarten doorlopen, waarbij de AIOS op de verschillende competentiegebieden wordt getoetst.

#### Voortgang

Naar verwachting treedt op 1 januari 2011 het nieuwe kaderbesluit CCMS in werking. Het proces is nog steeds in volle gang en steeds meer wetenschappelijke verenigingen

leggen hun vernieuwde opleidingsplan aan het CCMS voor. Inmiddels zijn er diverse plannen binnen het CCMS besproken en goedgekeurd. Het betreft hier de volgende specialismen: klinische geriatrie, maag-darm-leverziekten, longziekten, radiologie, klinische genetica, anesthesiologie, heilkunde, reumatologie, keel-, neus- en oorheelkunde, en SEH-(spoedeisende hulp)geneeskunde. Daarnaast waren de plannen van de gynaecologie en kindergeneeskunde al in een eerder stadium gemoderniseerd.

Op 14 september 2009 is ook het nieuwe opleidingsplan van de microbiologie goedgekeurd door de CMMS. Er is een implementatiecommissie samengesteld die een blauwdruk zal ontwikkelen, waarna de lokale opleidingen zelf invulling kunnen gaan geven aan het opleidingsplan. Op korte termijn zullen we dus ervaring gaan opdoen met het denken in competenties, KPB's, beoordelingen etc. Een uitdagende, nieuwe episode in opleidingsland.

#### Literatuur

1. Projectplan Modernisering Specialisten Opleiding. KNMG 28 september 2004 (04-64188).
2. Project 'Modernisering Medische Vervolgopleidingen' Ontwikkeling en implementatie van een vernieuwd opleidingstraject tot (medisch) specialist. Utrecht, september 2005.
3. Kaderbesluit CCMS. Centraal College Medische Specialismen. Besluit van 9 februari 2004 houdende de algemene eisen voor de opleiding, registratie en herregistratie van medisch specialisten en voor de erkenning van opleiders, plaatsvervangend opleiders, stageopleiders en opleidingsinrichtingen [kaderbesluit CCMS]. Beschikbaar op: <http://www.knmg.nl>.
4. Centraal College Medische Specialismen (CCMS), College voor Huisartsgeneeskunde en Verpleeghuisgeneeskunde (CHVG), College voor Sociale Geneeskunde (CSG).
5. Meyboom-de Jong B, Schmit Jongbloed LJ, Willemsen MC, editors. De arts van straks. Een nieuw medisch opleidingscontinuüm. Utrecht: KNMG/DMW-VSNU/VAZ/NVZ/LCVV, 2002.
6. Legrand-van den Bogaard MJM, Rooijen APN van, editors. De zorg voor morgen. Flexibiliteit en samenhang. Advies van de Commissie Implementatie Opleidingscontinuüm en Taakherschikking. Den Haag: Ministerie van VWS, juli 2003.
7. CanMEDS 2000. Frank JR, editor. The CanMEDS 2005 physician competency framework. Better standards. Better Physicians. Better care. Ottawa: The Royal College of Physicians and Surgeons of Canada, 2005. Beschikbaar op: <http://www.rcpsc.medical.org>.
8. Kaderbesluit CCMS en Besluit Medische Microbiologie.
9. NVMM Beroepsprofiel Medische Microbiologie te vinden op [www.nvmm.nl](http://www.nvmm.nl).

# Klebsiella pneumoniae carbapenemases: epidemiology, clinical microbiology, and available antibiotics

G. Patel, A. Endimiani, R.A. Bonomo

#### Abstract

The association between poor clinical outcomes and the increasing prevalence of Gram-negative bacteria resistant to extended-spectrum cephalosporins established carbapenems as the antibiotic of choice for empiric treatment of serious healthcare-associated infections. Carbapenem resistance, however, is being described with increasing frequency. The expression of a plasmid-mediated serine carbapenemase, *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC), is the most commonly described carbapenem resistance determinant among Enterobacteriaceae in the United States and is rapidly emerging in other parts of the world. KPC enzymes hydrolyze carbapenems and other  $\beta$ -lactam antibiotics like penicillins and cephalosporins, rendering these commonly used agents inactive. In addition, KPC-producing bacteria often demonstrate *in vitro* resistance to fluoroquinolones and aminoglycosides, thus severely limiting the antibiotics available to treat these infections. With a lack of novel therapeutics being developed to treat carbapenem-resistant Gram-negative bacteria, an emphasis should be placed on improving clinical recognition, early and accurate microbiologic detection, and timely implementation of and adherence to infection control measures to decrease healthcare-associated transmission of these bacteria.

**Keywords:** KPC, *klebsiella pneumoniae*, carbapenemase, carbapenem-resistant

#### Introduction

Infections with multidrug-resistant bacteria are a significant source of healthcare-associated morbidity and mortality. In recent years, much emphasis has been placed on the detection and treatment of relatively drug-resistant Gram-positive bacteria like methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and vancomycin-resistant enterococci.<sup>1-3</sup> During this same period of time, there has been an insidious and less publicized increase in the clinical isolation of increasingly resistant Gram-negative bacteria, particularly *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, and most recently *Klebsiella pneumoniae*.<sup>1,4-6</sup>

Identification of  $\beta$ -lactam resistance among *P. aeruginosa* and *Acinetobacter* spp., as well as the widespread distribution of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL) producing Enterobacteriaceae, led to growing clinical use of carbapenems (e.g., imipenem and meropenem). Clinical and microbiologic failures associated with delayed administration of carbapenems or reliance on alternate antibiotic classes promoted carbapenems to the drug of choice in the setting of severe sepsis in many institutions.<sup>7-9</sup> As carbapenems became the 'workhorse' antibiotics in many intensive care units (ICUs) to treat select patients, such as those with prolonged healthcare exposure or the highly antibiotic experienced, increasing isolation of carbapenem-resistant *P. aeruginosa* and *A. baumannii* were reported.<sup>10-14</sup> Carbapenem resistance in Enterobacteriaceae is a recent phenomenon. In a short period of time, these highly resistant bacteria have become entrenched in healthcare facilities in the northeast United States and have successfully spread globally. The increasing clinical isolation of these organisms and their relative rapid dissemination pose a sizable public health challenge. This article reviews the clinical and molecular epidemiology of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae, with a specific emphasis on *K. pneumoniae* carbapenemase (KPC) producing organisms, and the diagnostic and treatment concerns associated with infections with these emerging pathogens.

A. Endimiani, Department of Medicine, Case Western Reserve University School of Medicine and the Research Service, Louis Stokes Cleveland Department of Veterans Affairs Medical Center, Cleveland (USA), R.A. Bonomo, Department of Pharmacology and Molecular Biology and Microbiology, Case Western Reserve University School of Medicine, Cleveland  
Correspondentieadres: G. Patel MD, Division of Infectious Diseases, Department of Medicine, Mount Sinai School of Medicine, One Gustave L. Levy Place Box 1090, New York, NY 10029, e-mail: [gopi.patel@mssm.edu](mailto:gopi.patel@mssm.edu).



### Clinical epidemiology

Carbapenem resistance amongst Enterobacteriaceae was first recognized in the early 1990s.<sup>15</sup> Clinical isolation of carbapenem-resistant *K. pneumoniae* (CRKP) increased in frequency but remained sporadic.<sup>15,16</sup> In recent years, healthcare-associated infections with CRKP are being reported at an alarming rate, particularly in the United States, Greece and Israel.<sup>1,17-20</sup> A surveillance study from Brooklyn (New York) reported that more than one-third of submitted clinical isolates of *K. pneumoniae* demonstrated carbapenem resistance *in vitro* and almost a quarter of all collected isolates were resistant to fluoroquinolones and aminoglycosides as well as carbapenems and other  $\beta$ -lactams.<sup>21</sup> In 2007, the United States' Centers for Disease Control and Prevention (CDC) noted that 8% of all *K. pneumoniae* responsible for healthcare-associated infections were carbapenem-resistant compared with less than 1% in 2000.<sup>1,17</sup> To date thirty-three states have reported isolation of KPC-producing Enterobacteriaceae with the phenomenon endemic to New York City and the northeast United States.<sup>22,23</sup>

Early observational reports from the United States, Korea, and Greece aiming to identify risk factors for the acquisition of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae, specifically CRKP, suggest that patients at-risk are critically ill and received multiple classes of antibiotics.<sup>24-26</sup> Healthcare institutions throughout Israel reported an increased number of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae infections in their inpatient populations.<sup>18,27</sup> A matched case-control study cited poor underlying functional status, ICU exposure, and previous antibiotics, specifically fluoroquinolones and carbapenems, as independent risk factors for acquisition of CRKP.<sup>28</sup> This study also evaluated the clinical outcomes associated with CRKP noting that acquisition was independently associated with an in-hospital mortality of 44%. A larger study out of New York City demonstrated similar findings in terms of epidemiology and CRKP-associated in-hospital mortality.<sup>29</sup> In this study, 48% of patients with invasive CRKP infection did not survive their index hospitalisation. CRKP infection was independently associated with recent transplantation, pre-infection length of stay, and exposure to cephalosporins and carbapenems. Clinical isolation of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae has also been described in France, the United Kingdom, Scandinavia, Poland, South America, the Caribbean, and Asia.<sup>30-38</sup> Most of these cases are sporadic and have rarely been associated with exposure to healthcare systems in areas of endemicity.

### Molecular epidemiology and clinical microbiology

Carbapenem resistance among Enterobacteriaceae results from one or a combination of the following mechanisms: hyperproduction of AmpC  $\beta$ -lactamases (cephalosporinases), loss of outer membrane porins, drug efflux, or

carbapenemase production (e.g., metallo- $\beta$ -lactamases and oxacillinases).<sup>16,39</sup> Carbapenem-resistance among Enterobacteriaceae in the United States, Greece, and Israel is attributed primarily to plasmid-mediated expression of a class A KPC-type serine carbapenemase.<sup>39</sup> These enzymes are capable of efficiently hydrolyzing carbapenems as well as other  $\beta$ -lactam antibiotics like penicillins, cephalosporins, and the monobactam aztreonam, and do not appear to be overcome *in vitro* by clinically available  $\beta$ -lactamase inhibitors (e.g., clavulanate and tazobactam).<sup>40</sup> KPC  $\beta$ -lactamases have been identified in many Enterobacteriaceae and *Pseudomonas* spp.. However, *K. pneumoniae* still remains the most common species possessing these clinically important enzymes.

Carbapenem resistance secondary to KPC production was first described in a *K. pneumoniae* isolate identified in North Carolina in 1996.<sup>41</sup> Characterization of KPC-1 was soon followed by the description of KPC-2.<sup>42</sup> Initially characterized as a different subtype and now noted to be the same enzyme as KPC-1, KPC-2 has been described with increasing frequency in the New York metropolitan area since 2004.<sup>43,44</sup> Initial surveys of the northeast United States suggested that KPC-2 was the major carbapenemase expressed in clinical isolates from this region but there is growing description of isolates containing KPC-3.<sup>45,46</sup> KPC-3 appears to be the predominant subtype identified in carbapenem-resistant Enterobacteriaceae associated with infections in Israel.<sup>18-20</sup> To date, seven KPC subtypes (KPC-2 through KPC-8) have been reported with the majority of analyzed isolates expressing either KPC-2 or KPC-3.<sup>17,30,33,47</sup>

The gene encoding these plasmid-mediated KPCs, *bla*<sub>KPC</sub>, has been mapped to a Tn3-based transposon, Tn4401.<sup>48</sup> Transposition of Tn4401 and plasmid transfer of *bla*<sub>KPC</sub> has been described.<sup>49,50</sup> It has also been noted that some plasmids with *bla*<sub>KPC</sub> carry concomitant genes conferring resistance to fluoroquinolones and aminoglycosides.<sup>51,52</sup> KPC-producing *K. pneumoniae* can also have complex  $\beta$ -lactamase backgrounds carrying a number of  $\beta$ -lactamases in addition to KPC.<sup>40</sup> The presence of a plasmid-encoded resistance mechanism makes dissemination to other Gram-negative bacteria worrisome. KPC expression has been described in *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter* species, *Escherichia coli*, *Serratia marcescens*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella* species, *Citrobacter freundii*, *Pseudomonas putida*, and *P. aeruginosa*.<sup>45,49, 50,53-56</sup> The Tn4401 element appears to be conserved irrespective of the species.<sup>49</sup> Chromosomal expression of KPC in a single *P. aeruginosa* isolate from Colombia has been reported.<sup>54</sup> Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) suggests that a dominant clone of KPC-producing *K. pneumoniae* is responsible for outbreaks and interstate transmission in the United States.<sup>20,40</sup> Congruent PFGE patterns suggest clonality between KPC-producing *K. pneumoniae* strains responsible for outbreaks in Israel and the United States,

Greece and the United States, and the United Kingdom and Israel.<sup>20,57,57</sup> In order to better understand the rapid and widespread distribution of KPC-producing *K. pneumoniae* throughout the United States and internationally, the CDC performed PFGE and multilocus sequence typing (MLST) on isolates submitted to their reference laboratory over a twelve year time period (1996-2008). A dominant PFGE pattern was described and noted to be associated with a novel MLST type, ST 258.<sup>30</sup> It was also noted that a second sequence type, ST 14, was associated with isolates collected from institutions in the Midwest.<sup>22</sup> These findings suggest that certain strains of *K. pneumoniae* may either readily disseminate or be more apt to obtain and retain the *bla*<sub>KPC</sub> gene.

### Detection in the clinical laboratory

Failure to accurately identify KPC-producing Enterobacteriaceae in a timely fashion may lead to delays in the administration of appropriate antimicrobials and the implementation of infection control measures, like contact isolation. The routine methods employed by many clinical microbiology laboratories may be underestimating the true prevalence of KPC-producing Enterobacteriaceae. KPC-mediated carbapenem resistance can go completely unrecognized in laboratories that rely solely on automated identification and susceptibility testing (e.g., VITEK, MicroScan, Phoenix).<sup>58,59</sup> An earlier study of several automated systems found that these systems failed to detect carbapenem resistance in six to 87% of known carbapenem-resistant *K. pneumoniae* isolates.<sup>58</sup> There is increasing suggestion that contemporary minimum inhibitory concentration (MIC) breakpoints for imipenem and meropenem prohibit reliable detection KPC-mediated carbapenem resistance. The Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) recommended breakpoint for ertapenem is  $\leq 2$   $\mu\text{g}/\text{mL}$  and for imipenem and meropenem  $\leq 4$   $\mu\text{g}/\text{mL}$ .<sup>61</sup> Broth microdilution appears to be the most sensitive laboratory method to detect KPC-mediated carbapenem resistance using these breakpoints.<sup>59</sup> The process, however, is tedious and time consuming and is not ideal for rapid identification in the clinical setting. More commonly employed susceptibility testing methodologies (e.g., disk diffusion, Etest, or automated systems) achieve poor sensitivities using the accepted meropenem and imipenem breakpoints. Use of ertapenem appears to increase the sensitivity for detecting KPC production irrespective of laboratory testing modality.<sup>46,58,59,61</sup> It should be noted, however, that ertapenem resistance is not specific for KPC production since isolated ertapenem resistance may also be conferred by other mechanisms like ESBL production with loss of an outer membrane porin.<sup>62-64</sup> Elevated meropenem and imipenem MICs (2-4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), however, are more specific for identification of KPC-mediated carbapenem resistance than ertapenem

regardless of testing method. The CLSI currently recommends that Enterobacteriaceae, specifically *K. pneumoniae* and *E. coli*, demonstrating *in vitro* resistance to third generation cephalosporins and carbapenem MICs of  $\geq 2$   $\mu\text{g}/\text{mL}$  should be screened for carbapenemase production. Most clinical laboratories in areas of endemicity use PCR and/or the modified Hodge test to confirm KPC production. The modified Hodge test as described by Lee *et al.* has demonstrated a high sensitivity for detecting carbapenemase activity *in vitro*.<sup>59,68</sup> If all carbapenems test non-susceptible the role for confirming KPC production (e.g., modified Hodge test) is less clear.<sup>65</sup> According to CLSI, when the MICs for imipenem or meropenem are 2-4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  and the modified Hodge test is negative, these isolates should be reported as susceptible. There is rising concern, however, about using imipenem or meropenem to treat 'indetermined' isolates and clinical data are lacking. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) is more conservative in this matter and recommends different and lower carbapenem breakpoints for Enterobacteriaceae (i.e., ertapenem  $\leq 0.5$   $\mu\text{g}/\text{mL}$ , imipenem  $\leq 2$   $\mu\text{g}/\text{mL}$ , meropenem  $\leq 2$   $\mu\text{g}/\text{mL}$ ).<sup>66,67</sup>

In some institutions where other mechanisms of carbapenem resistance among Enterobacteriaceae are prevalent (e.g., metallo- $\beta$ -lactamases), boronic acid has been used to phenotypically detect KPC-production. Boronic acid acts as an AmpC inhibitor and had previously been used to detect expression of ESBLs and plasmid-mediated AmpC  $\beta$ -lactamases. Boronic acid disk testing, in combination with carbapenems or cefepime, achieved 100% sensitivity and between 95 and 100% specificity for detecting KPC-production.<sup>70,71</sup> Limited data suggest that a novel chromogenic agar may help in early identification of KPC-producing strains with a sensitivity and specificity of 100% and 98.4% when compared with PCR.<sup>69</sup> Rapid detection of KPC production does not necessarily indicate *in vitro* susceptibility to other antimicrobials and therefore the clinical utility of simply detecting KPC expression may be limited to implementation of contact isolation precautions and the early use of non-carbapenems and non- $\beta$ -lactam agents to treat suspected infections.<sup>72</sup>

### Therapeutics

As recounted above, there are few agents available to treat carbapenem-resistant Gram-negative infections. There is clinical and laboratory evidence suggesting that some KPC-producing strains of Enterobacteriaceae are susceptible to tetracyclines, aminoglycosides, polymyxins, and the glycolcycline tigecycline.<sup>21,73</sup> Bratu *et al.* in Brooklyn (New York) evaluated the molecular epidemiology and *in vitro* susceptibility patterns of 96 isolates of CRKP early on in the epidemic. About half were susceptible to aminoglycosides and approximately two-thirds were susceptible

to doxycycline. Ninety percent of these isolates demonstrated *in vitro* susceptibility to polymyxin B and all were considered susceptible to tigecycline. Bratu and colleagues suggested that aminoglycosides, specifically gentamicin, if susceptible, and polymyxins either alone or in combination with rifampicin were possible treatment options for CRKP infection.

Polymyxins, both polymyxin B and E (colistin), fell out of favor with the advent of more specific and better tolerated antibiotics. The reintroduction of these cationic polypeptides initially came with the emergence of carbapenem-resistance in *P. aeruginosa* and *A. baumannii*.<sup>74-75</sup> By analogy; clinicians have extended their use to the treatment of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae. Interpretive criteria for polymyxin E (i.e.,  $\leq 2 \mu\text{g/mL}$ ) have been established by the CLSI for *A. baumannii* and by EUCAST for Enterobacteriaceae.<sup>67-76</sup> Standard dosing regimens, especially in the setting of renal dysfunction or hemodialysis are not described. Increasing isolation of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae from sites where polymyxins do not reliably penetrate (e.g., lung and cerebrospinal fluid) has also become a concern in the treatment of the critically ill patient.<sup>77</sup> Intrathecal polymyxins have been used to treat MDR Gram-negative ventriculitis.<sup>78,79</sup> Aerosolized formulations can be employed to treat severe pulmonary infections.<sup>80</sup> Unfortunately, chemical ventriculitis can be a side effect of intrathecal therapy and bronchospasm has been associated with aerosolized drug. Intravenous polymyxins are also associated with renal insufficiency and a myriad of neurologic sequelae.<sup>81</sup> Most adverse events have been reversed with the discontinuation of the drug.

Tigecycline, a glycolcycline, is licensed for use in the treatment of skin and soft tissue infections as well as intra-abdominal infections. Tigecycline has demonstrated *in vitro* activity against many highly drug-resistant bacteria including methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, vancomycin-resistant enterococci, and carbapenem-susceptible ESBL-producing Enterobacteriaceae.<sup>82</sup> Tigecycline has also demonstrated favorable *in vitro* activity against carbapenem-resistant *A. baumannii*.<sup>83</sup> Unfortunately, this is not always reliable.<sup>84-86</sup> In addition, there is limited clinical evidence that tigecycline can be used to treat carbapenem-resistant Enterobacteriaceae.<sup>87,88</sup> There are limited data regarding the use of tigecycline in the treatment of bacteremias, osteomyelitis, cerebrospinal infections, or urinary tract infections.<sup>85,87,89-91</sup> The CLSI does not have provided breakpoints for tigecycline. Most laboratories in the United States use the breakpoints approved by the US Food and Drug Administration of  $\leq 2 \mu\text{g/mL}$  (Tigecycline package insert, Wyeth Pharmaceuticals). It should be noted that the EUCAST breakpoint is one dilution lower (i.e.,  $\leq 1 \mu\text{g/mL}$ ).<sup>67,92</sup>

The administration of appropriate antibiotics may be delayed in patients with carbapenem-resistant Enterobacteriaceae. There are many reasons for this: delays in identification, lack of a universal susceptibility pattern, and clinician knowledge. Physicians from institutions with a high prevalence of healthcare-associated infections with other carbapenem-resistant Gram-negative organisms (e.g., *Acinetobacter* species) may have less hesitation in using polymyxins or aminoglycosides early in the care of their patients as they are experienced with these medications.

Anecdotal reports exist of the successful treatment of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae with both polymyxins and tigecycline.<sup>87-93</sup> Some accounts involve an adjunctive therapeutic procedure (e.g., catheter removal, peritoneal lavage, or decortication of an empyema) in addition to systemic antimicrobials. Patel *et al.* showed that in patients with CRKP infection use of an adjunctive procedure to remove a focus of infection was independently associated with survival.<sup>29</sup> Administration of antibiotics with *in vitro* activity against subject-specific CRKP isolates and timely administration of those antibiotics were not associated with survival in this report. Although reported clinical successes suggest that polymyxins, tigecycline, and aminoglycosides may be promising in treating these infections when susceptible, the clinical efficacy of these salvage antibiotics remains unclear.

Unfortunately, polymyxin and tigecycline resistance has been described thus limiting the antimicrobial options even further in select cases.<sup>94-96</sup> The novel  $\beta$ -lactamase inhibitor NXL104 has shown promise in *in vitro* studies but clinical data remains lacking.<sup>97-99</sup>

## Conclusion

The increasing prevalence of KPC-producing Enterobacteriaceae is not only a diagnostic and therapeutic challenge, but also presents a significant threat to patient safety. Evolving epidemiology, an awareness of limitations in the clinical microbiology laboratory, and an appreciation of risks for the development of drug resistance should prime practitioners to suspect possible infection with these highly resistant bacteria in appropriate populations. In regards to management, clinicians are to be encouraged to remove possible foci of infection and to be familiar with susceptibility patterns within their own institutions. Due to the limited antimicrobial options available to treat infections with KPC-producing Enterobacteriaceae an increased emphasis should be placed on early and accurate laboratory detection of these carbapenemases and early implementation of appropriate infection control measures to decrease potential healthcare-associated transmission.

## Acknowledgements

Jayant S. Kalpoe MD PhD (Leiden University Medical Center, Leiden, The Netherlands), Shirish Huprikar MD (Mount Sinai School of Medicine, New York, NY), David P. Calfee MD MS (Mount Sinai School of Medicine, New York, NY).

RAB and AE are supported by Veterans Affairs Merit Review Award, The VISN 10 GRECC, and the National Institutes of Health.

## References

- Hidron AI, Edwards JR, Patel JB, et al. NHSN Annual Update: Antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: Annual summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2006-2007. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2008;29:996-1011.
- Klevens RM, Morrison MA, Nadle J, et al. Invasive Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in the United States. *JAMA.* 2007;298:1763-71.
- Arias CA, Murray BE. Antibiotic-resistant bugs in the 21st century -- A clinical super-challenge. *N Engl J Med.* 2009;360:439-43.
- Nicasio AM, Kuti JL, Nicolau DP. The current state of multidrug-resistant gram-negative bacilli in North America. *Pharmacother.* 2008;28:235-49.
- Paterson DL. Resistance in gram-negative bacteria: Enterobacteriaceae. *Am J Infect Control.* 2006;34:S20-8; discussion S64-73.
- Landman D, Bratu S, Kochar S, et al. Evolution of antimicrobial resistance among *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* and *Klebsiella pneumoniae* in Brooklyn, NY. *J Antimicrob Chemother.* 2007;60:78-82.
- Hyle EP, Lipworth AD, Zaoutis TE, Nachamkin I, Bilker WB, Lautenbach E. Impact of inadequate initial antimicrobial therapy on mortality in infections due to extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing Enterobacteriaceae: variability by site of infection. *Arch Intern Med.* 2005;165:1375-80.
- Paterson DL, Ko WC, Von Gottberg A, et al. Outcome of cephalosporin treatment for serious infections due to apparently susceptible organisms producing extended-spectrum  $\beta$ -lactamases: implications for the clinical microbiology laboratory. *J Clin Microbiol.* 2001;39:2206-12.
- Paterson DL, Ko WC, Von Gottberg A, et al. Antibiotic therapy for *Klebsiella pneumoniae* bacteremia: implications of production of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases. *Clin Infect Dis.* 2004;39:31-7.
- Go ES, Urban C, Burns J, et al. Clinical and molecular epidemiology of *Acinetobacter* infections sensitive only to polymyxin B and sulbactam. *Lancet.* 1994;344:1329-32.
- Paterson D. The Epidemiological profile of infections with multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* species. *Clin Infect Dis.* 2006;43:S43-S8.
- Urban C, Segal-Maurer S, Rahal JJ. Considerations in control and treatment of nosocomial infections due to multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Clin Infect Dis.* 2003;36:1268-74.
- Villegas MV, Hartstein AI. *Acinetobacter* outbreaks, 1977-2000. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2003;24:284-95.
- Harris AD, Smith D, Johnson JA, Bradham DD, Roghmann MC. Risk factors for imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* among hospitalized patients. *Clin Infect Dis.* 2002;34:340-5.
- Chow JW, Shlaes DM. Imipenem resistance associated with the loss of a 40 kDa outer membrane protein in *Enterobacter aerogenes*. *J Antimicrob Chemother.* 1991;28:499-504.
- Bradford PA, Urban C, Mariano N, Projan SJ, Rahal JJ, Bush K. Imipenem resistance in *Klebsiella pneumoniae* is associated with the combination of ACT-1, a plasmid-mediated AmpC  $\beta$ -lactamase, and the loss of an outer membrane protein. *Antimicrob Agents Chemother.* 1997;41:563-9.
- Srinivasan A, Patel JB. Commentary: *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing organisms: An ounce of prevention really is worth a pound of cure. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2008;29:1107-9.

- Leavitt A, Navon-Venezia S, Chmelnitsky I, Schwaber MJ, Carmeli Y. Emergence of KPC-2 and KPC-3 in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains in an Israeli hospital. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007;51:3026-9.
- Samra Z, Ofir O, Lishtzinsky Y, Madar-Shapiro L, Bishara J. Outbreak of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* producing KPC-3 in a tertiary medical centre in Israel. *Int J Antimicrob Agents.* 2007;30:525-9.
- Navon-Venezia S, Leavitt A, Schwaber MJ, et al. First report on a hyperepidemic clone of KPC-3-producing *Klebsiella pneumoniae* in Israel genetically related to a strain causing outbreaks in the United States. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53:818-20.
- Bratu S, Tolaney P, Karumudi U, et al. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Brooklyn, NY: molecular epidemiology and *in vitro* activity of polymyxin B and other agents. *J Antimicrob Chemother.* 2005;56:128-32.
- Kitchel B, Sundin DR, Patel JB. Regional dissemination of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53:3365-70.
- Urban C, Bradford PA, Tuckman M, et al. Carbapenem-resistant *Escherichia coli* harboring *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase  $\beta$ -lactamases associated with long-term care facilities. *Clin Infect Dis.* 2008;46:e127-30.
- Kwak YG, Choi SH, Choo EJ, et al. Risk factors for the acquisition of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* among hospitalized patients. *Microb Drug Resist* 2005;11:165-9.
- Falagas ME, Rafailidis PI, Kofteridis D, et al. Risk factors of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infections: a matched case control study. *J Antimicrob Chemother* 2007;60:1124-30.
- Ahmad M, Urban C, Mariano N, et al. Clinical characteristics and molecular epidemiology associated with imipenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Clin Infect Dis.* 1999;29:352-5.
- Marchaim D, Navon-Venezia S, Schwaber MJ, Carmeli Y. Isolation of imipenem-resistant *Enterobacter* species: Emergence of KPC-2 carbapenemase, molecular characterization, epidemiology, and outcomes. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008;52:1413-8.
- Schwaber MJ, Klarfeld-Lidji S, Navon-Venezia S, Schwartz D, Leavitt A, Carmeli Y. Predictors of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* acquisition among hospitalized adults and effect of acquisition on mortality. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008;52:1028-33.
- Patel G, Huprikar S, Factor SH, Jenkins SG, Calfee DP. Outcomes of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infection and the impact of antimicrobial and adjunctive therapies. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2008;29:1099-106.
- Kitchel B, Rasheed JK, Patel JB, et al. Molecular epidemiology of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in the United States: clonal expansion of multilocus sequence type 258. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53:3365-70.
- Monteiro J, Santos AF, Asensi MD, Peirano G, Gales AC. First report of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53:3333-4.
- Naas T, Nordmann P, Vedel G, Poyart C. Plasmid-mediated carbapenem-hydrolyzing  $\beta$ -lactamase KPC in a *Klebsiella pneumoniae* isolate from France. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49:4423-4.
- Robledo IE VG, Aquino EE, Moland ES, Sante MI, Hanson ND. A novel KPC variant, KPC-6, in a *Klebsiella pneumoniae* (Kp) isolated in Puerto Rico (PR) C2-3738. In: 48th Annual Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy and the Infectious Diseases Society of America 46th Annual Meeting; 2008; Washington DC, USA; 2008.
- Samuelsen O, Naseer U, Tofteland S, et al. Emergence of clonally related *Klebsiella pneumoniae* isolates of sequence type 258 producing plasmid-mediated KPC carbapenemase in Norway and Sweden. *J Antimicrob Chemother.* 2009;63:654-8.
- Villegas MV, Lolans K, Correa A, et al. First detection of the plasmid-mediated class A carbapenemase KPC-2 in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* from South America. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006;50:2880-2.
- Wei ZQ, Du XX, Yu YS, Shen P, Chen YG, Li LJ. Plasmid-mediated KPC-2 in a *Klebsiella pneumoniae* isolate from China. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007;51:763-5.
- Woodford N, Zhang J, Warner M, et al. Arrival of *Klebsiella pneumoniae* producing KPC carbapenemase in the United Kingdom. *J Antimicrob Chemother.* 2008;62:1261-4.

38. Baraniak A, Izdebski R, Herda M, et al. The emergence of *Klebsiella pneumoniae* ST258 with KPC-2 in Poland. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;AAC.00436-09.
39. Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: the versatile {beta}-lactamases. *Clin Microbiol Rev.* 2007;20:440-58.
40. Endimiani A, Hujer AM, Perez F, et al. Characterization of blaKPC-containing *Klebsiella pneumoniae* isolates detected in different institutions in the Eastern USA. *J Antimicrob Chemother.* 2009;63:427-37.
41. Yigit H, Queenan AM, Anderson GJ, et al. Novel carbapenem-hydrolyzing {beta}-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001;45:1151-61.
42. Smith Moland E, Hanson ND, Herrera VL, et al. Plasmid-mediated, carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase, KPC-2, in *Klebsiella pneumoniae* isolates. *J Antimicrob Chemother.* 2003;51:711-4.
43. Bradford PA, Bratu S, Urban C, et al. Emergence of carbapenem-resistant *Klebsiella* species possessing the class A carbapenem-hydrolyzing KPC-2 and inhibitor-resistant TEM-30 beta-lactamases in New York City. *Clin Infect Dis.* 2004;39:55-60.
44. Hossain A, Ferraro MJ, Pino RM, et al. Plasmid-mediated carbapenem-hydrolyzing enzyme KPC-2 in an *Enterobacter* spp. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48:4438-40.
45. Bratu S, Landman D, Alam M, Tolentino E, Quale J. Detection of KPC carbapenem-hydrolyzing enzymes in *Enterobacter* spp. from Brooklyn, New York. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49:776-8.
46. Bratu S, Landman D, Haag R, et al. Rapid spread of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in New York City: a new threat to our antibiotic armamentarium. *Arch Intern Med.* 2005;165:1430-5.
47. Wolter DJ, Kurpiel PM, Woodford N, Palepou MF, Goering RV, Hanson ND. Phenotypic and enzymatic comparative analysis of the novel KPC variant KPC-5 and its evolutionary variants, KPC-2 and KPC-4. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53:557-62.
48. Naas T, Cuzon G, Villegas M-V, Lartigue M-F, Quinn JP, Nordmann P. Genetic structures at the origin of acquisition of the {beta}-lactamase blaKPC gene. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008;52:1257-63.
49. Rasheed JK, Biddle JW, Anderson KF, et al. Detection of the *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase type 2 carbapenem-hydrolyzing enzyme in clinical isolates of *Citrobacter freundii* and *K. oxytoca* carrying a common plasmid. *J Clin Microbiol.* 2008;46:2066-9.
50. Cai JC, Zhou HW, Zhang R, Chen G-X. Emergence of *Serratia marcescens*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Escherichia coli* isolates possessing the plasmid-mediated carbapenem-hydrolyzing {beta}-lactamase KPC-2 in intensive care units of a Chinese hospital. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008;52:2014-8.
51. Rice LB, Carias LL, Hutton RA, Rudin SD, Endimiani A, Bonomo RA. The KQ element, a complex genetic region conferring transferable resistance to carbapenems, aminoglycosides, and fluoroquinolones in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008;52:3427-9.
52. Endimiani A, Carias LL, Hujer AM, et al. Presence of plasmid-mediated quinolone resistance in *Klebsiella pneumoniae* isolates possessing blaKPC in the United States. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008;52:2680-2.
53. Yigit H, Queenan AM, Rasheed JK, et al. Carbapenem-resistant strain of *Klebsiella oxytoca* harboring carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase KPC-2. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003;47:3881-9.
54. Villegas MV, Lolans K, Correa A, Kattan JN, Lopez JA, Quinn JP. First identification of *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing a KPC-type carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007;51:1553-5.
55. Miriagou V, Tzouveleki LS, Rossiter S, Tzelepi E, Angulo FJ, Whichard JM. Imipenem resistance in a *Salmonella* clinical strain due to plasmid-mediated class A carbapenemase KPC-2. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003;47:1297-300.
56. Tibbetts R, Frye JG, Marschall J, Warren D, Dunne W. Detection of KPC-2 in a clinical isolate of *Proteus mirabilis* and first reported description of carbapenemase resistance caused by a KPC beta-lactamase in *P. mirabilis*. *J Clin Microbiol.* 2008;46:3080-3.
57. Pourmaras S, Protonotariou E, Voulgari E, et al. Clonal spread of KPC-2 carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Greece. *J Antimicrob Chemother.* 2009;64:348-52.
58. Tenover FC, Kalsi RK, Williams PP, et al. Carbapenem resistance in *Klebsiella pneumoniae* not detected by automated susceptibility testing. *Emerg Infect Dis.* 2006;12:1209-13.
59. Anderson KF, Lonsway DR, Rasheed JK, et al. Evaluation of methods to identify the *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase in Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol.* 2007;45:2723-5.
60. Bratu S, Mooty M, Nichani S, et al. Emergence of KPC-possessing *Klebsiella pneumoniae* in Brooklyn, New York: epidemiology and recommendations for detection. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49:3018-20.
61. McGettigan SE, Andreacchio K, Edelstein PH. Specificity of ertapenem susceptibility screening for detection of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases. *J Clin Microbiol.* 2009;47:785-6.
62. Leavitt A, Chmelnitsky I, Colodner R, Ofek I, Carmeli Y, Navon-Venezia S. Ertapenem resistance among extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates. *J Clin Microbiol.* 2009;47:969-74.
63. Neil W, John WTD, Robert LRH, et al. Ertapenem resistance among *Klebsiella* and *Enterobacter* submitted in the UK to a reference laboratory. *Int J Antimicrob Agents.* 2007;29:456-9.
64. Doumith M, Ellington MJ, Livermore DM, Woodford N. Molecular mechanisms disrupting porin expression in ertapenem-resistant *Klebsiella* and *Enterobacter* spp. clinical isolates from the UK. *J Antimicrob Chemother.* 2009;63:659-67.
65. Institute CLS. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 19th Informational Supplement, CLSI Document M100-S19. Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne PA. January 2009.; 2009.
66. Paterson DL, Doi Y. Editorial Commentary: A step closer to extreme drug resistance (XDR) in gram-negative *Bacilli*. *Clin Infect Dis* 2007;45:1179-81.
67. <http://eucast.wvv137.server1.mensemedia.net/> (Accessed September 9, 2009).
68. Lee K, Chong Y, Shin HB, Kim YA, Yong D, Yum JH. Modified Hodge and EDTA-disk synergy tests to screen metallo-beta-lactamase-producing strains of *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species. *Clin Microb Infect.* 2001;7:88-91.
69. Samra Z, Bahar J, Madar-Shapiro L, Aziz N, Israel S, Bishara J. Evaluation of CHROMagar KPC for rapid detection of carbapenem resistant Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol.* 2008; 46(9):3110-1.
70. Tsakris A, Kristo I, Poulou A, et al. Evaluation of boronic acid disk tests for differentiating KPC-Possessing *Klebsiella pneumoniae* isolates in the clinical laboratory. *J Clin Microbiol.* 2009;47:362-7.
71. Tsakris A, Poulou A, Themeli-Digalaki K, et al. Use of boronic acid disk tests to detect extended-spectrum beta-lactamases in KPC carbapenemase-possessing Enterobacteriaceae clinical isolates. *J Clin Microbiol.* 2009;JCM.01314-09.
72. Guidance for control of infections with carbapenem-resistant or carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in acute care facilities. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2009;58:256-60.
73. Castanheira M, Sader HS, Deshpande LM, Fritsche TR, Jones RN. Antimicrobial activities of tigecycline and other broad-spectrum antimicrobials tested against serine carbapenemase- and metallo-{beta}-lactamase-producing Enterobacteriaceae: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008;52:570-3.
74. Falagas ME, Kasiakou Sofia K. Colistin. The revival of polymyxins for the management of multidrug-resistant gram-negative bacterial infections. *Clin Infect Dis.* 2005;40:1333-41.
75. Landman D, Georgescu C, Martin DA, Quale J. Polymyxins revisited. *Clin Microbiol Rev.* 2008;21:449-65.
76. Institute CalS. Performance standards for antimicrobial susceptibilities testing; 16th Informational Supplement. Approved Standard; CLSI Document M100-S16. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2006.
77. Zavascki Alexandre P, Goldani LZ, Cao G, et al. Pharmacokinetics of intravenous polymyxin B in critically ill patients. *Clin Infect Dis.* 2008;47:1298-304.
78. Segal-Maurer S, Mariano N, Qavi A, Urban C, Rahal JJ, Jr. Successful treatment of ceftazidime-resistant *Klebsiella pneumoniae* ventriculitis with intravenous meropenem and intraventricular polymyxin B: case report and review. *Clin Infect Dis.* 1999;28:1134-8.
79. Falagas ME, Bliziotis IA, Tam VH. Intraventricular or intrathecal use of polymyxins in patients with gram-negative meningitis: a systematic review of the available evidence. *Int J Antimicrob Agents.* 2007;29:9-25.
80. Michalopoulos A, Fotakis D, Vartzili S, et al. Aerosolized colistin as adjunctive treatment of ventilator-associated pneumonia due to multidrug-resistant gram-negative bacteria: a prospective study. *Respir Med.* 2008;102:407-12.
81. Falagas M, Kasiakou S. Toxicity of polymyxins: a systematic review of the evidence from old and recent studies. *Critical Care.* 2006;10:R27.
82. Noskin Gary A. Tigecycline: a new glycylicline for treatment of serious infections. *Clin Infect Dis.* 2005;41:S303-S14.
83. Gordon NC, Wareham DW. A review of clinical and microbiological outcomes following treatment of infections involving multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* with tigecycline. *J Antimicrob Chemother.* 2009;63:775-80.
84. Karageorgopoulos DE, Kelesidis T, Kelesidis I, Falagas ME. Tigecycline for the treatment of multidrug-resistant (including carbapenem-resistant) *Acinetobacter* infections: a review of the scientific evidence. *J Antimicrob Chemother.* 2008;62:45-55.
85. Peleg AY, Potoski BA, Rea R, et al. *Acinetobacter baumannii* bloodstream infection while receiving tigecycline: a cautionary report. *J Antimicrob Chemother.* 2007;59:128-31.
86. Peleg AY, Adams J, Paterson DL. Tigecycline efflux as a mechanism for nonsusceptibility in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007;51:2065-9.
87. Daly MW, Riddle DJ, Ledebor NA, Dunne WM, Ritchie DJ. Tigecycline for treatment of pneumonia and empyema caused by carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Pharmacother.* 2007;27:1052-7.
88. Anthony KB, Fishman NO, Linkin DR, Gasink LB, Edelstein PH, Lautenbach E. Clinical and microbiological outcomes of serious infections with multidrug-resistant gram-negative organisms treated with tigecycline. *Clin Infect Dis.* 2008;46:567-70.
89. Munoz-Price LS, Lolans K, Quinn JP. Four cases of invasive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infections treated with tigecycline. *Scand J Infect Dis.* 2006;38:1081-4.
90. Cunha BA, McDermott B, Nausheen S. Single daily high-dose tigecycline therapy of a multidrug-resistant (MDR) *Klebsiella pneumoniae* and *Enterobacter aerogenes* nosocomial urinary tract infection. *J Chemother.* 2007;19:753-4.
91. Schafer JJ, Mangino JE. Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* osteomyelitis from Iraq. *Emerg Infect Dis.* 2008;14:512-4.
92. EUCAST Technical note on tigecycline. *Clin Microb Infect.* 2006;12:1147-9.
93. Karabinis A, Paramythiotou E, Mylona-Petropoulou D, et al. Colistin for *Klebsiella pneumoniae*-associated sepsis. *Clin Infect Dis.* 2004;38:e7-9.
94. Elemam A, Rahimian J, Mandell W. Infection with panresistant *Klebsiella pneumoniae*: A report of 2 cases and a brief review of the literature. *Clin Infect Dis.* 2009;49:271-4.
95. Falagas ME, Bliziotis IA, Kasiakou SK, Samonis G, Athanassopoulou P, Michalopoulos A. Outcome of infections due to pandrug-resistant (PDR) gram-negative bacteria. *BMC Infect Dis.* 2005;5:24.
96. Matthew EF, Petros IR, Dimitrios KM, Simona V, Dimitra N, Argyris M. Pandrug-resistant *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* infections: Characteristics and outcome in a series of 28 patients. *Int J of Antimicrob Agents.* 2008;32:450-4.
97. Endimiani A, Choudhary Y, Bonomo RA. In vitro activity of NXL104 in combination with {beta}-lactams against *Klebsiella pneumoniae* isolates producing KPC carbapenemases. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53:3599-601.
98. Livermore DM, Mushtaq S, Warner M, Miossec C, Woodford N. NXL104 combinations versus Enterobacteriaceae with CTX-M extended-spectrum beta-lactamases and carbapenemases. *J Antimicrob Chemother.* 2008;62:1053-6.
99. Stachyra T, Levasseur P, Pechereau M-C, et al. In vitro activity of the beta-lactamase inhibitor NXL104 against KPC-2 carbapenemase and Enterobacteriaceae expressing KPC carbapenemases. *J Antimicrob Chemother.* 2009;64:326-9.

## Bijsluiter Ecalta

# How pathogenic are viruses? Still problems with fulfilling Koch's postulates

C.R. Madeley

## Introduction

Viruses have been identified and recognised as pathogens for over a hundred years, although formal proof that they cause disease and fulfil Koch's Postulates has been difficult to obtain. Increasingly sensitive molecular techniques have now been developed for diagnosis, and they are being used to detect a rapidly growing list of new, or at least hitherto unrecognised, viruses. They also detect known viruses for longer and this makes it necessary to re-examine the criteria for confirming that all viruses are truly pathogenic, and when. This paper discusses the role of viruses in disease, especially human disease, and the methods used to identify them. A shorter version has already been published.<sup>1</sup>

**Key words:** viruses, virus diagnosis, causation of viral disease

## The nature of viruses

Viruses consist of a nucleic acid, either DNA or RNA, single or double-stranded, one piece or several, wrapped in one or more layers consisting of protein, glycoprotein or lipid, or all three. They lack any internal metabolism and have to invade (and generally take over) living and metabolising host cells to make more virus. They show considerable limitation in which host species and even which cells in particular hosts they can invade. Often the presence or absence of specific structures on the cell's surface, which act as virus receptors, will determine whether infection takes place. Some viruses, however, do not require such specific receptors and others will cross species barriers if the appropriate receptors are available in the alternate host.

Viral take-over of host cells usually causes their death and it is release of cell contents that leads to many of the symptoms felt by the host. In most cases, though, the host's defence mechanisms will eventually overcome the invading virus within a few days and thereafter virus can no longer be detected by the routine diagnostic techniques used hitherto. This is not true for all viruses, however, and some persist in the body either as a chronic infection

(such as hepatitis B or C, or HIV) or in latent form with periodic reappearances (members of the herpes family). In the absence of evidence to the contrary, it has been assumed that other viruses are eliminated totally though the newer and highly sensitive molecular techniques may show this to be too simple a view. There have been hints that some enteroviruses may persist in the body and play a role in, for example, diabetes but how such viral RNA can remain intact within cells has yet to be explained. Normally, intracellular RNA is degraded once it has been used as messenger RNA.

Compared with bacteria, no virus been shown to contribute anything to the host's benefit other than the theoretical one that interferon induced by one virus might prevent superinfection with another. Equally, no commensal (i.e. neutral) role has been noted. However, absence of positive benefit is not by itself evidence of significant damage; minimal viral infection may not do enough damage to be registered in the host as disease. In a more susceptible host, the same infecting dose may do more damage.

Those elements that limit the spread of the infection include running out of susceptible cells (host limitation), action by host defences or a combination of these. The part played by the host in containing infection is both complex and, so far, poorly understood. The extent to which individuals vary in their susceptibility to a viral onslaught is also a combination of innate susceptibility and modifications of the response from past infections by the same or similar viruses inducing components of specific immunity. Nevertheless, deeper investigation using sensitive methods to detect fragments of viral nucleic acids may reveal their continuing presence at a low level without observable continuing damage. If so, any positive results will require more subtle evaluation than have been applied so far.

Correspondentieadres: C.R. Madeley, Stocksfield, Northumberland, NE43 7TN, United Kingdom, e-mail: dickmadeley@aol.com.

## Proof of causation and Koch's Postulates

What, then, can we accept as proof that a virus has been the cause of the disease? The traditional criteria are those postulated by Robert Koch in 1890<sup>2</sup> and shown in *table 1*. They were developed in the context of bacterial infections where culture of the organism was generally straightforward and there were suitable animal models in which to reproduce the disease. The ink was hardly dry on the page before Koch himself recognised that there could be, for example, typhoid carriers who excreted large numbers of fully virulent bacilli (as shown by transmission to other susceptibles who did become ill) while remaining healthy themselves. The example of 'Typhoid Mary' is well known; outbreaks of typhoid followed her movements about the USA.<sup>3</sup>

Table 1. Koch's postulates<sup>1</sup>

- |   |
|---|
| 1. The organism should be found in all cases of the disease with a distribution in the body corresponding to the lesions.   |
| 2. The organism should be capable of cultivation outside the body for several generations.                                  |
| 3. The organism, when then reintroduced into another susceptible host or experimental animal, should reproduce the disease. |

For viruses, the limitations of the Postulates were soon recognised: some cannot be cultivated in cell or other cultures and there are ethical prohibitions on administering (probably) fully virulent virus to other individuals or animals to fulfil Koch's third postulate. Moreover infecting experimental animals could not be equated with infecting humans, even if they were willing to volunteer. In 1937 Tom Rivers<sup>4</sup> proposed an addition to Koch's Postulates for viruses and suggested that the appearance of antibody following infection helped to indicate causation. In reality, though, this does not help much; antibody may be induced by, for example, a killed vaccine where no virus multiplication (and therefore no cellular invasion) has occurred. Similarly, other inert antigens can provoke 'immunity', either as toxoid vaccines or as allergens. If evidence of infection and/or disease following challenge with live virus is required for proof, then this criterion has not been strictly fulfilled for *any* virus. The closest that anyone has come to proof has been the work of Tyrrell and his colleagues at the Common Cold Research Unit at Porton Down, England, in the 1960s.<sup>5</sup> Even then, not all those into whom live virus was instilled intranasally developed colds, and it is inconceivable that more virulent viruses such as smallpox, rabies, HIV and hepatitis B or C could be given to volunteers. Even the use of more mild viruses such as adenoviruses, parainfluenza viruses, or mumps would not now pass an ethical committee's scrutiny. If Koch's Postulates cannot be fulfilled, then we are forced back onto the concept of 'weight of evidence' – the cumulative evidence from diagnostic techniques and epide-

miology that presence of virus X is strongly associated with disease Y and that disease Y is absent when no virus X has been detected. Hitherto, generally accepted evidence for a causative role on many of the common and some of the less common viruses has accumulated this way, but the recent development of increasingly sensitive diagnostic techniques again raises questions of causation when smaller and smaller quantities of often very small 'bits' of virus are detected. To explore this problem further, it is necessary first to outline those techniques of virus detection used in diagnostic laboratories that have provided this 'weight of evidence' up till now and review what aspects of the virus they detected and the significance of finding them.

## Conventional diagnostic methods

*Table 2* outlines the methods that have been the mainstream of virus diagnosis in the past thirty years, together with the advantages and disadvantages of each. It should be noted that each method detects a different aspect (component) of the virus, but only cell culture shows that infectious virus was present. Even then, it only demonstrates with certainty that the virus present was capable of replicating in the cell system used. Electron microscopy (EM) shows the presence of virus particles (or identifiable virus components such as nucleoprotein helices) but does not confirm that they are infective; some virus proteins will self-assemble into recognisable 'virions' even in the absence of viral nucleic acids – such as the virus-like particles (VLPs) used in papilloma vaccines.<sup>6</sup> Antigen-detecting techniques such as immunofluorescence (IF) and enzyme immunoassays (EIA) only record the presence of sub-viral components, but not complete virus, although IF can show the presence of 'viral factories' within exfoliated cells. IF is, incidentally, the only method that can also confirm that the specimen provided is adequate; no cells present equals an inadequate specimen.

Enzyme immunoassays have the advantage that they can be automated and run on a machine, with the results read automatically without the need for the individual skill and experience that are required to prepare, and assess the results of, cell-culture, EM and IF. EIAs are also available as commercial kits which can be used to promote standardisation between laboratories. In contrast, both EM and, to a lesser extent, cell-culture, are catch-all methods which do not require reagents prepared and validated beforehand. This makes them necessary components in a search for 'new' viruses (Molecular methods can be used in a scattergun approach with random primers, but this is a method yet to become available to routine diagnostic laboratories). Molecular methods – the amplification of short pieces of viral nucleic acids by methods such as the polymerase chain reaction (PCR), with or without prior reverse transcription, or NASBA – are currently developing apace. They can be refined to high sensitivity and therefore used

Table 2. Traditional methods of diagnosis

METHOD	PRINCIPLE OF THE TEST	ADVANTAGES	DISADVANTAGES	COMMENTS
Cell culture	Growth of live virus in cultured cells in vitro	1. Indicates that there is complete virus present 2. Not over-sensitive	1. Slow (2 days to 3 weeks +) 2. Labour-intensive 3. Requires skill and experience – both to prepare cells and read any cytopathic effect (CPE)	Sensitivity may be enhanced by co-cultivation with suitable cells, but leaves uncertainty whether there was complete virus in the original specimen
Immunofluorescence (IF)	Fluorochrome-tagged antisera used to detect viral antigens in cells from specimen	1. Quick (1-3 hrs) 2. Semi-quantitative 3. Provides feed-back on specimen quality 4. Sensitivity right for purpose	1. Requires specific antisera, ruthlessly assessed 2. Requires skill and experience to 'read' 3. Requires darkened 'reading room' 4. Requires fluorescence microscope	Provides best assessment of specimen quality – this cannot be assumed with respiratory specimens
Enzyme immunoassays (EIA)	Similar to IF, but using an enzyme as a tag and usually done in micro-titre plates	1. Quick (2-3 hrs) 2. Can be read by machine 3. Suitable for large numbers 4. No special skills needed 5. Commercial kits/machines available	1. Requires specific antisera, ruthlessly assessed 2. No feed-back on specimen quality 3. Problems over false positives and borderline results 4. Sensitivity uncertain	Machine-based tests are relatively expensive on small specimen numbers
Electron microscopy (EM)	Uses high-resolution to visualise virus particles (or, in some cases, identifiable virus components) directly in specimen	1. Very quick (15 min to 3 hrs) 2. Specific 3. Can detect mixed infections easily 4. Catch-all method – suitable for 'unknowns'	1. Requires expensive machine 2. Requires trained microscopist who is also in practice 3. Requires separate microscope room 4. Insensitive	1. EM may be shared with other departments 2. Sensitivity difficult to define
Serology	Detection of an antibody response to the virus	1. Can be automated and read by machine 2. Presence of IgM class antibody indicates recent stimulus	1. The test can be quick, but patient's response takes up to 10 days to develop 2. Presence of antibody does not indicate site of infection 3. All results require interpretation	
Molecular amplification methods (PCR, RT-PCR, NASBA, etc)	Amplification of viral nucleic acid to assessable levels (nature & quantity)	1. Highly sensitive 2. Can be 'same-day' 3. In multiplex form, can detect mixed infections 4. Can be automated for larger numbers	1. May be over-sensitive 2. No indication of specimen quality 3. Expensive 4. Requires good technique to avoid cross-contamination	

Reprinted, with permission from J Clin Virol. (reference 1)

to detect small copy numbers of either DNA or RNA viral genomes. Molecular amplification techniques also have the advantage that multiplex versions can be configured to look for several viruses simultaneously. In theory, they can also be used to type the virus found using type-

specific probes to hybridise with the amplified nucleic acid recovered from the specimen. This latter application has yet to be developed for routine use; indeed, these molecular techniques are in general very much in development and still lie on the borderline between research and routine.

Finally, serology, as mentioned already, confirms only that an antigenic stimulus has been registered by the patient's immune systems. Sequential samples or the presence of IgM-class antibody will help to define when the stimulus occurred and relate the infection to the disease, provided the necessary specimens have been taken at the right time. Serology, using various methods including the well-tried complement fixation test and, latterly, enzyme immunoassays, has been widely used in diagnostic laboratories. Ambiguity over their exact significance has meant that serological results have always required interpretation before release.

#### Reagents

Initially, diagnostic laboratories made their own reagents to find and identify infecting viruses. However, interest by commercial companies and stimulated by the development of monoclonal antibodies has transformed this. Numerous high quality commercially-produced reagents are now widely available, either individually or as part of kits, although no reagent should be presumed fit-for-purpose without rigorous assessment by the user and on genuine clinical specimens. Few laboratories now make their own reagents, other than some primers for PCR, but, whatever the source, reagents must be assessed before use.

Typing sera (for use in neutralization and other tests) were formerly made by national reference laboratories but their cost has meant that fewer and fewer are available, a decline accelerated by a general reluctance to pay for surveillance activities, their main *raison-d'être*. Where clinicians hold the purse-strings, typing is seen as an unaffordable luxury with central governments having other priorities.

#### Viruses as pathogens

The arrival of the very sensitive molecular techniques of diagnosis obliges us to think again about viruses as invaders, and potential damagers, of higher organisms. Here, it is useful to introduce two concepts that may help to put them into perspective:

a. **Threshold of Damage (ToD).** Since large numbers of virus particles, no different in appearance from those seen in the stools of ill children, have been seen in babies who are apparently well<sup>7,8</sup>, the mere presence of a virus cannot confirm that significant damage has been done to the host. There would seem to be threshold in an individual which, when crossed, results in the appearance of disease. This ToD will vary between individuals, in one individual from time to time and also with the individual's age. At present we have no means of recognising or measuring it, but it can be partially defined as the amount of damage necessary for the host to be affected. Seen another way, below this threshold, no illness is apparent and 'Infection ≠ Affection'; above it 'Infection = Affection'.

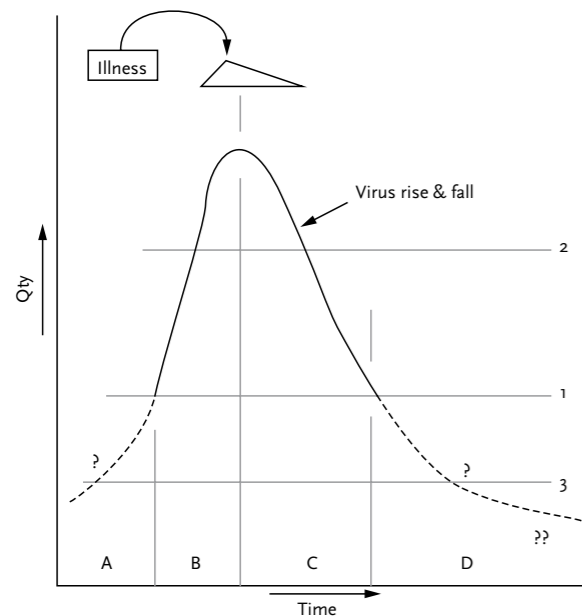
b. **Efficiency of Replication (EoR).** This is, roughly, the amount of virus produced by one host cell and can vary enormously between viruses. Those that lyse the cell, such as poxviruses or adenoviruses, have a high EoR, those that bud from the surface probably have a lower EoR. This, again, is a useful concept but difficult to define exactly or to put a figure on. This is partly because the amount of virus observed depends on the (unidentified) number of cells infected, and partly because it probably varies between individuals. Nevertheless, given that viruses are inert in transit, a high EoR will help transmission to a new host, especially if many cells are infected

These concepts allow us both to consider what a very sensitive diagnostic test may uncover but also to bring into prominence the role of the host. In virus diagnosis, it has always been a requirement that positive results are interpreted. It is necessary to ask: 'What is that virus doing?' 'Is it the (sole) cause of the patient's signs and symptoms?' – a particularly important question in immunocompromised patients. The combination of a high EoR and a high ToD may result in a high level of detectable virus but no apparent disease, while even a low EoR may cause disease with a low ToD. And there will be many combinations between, but this concept may be useful in trying to understand what is happening inside the patient – an assessment not routinely made in diagnosis.

Let us now consider how new very sensitive diagnostic techniques impinge on diagnostic virology generally. *Figure 1* (modified from reference 1) shows the theoretical profile of a typical virus infection. It has four phases (A-D): A is the incubation period when the amount of virus present is undetectable (as far as we know, who looks intentionally?) and the individual is well; B is the phase in which virus replication reaches a maximum and illness develops; C is the recovery phase in which there is rapid disappearance of detectable virus and D is the convalescent phase when virus is no longer detectable by currently routine methods. This is an over-simplification of what is a complex series of events but is helpful in making the points that follow.

The horizontal line 1 represents the current level of detectability where the peak of virus presence is tied reasonably closely with the period of illness, though experience still shows that some ambiguity remains. Reducing the sensitivity of the tests used lifts the level of detectability to, say, line 2. This ties the peak virus more closely to the peak of illness but demands a better specimen. With samples of blood/serum, urine and CSF, this is not a problem; quality is standard and quantity can be controlled. With respiratory specimens and, to a lesser extent, faeces, the quality of the specimen is dependent on the skill and determination of the specimen-taker as well as the amount produced by the patient.

Figure 1. Diagram to represent the course of a typical virus infection



Main graph shows the rise and fall of virus levels during the infection. Four phases of the infection are labelled A – D: A. Incubation period, B. Onset of disease (virus readily detectable), C. Recovery (virus rapidly becoming undetectable by traditional methods), D. Convalescence (? virus detectable by amplification methods). Modified from ref. 1.

In contrast, the highly sensitive molecular amplification techniques may overcome the variability of the specimen and allow a positive diagnosis to be made on an otherwise poor specimen. In effect this is pushing the level of detectability down towards line 3 or even below it, and may give a positive result regardless of ToD or EoR. Such a positive result, though desirable in the sense of reducing the pressure to take a good specimen, raises other questions. By broadening the base of the curve, it makes the period of positivity longer and ties the period of illness less closely to the peak of positivity. Moreover, it may extend the positive period far into the convalescent period D. Current virological dogma is that viruses do not persist after the acute disease, but this is now being challenged. Apart from members of the herpesvirus family, well-known to persist and recur, other viruses may linger in trace amounts, and for some time. There have been numerous attempts to link chronic conditions, such as diabetes and the chronic fatigue syndrome, to virus persistence, even though it has been difficult to demonstrate how an RNA virus without reverse transcriptase can persist in the body. The exception, of course, is hepatitis C but there is much we still do not know about this virus. Sensitive molecular methods may help to provide answers to these speculations

but at present we do not know how long the convalescent 'tail' in uncomplicated infections with complete recovery may be. Further work is necessary to define the borderline between straightforward uncomplicated infection and virus persistence, which will in turn help to clarify the mechanisms of persistence.

Two consequences of these thoughts emerge. Firstly, we need to understand the profile of an uncomplicated virus infection as drawn by, say, sequential quantitative PCR estimations (with or without prior reverse transcription) tweaked to its highest sensitivity. Secondly, comparing such profiles between individuals may bring into greater prominence the role of the host in virus/host interactions and his/her variability, as well as showing the relevance of ToD and EoR. This is an aspect of clinical virology that has been largely neglected hitherto but should be explored farther.

Virus diagnosis needs to move into a new phase in which the complex interaction between pathogen and host is understood much more completely. New (or, perhaps, novel) viruses are frequently being uncovered using the new molecular methods. Some are not yet regarded as pathogenic so far, but their role needs to be examined and assessed, but using which criteria? How long should we wait for sufficient 'weight of evidence'? Funding bodies will need to underwrite longitudinal studies on at least some common viruses and on those viruses not so far linked to the sort of chronic infections induced by the hepatitis viruses and HIV. Molecular methods challenge virologists to develop a more subtle understanding of what viruses are and what they do.

#### References

1. Madeley CR. 'Is it the cause?' Robert Koch and viruses in the 21<sup>st</sup> Century. *J Clin Virol.* 2008;43:9-12.
2. Koch R. Ueber bakteriologische Forschungen. *Verhandlung des X Internationalen Kongresses, Berlin 1890*;1:35.
3. Soper GA. The work of a chronic typhoid germ distributor. *J Amer Med Assoc.* 1907;48:2019-22.
4. Rivers TM. Viruses and Koch's postulates. *J Bacteriol.* 1937;33:1-12.
5. Tyrrell DAJ, Bynoe ML, Birkum Petersen K, Sutton RNP, Pereira MS. Inoculation of human volunteers with parainfluenza viruses types 1 and 3 (HA 2 and HA 1). *Brit Med J.* 1959;ii:909-11.
6. Schiller J, Lowy D. Human papillomavirus vaccines for cervical cancer prevention. In: Plotkin SA, Orenstein WA, eds. *Vaccines*, 4e. Philadelphia: Sanders 2003;1259-65.
7. Scott TM, Madeley CR, Cosgrove BP, Stansfield JP. Stool viruses in babies in Glasgow. *3 Community Studies.* *J Hyg Camb.* 1979;83:455-69.
8. Gladstone BP, Iturriza-Gomara M, Ramani S, Monica B, Banerjee I, Brown DW, et al. Polymerase chain reaction in the detection of an 'outbreak' of asymptomatic viral infections in a community birth cohort in South India. *Epidemiol Infect.* 2008;136:399-405.

## Samenvattingen van de lezingen tijdens de Najaarsvergadering NVMM/VIZ

Op dinsdag 24 november 2009 vond in Conferentiecentrum Woudschouten te Zeist de gecombineerde NVMM/VIZ-Najaarsvergadering 2009 plaats. Het thema van dit jaar was 'Staphylococcus aureus: queen of pathogens'. Na een plenaire sessie in de ochtend over deze queen of pathogens was er in de middag ruimte voor korte presentaties waarvan de onderwerpen sterk uiteenliepen en waarvan u hieronder de samenvattingen aantreft.

#### How fast are fast using molecular detection techniques for MRSA re-admission screening in an acute care hospital?

K. Floré<sup>1</sup>, A.M. van den Abeele<sup>1</sup>, G. Verschraegen<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Microbiology, AZ Sint Lucas Ghent, Belgium,

<sup>2</sup>Department of Hospital Hygiene, University Hospital Ghent, Belgium

Molecular assays for MRSA screening have been proposed, with significant reduction of sample processing time. We set up a time analysis model to investigate the time gain after introducing molecular assays. During a 7-month period in 2009 all known MRSA positive patients who were readmitted to the hospital (n=68) were included. Nose, throat, perineum and wounds were sampled, using Eswab® (Copan). MRSA screening was performed either with BD GeneOhm™ MRSA (BD Diagnostics), or with GeneXpert® System (Cepheid). During the control period MRSA detection was culture-based after overnight enrichment. The overall process was registered using time loggings in electronic patient record, lab information system and infection control electronic records. The time from admission of the patient until the sample arrival and labelling in the laboratory (A) took on average 16.6 hours (h) (median: 15.4h). Once the sample was registered, time necessary to start sample processing (B), was on average 2.5h (median: 0.9h). The last time frame (C), is the moment the sample processing started until the time the results were registered in the LIS (C) (average: 2.5h, median: 1.6h). When comparing these results with the control period (average: 54.9h; median: 47.4h), we found a substantial reduction of the analytical processing time.

Introduction of PCR techniques for MRSA detection shortens the analytical process substantially. A fast test result for the re-admission screenings could save a substantial number of unnecessary isolation days, resulting in an economic benefit for the hospital. Despite the high costs, PCR techniques might be beneficial in a selected subpopulation.

#### Waarde van de Binax Now antigeentest voor de detectie van Nieuwe Influenza H1N1

B.M.W. Diederén, D. Veenendaal, R. Jansen, B.H. Herpers, E.E.J. Ligtvoet, E.P.F. IJzerman

Streeklaboratorium voor de Volksgezondheid Kennemerland, Haarlem

Gezien het belang van een juiste diagnose van de Nieuwe Influenza A (H1N1) is het vanzelfsprekend belangrijk betrouwbare diagnostiek te kunnen aanbieden. Het wordt geadviseerd om bij een verdenking H1N1 de PCR op Nieuwe Influenza A (H1N1) te verrichten. Wat de precieze waarde is van antigeentesten is niet helemaal duidelijk.

De gevoeligheid lijkt laag (10-70%), maar de gemelde specificiteit hoog (99%). Nederlandse data ontbreken echter. In het Streeklaboratorium Haarlem hebben we in juli en augustus de Binax Now antigeentest gebruikt (Binax NOW; Binax) naast de routine diagnostiek voor Influenza A, te weten de Respifinder (multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) technologie), en indien positief voor influenza A, confirmatie met een H1N1 PCR. Positieve antigeentest resultaten werden doorgegeven aan de aanvragend arts. Negatieve antigeentesten werden niet aan de inzenders gemeld, en de PCR resultaten afgewacht. Van in totaal 135 patiënten werd zowel een MLPA als een antigeentest uitgevoerd. In totaal testten 38 (28%) patiënten positief voor Nieuwe Influenza A (H1N1). De gevoeligheid van de Binax NOW test was bedroevend: 47% (18/38). De specificiteit van deze test was echter ook niet optimaal: 5 patiënten met een positieve sneltest waren negatief in de MLPA en H1N1 specifieke PCR (specificiteit 95%; 92/97). Gezien het belang van een

correcte, betrouwbare diagnose lijkt het onverstandig om op de Binax antigeentest te vertrouwen, ook in het geval van positieve resultaten.

Bovengenoemde data zijn op 19 augustus in een RIVM LabInf@ct beschreven.

#### Acute Q-fever-related mortality in the Netherlands

L.M. Kampschreur<sup>1</sup>, M.C.A. Wegdam-Blans<sup>2</sup>, S.F.T. Thijssen<sup>3</sup>, C.A.R. Groot<sup>4</sup>, P.M. Schneeberger<sup>5</sup>, W.L. van Eede<sup>6</sup>, F.S. Stals<sup>7</sup>, A.A.M.J. Hollander<sup>8</sup>, J.H.E.M. Schijen<sup>9</sup>, N.L.A. Arents<sup>2</sup>, P.C. Wever<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Dept. of Internal Medicine, Radboud University Nijmegen Medical Center, Nijmegen, <sup>2</sup>Regional Laboratory for Medical Microbiology, St. PAMM, Veldhoven, <sup>3</sup>Dept. of Microbiology, Diaconessenhuis Utrecht, Utrecht, <sup>4</sup>Dept. of Pulmonology, Bernhoven Hospital, Oss, <sup>5</sup>Department of Medical Microbiology and Infection Control, Jeroen Bosch Ziekenhuis, 's-Hertogenbosch, <sup>6</sup>Dept. of Intensive Care Medicine, Diaconessenhuis Utrecht, Utrecht, <sup>7</sup>Atrium Medisch Centrum Parkstad, Heerlen, <sup>8</sup>Department of Internal Medicine, Jeroen Bosch Ziekenhuis, 's-Hertogenbosch, <sup>9</sup>St. Elisabeth Hospital, Tilburg

A large outbreak of Q-fever with over 3300 cases since 2007 has been reported in the Netherlands. Available data indicate that approximately 700 patients have been hospitalized with acute Q-fever. Reported mortality rates in hospitalized patients with acute Q-fever range from 0.9 to 2.4%. **Here**, we analyzed mortality among hospitalized patients with acute Q-fever. Death resulting from chronic Q-fever was not evaluated. Clinicians and microbiologists from hospitals in the afflicted region were asked to provide details about patients who had died after diagnosis of acute Q-fever. Eight patients (7 males, 1 female) from 6 hospitals were identified who died in approximately one month following hospitalization with acute Q-fever. Diagnosis was made by PCR only (4x), serology only (2x) or both (2x). Six patients presented with infiltrative changes on the X-thorax and a median CURB-65 score of 3 (range 1-3). Median age at time of death was 76 years (range 55-86). Median time of hospitalization was 13 days (range 1-33). All patients had serious, often coinciding, underlying conditions including chronic cardiovascular disease (6x), chronic lung disease (5x), diabetes mellitus (3x) or malignancy (2x). Thus, we found a mortality rate around 1% among patients hospitalized with acute Q-fever in the Netherlands. All patients had serious underlying conditions. It cannot be excluded that death to acute Q-fever is underreported for instance because in many hospitals PCR for Q-fever was not introduced until 2009. This is illustrated by the fact that in one case PCR analysis allowed for diagnosis four months postmortem.

#### The role of complement binding assays in the diagnosis of acute Q fever: is PCR always necessary?

M.C.A. Wegdam-Blans, C.M. Verduin, M.W.H. Wulf, H.T. Tjhie

Laboratorium voor Medische Microbiologie, PAMM, Veldhoven

In the adherence area of the PAMM laboratory (732.000 people in the South-East of the Netherlands) Q fever is highly endemic, with 369 patients diagnosed between January and September 2009. To address the amount of requests we created a diagnostic semi automatic pathway with a fourfold titer rise in CFT as a golden standard.

Sera were screened using the EIA-phase II IgM (Virion\Serion) on the DSX (Virion\Serion). IgM confirmation was followed by immunofluorescence (Virion\Serion) at a single dilution of 1:32. CFT (Siemens) which was performed with a serial dilution on both the first as well on a second serum sample if available. Positive IgM results were interpreted as possible serological evidence for acute Q fever infection and were reported as such to the clinician. A second serum sample was requested to confirm the diagnosis by paired CFT.

Until September 2009, 3531 samples were tested for acute Q fever. 369 (10%) patients tested positive for IgM. A second serum sample was drawn in 195 patients. In 187 patients (96%) a fourfold increase in CFT titer was recorded. In eight patients titers were not found in both sera or there was no fourfold rise. The clinical presentation in these patients however was highly suspicious for acute Q fever.

We conclude that a positive IgM with a positive CFT has a good predictive value for a acute Q-fever infections but ideally this is confirmed by a second sample to show an increase in CFT. In our laboratory where PCR is not performed the diagnostic route with IgM and CFT is as useful in the diagnosis of acute Q fever.

#### Genotype specific PCR for norovirus reveals GgII.4 strains circulating in the 2008/2009 winter outbreaks in Amsterdam, the Netherlands

S.M. Bruisten<sup>1,2</sup>, S.J. Hubbard<sup>1</sup>, S. Salamat<sup>1</sup>, N. Nassir<sup>1</sup>, R.C. Brunst<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Public Health Laboratory (PHL), Department of Infectious Diseases, Amsterdam, <sup>2</sup>Academic Medical Center, Laboratory of Experimental virology, University of Amsterdam, Amsterdam

Gastroenteritis caused by norovirus (NV) is well recognised nowadays. In the PHL in Amsterdam a nested PCR targeting the *orf1/pol* region was available since 2001. This PCR does not discriminate different genotypes, however Genogroups (Gg) II and IV can be readily detected, but not GgI. We developed a duplex

real-time PCR specific for Gg I and GgII targeting the *orf2/caps* region. In winter 2008/2009 we collected 300 stool samples and tested them for norovirus by nested PCR. Patients were associated with outbreaks of gastroenteritis (n=41) in elderly homes, hospitals, day-care centres but we included also sporadic cases (n=35). All samples were subsequently tested by the real time duplex PCR. Discordant samples were retested by Genogroup specific (either GgI or GgII) real time PCR to determine an 'end result'. A representative sample of PCR products was sequenced for genotyping and phylogeny.

By nested PCR 166/300 (55.3%) samples were positive. The real-time duplex PCR scored 171/300 (57.0%) positive, with 164/171 GgII and 15 GgI samples. However, 8/15 samples seemed to have a GgI+GgII double infection. Discrepancy analysis of 55 samples showed that none of the 15 GgI samples could be confirmed and the 8 'double' positive infections were GgII positive. The sensitivity and the NPV were 100%, the specificity was 93% and the PPV 94% for the real time duplex PCR. Sequencing analysis revealed two discriminate GgII.4 strains. We conclude that in the winter 2008/2009 season no norovirus outbreaks were missed by using the nested PCR.

These data were also presented at the Annual ESCV Meeting, 27-30 September 2009, Istanbul

#### The role of immune evasion in bacterial pathophysiology: *in vivo* evidence

A.N. Spaan, K.P.M. van Kessel, C.J.C. de Haas, J.A.G. van Strijp  
Medical Microbiology, University Medical Center Utrecht, Utrecht

Recently, novel molecules have been identified that are secreted by bacteria and inhibit various crucial parts of our innate immune system. The Formyl Peptide Receptor Like-1 Inhibitory Protein (FLIPr) secreted by *S.aureus* was shown to inhibit the human FPRL1 and FcγR *in vitro*. FPRL1 is a receptor involved in cell migration and Fcγ Receptors are involved in phagocytosis. The aim of this study is to investigate the role of FLIPr *in vivo* in an animal model for infection.

Mice were injected intraperitoneally with a *S.aureus* wild type or FLIPr knock out strain. After sacrificing, peritoneal lavage fluid was collected in which the number of neutrophils and macrophages was determined by flowcytometry. The level of expression of FcγR on leukocytes in both PLF and plasma was measured using flowcytometry.

Intraperitoneal injection with the bacterial knock out strain led to a doubled influx of neutrophils and a fourfold diminished influx of macrophages compared to wild type

(P<0.01). FcγR expression on infiltrating and peripheral blood neutrophils decreased with 25% in knock out treated mice compared to wild type (P<0.01).

Observed effects on cell migration are probably due to an effect on the murine ortholog of the human FPRL1. To further investigate this, a murine inflammation model is being set up. In order to elucidate the effect of FLIPr on the murine FcγR, an alternative infection model will be set up. Additionally, other excreted immune inhibitory molecules of *S.aureus* will be tested *in vivo*.

#### Residual HIV-1 activity of raltegravir despite multiple N155H pathway resistance mutations

A. Fun<sup>1</sup>, N.M. van Maarseveen<sup>1</sup>, K. van Baelen<sup>3</sup>, S.F. van Lelyveld<sup>2</sup>, P.J. Schipper<sup>1</sup>, L.J. Stuyver<sup>3</sup>, A.M.J. Wensing<sup>1</sup>, M. Nijhuis<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Medical Microbiology, University Medical Center Utrecht, <sup>2</sup>Department of Internal Medicine & Infectious Diseases, University Medical Center Utrecht, <sup>3</sup>Virco BVBA, Mechelen, Belgium

The genetic barrier towards development of raltegravir resistance by HIV-1 is considered to be low, requiring just one integrase mutation to confer raltegravir therapy failure. However, during continuous raltegravir treatment failure additional substitutions in the viral integrase are selected. We investigated the impact of these integrase mutations on resistance and viral replication capacity *in vitro* using a recombinant virus assay, in which patient-derived viral integrase genes were cloned in a reference strain (recombinant virus). Furthermore, *in vivo* fitness was investigated by performing an *in dept* clonal analysis of the viral integrase at baseline, during failure of raltegravir containing HAART, and after raltegravir was discontinued from the regimen. To determine *in vivo* fitness, the relative proportion of specific integrase mutations over time was monitored.

Here, raltegravir therapy failure was associated with selection of the primary resistance mutation N155H. This mutation conferred a 4-fold reduction of raltegravir susceptibility and a severe reduction in viral replication. Acquisition of integrase mutation Q95K increased resistance (7-fold) and partly restored viral replication. Selection of a third integrase mutation, V151I, further increased raltegravir resistance (20-fold), but decreased viral replication. After raltegravir interruption an increase in HIV RNA load of 0.8 log copies/ml was observed while clonal analysis revealed that all integrase substitutions remained present. This observation suggests residual activity of raltegravir in presence of multiple raltegravir resistance mutations. During prolonged raltegravir interruption, resistance mutations were lost which resulted in a further increase in HIV-1 RNA load.

### High prevalence of bevirimat resistance mutations in non-B subtypes and in protease inhibitor resistant HIV isolates

J. Verheyen<sup>1</sup>, N.M. van Maarseveen<sup>2</sup>, C. Verhofstede<sup>3</sup>, E. Knops<sup>1</sup>, L. Vandekerckhove<sup>3</sup>, A. Fun<sup>2</sup>, D. Brunen<sup>2</sup>, K. Dauwe<sup>2</sup>, A. Wensing<sup>2</sup>, H. Pfister<sup>1</sup>, R. Kaiser<sup>1</sup>, M. Nijhuis<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Institute of Virology, University of Cologne, Cologne, Germany, <sup>2</sup>Department of Medical Microbiology, University Medical Center Utrecht, Utrecht, <sup>3</sup>Aids Reference Laboratory, Ghent University, Ghent, Belgium

Bevirimat is the first drug in a new class of inhibitors that inhibits HIV-1 maturation by hampering the processing of the gag capsid/p2 precursor protein. Resistance mutations have been identified in vitro in the bevirimat target region. Furthermore, mutations associated with reduced bevirimat activity, have been observed as baseline polymorphism in several clinical isolates. The objective of this study was to assess the prevalence of bevirimat resistance mutations in isolates from treatment-naïve and protease inhibitor (PI) experienced patients.

Of 644 HIV isolates collected at 3 different sites in Europe, the bevirimat target region was sequenced. Isolates from treatment-naïve (B: n=270; non-B: n=167) and PI-experienced patients harbouring resistance mutations in the viral protease (B: n=166; non-B: n=41), were selected. In the 208 non-B isolates, 60% harboured at least one mutation associated with bevirimat resistance. No association between prevalence of bevirimat resistance mutations and PI treatment-experience was observed. Of the 270 treatment-naïve patients infected with HIV-1 subtype B, approximately 30% harboured HIV with at least one mutation associated with a reduced susceptibility to bevirimat. In the 166 isolates with genotypic PI-resistance from pre-treated individuals, bevirimat associated mutations were significantly more prevalent (45%). Furthermore, a significant association between the number of resistance mutations in the viral protease and the presence of bevirimat mutations was observed.

These data emphasize the importance of screening for gag mutations before administration of bevirimat. Reduced activity of the drug may be expected in patients infected with non-B isolates and in patients who have been exposed to protease inhibitors.

### Emergence of colistin resistance during use of selective decontamination of the digestive tract in an intensive care unit, masked by the use of inappropriate laboratory methods

T. Halaby<sup>1</sup>, P. van Hoorn<sup>2</sup>, J. Kluytmans<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Laboratory for Medical Microbiology, Enschede, <sup>2</sup>Department of Intensive Care Medicine, MST Hospital, Enschede, <sup>3</sup>Department of Medical Microbiology and Infection Control, VU University Medical Center, Amsterdam

**Background:** Selective decontamination of the digestive tract (SDD) is a preventive measure. It selectively eradicates

aerobic Gram-negative bacteria (AGNB) by the enteral administration of oral non-absorbable agents, i.e. colistin and tobramycin. Resistance to colistin among AGNB during SDD has rarely been reported. We retrospectively investigated the impact of SDD use on colistin resistance among ESBL-producing *K. pneumoniae* (ESBL-Kp) strains.

**Methods:** SDD (colistin, tobramycin and Amphotericin B) was applied between 2002 and 2007 as part of an infection control programme for the control of an ESBL-Kp outbreak in an intensive care unit (ICU). Biochemical tests and antimicrobial susceptibility testing were performed by using the API 20E system and the agar dilution method (CLSI) respectively. Colistin susceptibility was routinely tested by the disc diffusion method (col-d). A subset of the ESBL-Kp strains was retrospectively analyzed with Vitek-2 system for susceptibility testing (Vitek).

**Results:** 89 ESBL-Kp strains with known col-d results were traced. 4 (4,5%), all isolated after starting SDD, were colistin resistant. Of the 127 ESBL-Kp Vitek tested strains, 26 were isolated before SDD was started and all were colistin susceptible. However, of the remaining 101 isolated after starting SDD, 76 (75,2%) were colistin resistant. Of those tested by both methods, 76,2% susceptible or intermediate susceptible strains as tested in the col-d, were colistin resistant in the Vitek.

**Conclusions:** Colistin resistance among ESBL-Kp isolates emerged rapidly after the introduction of SDD. The routinely used disc diffusion method failed to detect colistin resistance, which was retrospectively investigated by the Vitek.

### Increase of resistance to tobramycin associated with the use of selective decontamination of the digestive tract in an intensive care unit

T. Halaby<sup>1</sup>, P. van Hoorn<sup>2</sup>, J. Kluytmans<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Laboratory for Medical Microbiology, Enschede, <sup>2</sup>Department of Intensive Care Medicine, MST Hospital, Enschede, <sup>3</sup>Department of Medical Microbiology and Infection Control, VU University Medical Center, Amsterdam

**Background:** An important feature of selective decontamination of the digestive tract (SDD) is the enteral administration of oral non-absorbable antimicrobial agents, i.e. colistin and tobramycin, to selectively eradicate aerobic Gram-negative bacteria (AGNB). Theoretically, this may select for tobramycin resistant AGNB. We retrospectively investigated the impact of SDD use on tobramycin resistance among AGNB.

**Methods:** SDD (colistin, tobramycin and amphotericin B) has been applied between October 2002 and April 2007 as part of an infection control programme to control an outbreak with ESBL-producing *K. pneumoniae* (ESBL-Kp), affecting 197 patients, in an intensive care unit (ICU). Biochemical tests and antimicrobial susceptibility testing

were routinely performed by using the API 20E system and the agar dilution method (CLSI) respectively.

**Results:** All 2572 *Morganella*, *Proteus* and *Serratia* spp., isolated between 2001 through 2007, were included. Tobramycin resistance was found sporadically before the introduction of SDD but increased immediately afterwards. Segmented regression analysis found a highly significant relation between the observed resistance to tobramycin and the introduction of SDD.

**Conclusion:** The introduction of SDD was associated with a strong increase of tobramycin resistance in AGNB.

### Carbapenemase producing *Klebsiella pneumoniae* have entered The Netherlands

J. Cohen Stuart<sup>1</sup>, G. Voets<sup>1</sup>, D. Versteeg<sup>3</sup>, J. Scharringa<sup>1</sup>, M.Tersmette<sup>3</sup>, E. Roelofsen<sup>4,5</sup>, A.C. Fluit<sup>1</sup>, M.A. Leverstein-van Hall<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Department of Medical Microbiology, University Medical Centre Utrecht, <sup>2</sup>Centre for Infectious Disease Control, National Institute for Public Health and the Environment (RIVM), Bilthoven, <sup>3</sup>Department of Medical Microbiology and Immunology, St Antonius Hospital, Nieuwegein, <sup>4</sup>Laboratorium voor Infectieziekten, Groningen, <sup>5</sup>Scheper Ziekenhuis, Emmen

Carbapenems are often used as a last resort for treating serious infections attributable to multidrug-resistant gram-negative bacilli. Carbapenemases are enzymes that confer resistance to carbapenems, cephalosporins and penicillins. Carbapenemase producing Enterobacteriaceae are emerging worldwide, but, until now, none have been reported in The Netherlands. In this study, it was determined whether the elevated carbapenem MICs of two *K. pneumoniae* isolates (KPN-1 and KPN-2) were due to carbapenemase production. Isolate KPN-1 was isolated from a patient recently travelling to India and KPN-2 from a patient transferred from a Greek hospital. KPN-1 showed decreased susceptibility to carbapenems (MIC ertapenem: 12mg/L (R), MIC meropenem: 2mg/L (S) and MIC imipenem 4 (S)) and was resistant to all other antibiotics except colistin and tigecyclin; the imipenem-EDTA synergy tests (disks and MBL Etest) and Hodge test were positive. By PCR and sequencing a New-Delhi metallo-carbapenemase (NDM) gene, a CTX-M-1 group ESBL gene, and two AmpC genes (CMY-6, DHA-1) were identified. KPN-2 showed decreased

susceptibility to carbapenems (MIC ertapenem > 32mg/L (R), MICs meropenem and imipenem 8 mg/L (I)) and was resistant to all other antibiotics except colistin, amikacin and tigecyclin; the imipenem-boronic synergy test and the Hodge test were positive; a KPC-2 carbapenemase gene and a SHV ESBL gene were identified.

These findings show that carbapenemase producing Enterobacteriaceae have entered The Netherlands. Because these isolates are resistant to virtually all commonly used antibiotics, control of their spread is crucial. Microbiologists should perform confirmatory tests for carbapenemase production in all Enterobacteriaceae with elevated carbapenem MICs.

### Endemic and epidemic *Acinetobacter* species in a university hospital, an eight years' survey

P.J. van den Broek<sup>1</sup>, T.J.K. van der Reijden<sup>1</sup>, E. van Strijen<sup>1</sup>, A.V. Helmig-Schurter<sup>1</sup>, A.T. Bernards<sup>2</sup>, L. Dijkshoorn<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>Departments of <sup>1</sup>Infectious Diseases and <sup>2</sup>Medical Microbiology, Center of Infectious Diseases, Leiden University Medical Centre, Leiden

The prevalence of the currently known *Acinetobacter* species and related trends of antimicrobial resistance were studied in the Leiden University Medical Center. Between 1999 and 2006 *Acinetobacter* isolates from clinical samples were collected prospectively. Isolates were analyzed by AFLP fingerprinting. For species identification a profile similarity cut-off level of 50% was used, for strain identification 90%. Susceptibility for antimicrobial agents was tested by disk diffusion following the CLSI guideline. The incidence of *Acinetobacter* ranged from 1.7 to 3.7 per 10,000 patients per year without a trend to increase during the study years. Twenty different species were distinguished. *A. baumannii* (27%) and *A. gen. sp. 3* (26%) were the most prevalent. Other species seen relatively frequent were *A. lwoffii* (11%), *A. ursingii* (4%), *A. johnsonii* (4%) and *A. junii* (3%). One large outbreak occurred involving 31 patients and 16 smaller clusters involving in total 39 patients with at most 5 patients in one cluster. Overall 37% of *A. baumannii* was fully susceptible to the tested antibiotics. There was a trend of decreasing susceptibility. *A. baumannii* was the *Acinetobacter* species causing the largest burden of multiple antibiotic resistance and transmissions in the hospital.



# Molecular detection of intestinal parasites for clinical diagnosis and epidemiology

## Inleiding

Op 1 oktober 2009 is de heer R.J. (Robert) ten Hove gepromoveerd aan de Rijksuniversiteit van Leiden. Hij heeft onderzoek gedaan op de afdeling Parasitologie van het Leids Universitair Medisch Centrum. Promotor was prof. dr. A.M. Deelder en copromotoren waren dr. E.A. van Lieshout en dr. J.J. Verweij. Hierna volgt een samenvatting van zijn proefschrift over moleculaire detectie van darmparasieten in de klinische diagnostiek en epidemiologie.

**Trefwoorden:** *Giardia*, *Entamoeba*, *Cryptosporidium*, *Strongyloides*, *Schistosoma*, microsporidia, real-time PCR

## Samenvatting

The detection of intestinal parasitic infections for routine diagnosis and for epidemiological research still depends mainly on microscopical examination of stool samples and time consuming additional diagnostic methods (e.g. culture, antigen detection). During the last years remarkable progress has been made in the development of molecular diagnostic methods. DNA isolation from stool can be processed in a semi- or fully-automated system where after specific DNA of multiple targets can

be amplified simultaneously, visualized on screen and semi-quantified in a closed tube system with a multiplex real-time PCR. In this thesis, a diagnostic approach using multiplex real-time PCR is assessed for the routine clinical diagnosis and epidemiology of intestinal parasites. The comparative studies in this thesis revealed that the introduction of real-time PCR for routine detection of diarrhoea causing protozoa and helminths will improve the diagnostic efficiency of laboratories dealing with faecal samples. Standard diagnostic procedures can further be improved by the design of real-time PCR panels for specific patient groups containing parasitic, bacterial, fungal and/or viral targets. Furthermore, with the simple sample collection procedure and the high throughput potential, the multiplex real-time PCR showed to be a powerful tool for epidemiological studies, even in remote areas.

Correspondentieadres: R.J. ten Hove, Postbus 1514, 6501 BM Nijmegen, email: robtenhove@gmail.com

# Factors underlying the success of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing-genotype in Indonesia

## Inleiding

Mevrouw I. Parwati is hoofd van de afdeling Klinische Pathologie van het Hasan Sadikin ziekenhuis in Bandung, Indonesië. Ze voltooide in 2004 haar lokale PhD ('S3') aan Padjadjaran University, Bandung en volgde ondertussen vanaf 2001 training in moleculaire typering en diagnostiek in Nederland, later in een PhD-programma aan de Radboud Universiteit te Nijmegen. Op 9 november jl. is ze gepromoveerd. Van haar proefschrift volgt hier een samenvatting.

**Trefwoorden:** Beijing, *Mycobacterium tuberculosis*, genotypering

In Indonesië is een derde deel en het meest voorkomende genotype van de *Mycobacterium tuberculosis*-stammen het Beijing-genotype. De distributie van veel verschillende *M. tuberculosis*-genotypen werd vastgesteld door onderzoek bij bijna 900 patiënten van twee verschillende eilanden. Dat het *M. tuberculosis* Beijing-genotype het meest voorkomt, kan een mogelijke verklaring zijn voor de toename van antibioticaresistentie bij dit genotype. De relatie tussen *M. tuberculosis* Beijing en mutaties in antibioticaresistentiegenen van isolaten van 300 Indonesische tuberculosepatiënten werd onderzocht. In *M. tuberculosis* Beijing werden meer mutaties in antibioticaresistentiegenen gevonden dan in niet-Beijingstammen, zowel voor *rpoB* (33,3% tegen 18,7%), als voor *katG315* (18,5% tegen 12,8%), als voor *embB306* (16,5% tegen 6,1%). Dit was niet ten gevolge van een over-representatie van *M. tuberculosis* Beijing onder patiënten met een geschiedenis van eerdere tuberculosebehandeling. Ook onder nieuw behandelde patiënten bleken mutaties in antibioticaresistentiegenen sterk geassocieerd met het Beijing-genotype. Het Beijing-

genotype toonde een onafhankelijke risicofactor te zijn voor een mislukte tuberculosebehandeling. Na behandeling van tuberculose bleven patiënten met het Beijing-genotype een toegenomen risico houden op terugkerende tuberculose, op permanente longschade en op overlijden.

Verschillen in de genetische opmaak van het immuunsysteem van de gastheer kunnen mogelijk een grotere gevoeligheid voor het verkrijgen van bijzondere *M. tuberculosis*-genotypen opleveren. Dit kan eveneens een factor zijn die bijdraagt aan het evolutiesucces van het Beijing-genotype. Het menselijke gen *SLC11A1* is verbonden met gevoeligheid voor tuberculose. In Indonesië zijn bepaalde genotypen van twee verschillende polymorfismen van *SLC11A1* sterk geassocieerd met een infectie van *M. tuberculosis* Beijingstammen. De wijde geografische distributie van *M. tuberculosis* Beijing en zijn genetische homogeniteit suggereert dat stammen van dit genotype een selectief voordeel op andere *M. tuberculosis*-stammen kunnen hebben. Het proefschrift eindigt met een overzicht van alle publicaties tot nu toe met betrekking tot moleculair-epidemiologisch, experimentele en klinische studies over het Beijing-genotype.

Al met al blijken de Beijing stammen veel voor te komen in Indonesië, zijn ze moeilijker te behandelen en lijken ze zich evolutionair te hebben aangepast aan ons immuunsysteem.

Correspondentieadres: Ida Parwati, Head of Department of Clinical Pathology, Dr. Hasan Sadikin Hospital, Faculty of Medicine - Universitas Padjadjaran, Jl. Pasteur No 38 Bandung, INDONESIA

## PROMOTIES

### 3 september 2009 – D.O. Bezemer

Impact of antiretroviral therapy on HIV-1 transmission dynamics

Promotores: prof. dr. R.A. Coutinho en prof. dr. M. Sabelis. Copromotores: dr. M. Prins en dr. F. de Wolf. AMC Amsterdam, afd. Inwendige Geneeskunde. RIVM Bilthoven, Centrum Infectieziektebestrijding. Universiteit van Amsterdam, Instituut voor Biodiversiteit en Ecosysteem Dynamica.

### 23 september 2009 – A. Nemeč

Antimicrobial resistance and clonality in *Acinetobacter baumannii*

Promotor: prof. dr. P.J. van den Broek. Copromotor: dr. L. Dijkshoorn. LUMC Leiden, afd. Infectieziekten.

### 8 oktober 2009 – K.S.M. Benschop

Clinical and molecular insights into human parechovirus infection

Promotores: prof. dr. M.D. de Jong en prof. dr. C.M.J.E. Vandenbroucke-Grauls. Copromotores: dr. K.C. Wolthers. Universiteit van Amsterdam, afd. Medische Microbiologie. VUMC Amsterdam, afd. Medische Microbiologie en Infectiepreventie.

### 9 oktober 2009 – R.M. Determann

Biomarkers for infection and pulmonary inflammation in critically ill patients

Promotores: prof. dr. M.B. Vroom en prof. dr. M.J. Schultz. AMC Amsterdam, afd. Inwendige Geneeskunde.

### 27 oktober 2009 – M.J.A. van der Plas

Maggot therapy's modes of action. Effect of maggot secretions on microbiological, haematological and immunological processes

Promotor: prof. dr. J.T. van Dissel en prof. dr. G.N. Jukema. Copromotor: dr. P.H. Nibbering. LUMC Leiden, afd. Infectieziekten. VUMC Amsterdam, afd. Heelkunde.

### 15 december 2009 – M.Y. Lin

Discovery of dormancy associated antigens of *Mycobacterium tuberculosis*: Novel targets for the development of post-exposure or therapeutic tuberculosis vaccines

Promotor: prof. dr. T.H.M. Ottenhoff. Copromotor: dr. M. Klein. LUMC Leiden, afd. Infectieziekten.

## ORATIES

13 maart 2009 – Prof. dr. P. W.M. Hermans, hoogleraar Kindergeneeskunde, in het bijzonder de moleculaire infectiologie. Samen voor ons eigen. UMC St. Radboud Nijmegen, afd. Kindergeneeskunde.

20 maart 2009 – Prof. dr. E.J. Snijder, hoogleraar Medische Microbiologie, in het bijzonder de moleculaire virologie. Inpakken en wegwezen: virus evolutie klaar terwijl u wacht. LUMC Leiden, afd. Medische Microbiologie.

7 april 2009 – Prof. dr. A.J. van Winkelhoff, hoogleraar Medische Microbiologie, in het bijzonder de microbiologie

van de mondholte. Tornen aan de tand des tijds. UMCG Groningen, afd. Medische Microbiologie.

14 april 2009 – Prof. dr. C.A. H.H. Daemen, hoogleraar Medische Microbiologie, in het bijzonderde tumorvirologie. Over virussen en kanker. UMCG Groningen, afd. Medische Microbiologie.

10 juni 2009 – Prof. dr. G.S. de Hoog, bijzonder hoogleraar Medische Mycologie Peking University Health Science Center. Research Center for Medical Mycology, Beijing, China.

## DUBBELORATIE

15 september 2009 – Prof. dr. M.D. de Jong, hoogleraar Klinische Virologie. Onbegrensde invloeden. AMC Amsterdam, afd. Infectieziekten. Prof. dr. J.M. Prins, hoogleraar Inwendige Geneeskunde, in het bijzonder de behandeling van infectieziekten. A tale of two cities. AMC Amsterdam, afd. Infectieziekten.

## PERSONALIA

### Nieuwe leden

- G.C.M. Hutten, Beckman Coulter Nederland BV, Postbus 321, 3440 AH Houten
- Mw. C.F.M. van der Donk, Maastricht Universitair Medisch Centrum, afdeling Medische Microbiologie, Postbus 5800, 6202 AZ Maastricht
- Dr. M.C. Morsink, Hogeschool Leiden, Hoger Laboratorium Onderwijs, Postbus 382, 2300 AJ Leiden
- Mw. S.V. de Vries-van Rossum, Isala klinieken, afdeling Hygiëne en Infectiepreventie, Dr. Van Heesweg 2, 8025 AB Zwolle
- Dr. W. Bitter, VUMC, afdeling Medische Microbiologie en Infectiepreventie, Van der Boechorstraat 7, 1081 BT Amsterdam

- A.N. Spaan, UMC Utrecht, Eijkman-Winklerinstituut Go4.614, Heidelberglaan 100, 3584 XC Utrecht
- Mw. dr. C.M. Geurts van Kessel, Van Nideckstraat 20A, 3039 TM Rotterdam

### Adreswijzigingen

- Mw. J. Bestebroer, VUMC, afdeling Medische Microbiologie, Van der Boechorstraat 7, 1081 BT Amsterdam (voorheen UMC Utrecht)
- Mw. dr. B.C. van Hees, Gelre Ziekenhuizen, afdeling Medische Microbiologie, Postbus 9014, 7300 DS Apeldoorn (voorheen Couwenhoven, Zeist)

### Overleden

- 24 juni jl. is op 67-jarige leeftijd overleden mw. dr. J.G. Mulder, medisch-microbioloog, voorheen woonachtig Fivelgolaan 6, 9727 DB Groningen

## AGENDA

### 2009

#### 22 december 2009

**Inaugurale rede Prof. H. Ph. Endtz: "Children's corner"**  
Aula, Burgemeester Oudlaan 50, Rotterdam.  
Aanvang 16.00 uur

### 2010

#### 19-23 januari 2010

**Landelijke Hepatitisweek 2010**  
Congrescentrum Regardz Eenhoorn, Amersfoort  
Informatie: info@hepatitis.nl, www.hepatitis.nl

#### 24-29 januari 2010

**12<sup>th</sup> International Symposium Current Topics in Infectious Diseases**  
Grindelwald, Zwitserland  
Informatie: e-mail: ctid@azu.nl, www.ctid.nl

#### 8 februari 2010

**9<sup>e</sup> Gezamenlijke bijeenkomst van de Werkgroepen Oost-West**  
St. Antonius Ziekenhuis, Nieuwegein. Aanvang 14.00 uur  
Informatie: T. Schulin, tel. 024 3614356; R.W. Vreede, tel. 015 2604305

#### 7-12 maart 2010

**Boerhaave-Commissie: Cursus Klinische Epidemiologie, Schiermonnikoog**  
Inschrijving van 1 september tot 1 december 2009  
Informatie: <http://www.lumc.nl/con/4060/83013/86162/>

#### 8 maart 2010

**325<sup>e</sup> Bijeenkomst van de Werkgroep Oost, medische microbiologie**  
Huize Heyendaal, Nijmegen. Aanvang 14.30 uur  
Informatie: T. Schulin, tel. 024 3614356

#### 9-12 maart 2010

**14<sup>th</sup> International Congress on Infectious Diseases**  
Miami  
Informatie: [www.isid.org](http://www.isid.org)

#### 10 maart 2010

**Bijeenkomst van de Werkgroep West, medische microbiologie**  
Locatie: VUMC, Amsterdam. Aanvang 14.00 uur  
Informatie: R.W. Vreede, tel. 015 2604305, e-mail: [vreede@rdgg.nl](mailto:vreede@rdgg.nl)

Advertentie Roche Diagnostics