

# Genetische karakterisatie van *Enterobacter sakazakii*-isolaten van Nederlandse patiënten met neonatale meningitis

L.C. Smeets, A. Voss, H.L. Muijtens, J.F.G.M. Meis, W.J.G. Melchers

*E. sakazakii* kan worden aangetroffen in melkpoeder en kan ernstige neonatale infecties veroorzaken. In Nederland is in 1981 een cluster van *E. sakazakii*-meningitis beschreven, waarbij *E. sakazakii* ook uit babyvoeding en uit een afwasborstel was gekweekt. De isolaten van dit cluster zijn in deze studie met pulsed-field elektroforese (PFGE) genetisch gekarakteriseerd. De isolaten van patiënten en afwasborstel bleken hetzelfde genotype te hebben. Dit suggereert een orale besmetting met *E. sakazakii* hetgeen in overeenstemming is met eerdere bevindingen in de literatuur. Bij *E. sakazakii*-infecties dient met een orale besmettingsroute rekening gehouden te worden.

*Enterobacter sakazakii* is in 1980 als nieuwe soort beschreven door Farmer et al.<sup>1</sup> Voordien werden isolaten geclassificeerd als geel-gepigmenteerde *Enterobacter cloacae*, een soort waaraan *E. sakazakii* sterk verwant is. Na de publicatie van Urmenyi en Franklin,<sup>2</sup> in 1961, zijn diverse gevallen van sepsis en meningitis bij neonaten beschreven, die veroorzaakt waren door *E. sakazakii*.<sup>3-9</sup> Bij sommige patiënten was er sprake van gastro-enteritis of necrotiserende enterocolitis geassocieerd met *E. sakazakii*. Eén van de eerst beschreven *E. sakazakii*-isolaten was afkomstig uit melkpoeder.<sup>1</sup> Muijtens et al. onderzochten daarop 141 melkpoederblikken uit diverse landen op de aanwezigheid van microbiële verontreiniging en vonden in 52,5% van de gevallen *Enterobacteriaceae*, voornamelijk *E. agglomerans*, *E. cloacae* en *E. sakazakii*. Alle blikken voldeden overigens aan de hygiënische normen.<sup>10</sup> In 1989 werden bij twee uitbraken de infectiegevallen ook daadwerkelijk toegeschreven aan de consumptie van besmette babyvoeding,<sup>8,11</sup> waarbij het plasmide-type van de stammen geïsoleerd bij de patiënten overeenkwam met dat van stammen gekweekt uit het melkpoeder.<sup>12</sup> In Nederland waren toen reeds een achttal gevallen van *E. sakazakii*-meningitis beschreven, deels door het Nederlands referentielaboratorium voor bacteriële meningitis in Amsterdam aanwezige *Enterobacter*- en *Klebsiella*-isolaten te reviseren.<sup>13</sup> Het doel van dit onderzoek was het vermeende epidemiologische verband tussen een aantal isolaten te evalueren.

## Stammen en methoden

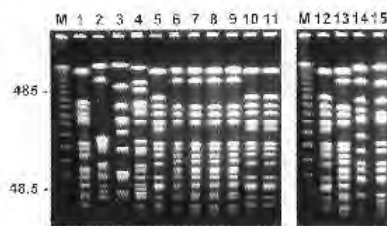
### Stammen

In totaal zijn 15 isolaten uit de periode 1977-1981 bestudeerd. Zes isolaten zijn afkomstig van vijf patiënten uit één ziekenhuis, die daar in de loop van vier jaar *E. sakazakii*-meningitis hadden opgelopen. Van dezelfde ziekenhuisafdeling werden ook vier isolaten gekweekt uit een afwasborstel en uit klaargemaakte babyvoedingen. Tevens werden isolaten van drie meningitispatiënten uit twee andere ziekenhuizen verkregen. Tenslotte waren er nog twee stammen beschikbaar die waren gekweekt uit een afwasborstel in een ziekenhuiskeuken elders, waar

tevens babyvoeding werd klaargemaakt. Alle isolaten zijn met behulp van het API 20E systeem geïdentificeerd als *E. sakazakii*, aangevuld met een DNase-reactie en het waarnemen van het karakteristieke gele pigment.

### Pulsed field gel-elektroforese

Na groei overnacht in LB-medium werden de bacteriën gecentrifugeerd en werd DNA geïsoleerd volgens standaardprocedures.<sup>14</sup> Als restrictie-enzym werd *Xba*I (Pharmacia) gebruikt. Dit enzym was eerder samen met *Not*I geselecteerd voor de verwante soort *E. cloacae*<sup>15</sup> en gaf voor *E. sakazakii* van deze twee de beste resultaten (resultaten niet verder beschreven). Voor de restrictie werden de plugs tweemaal 1 uur bij 5°C gefincubeerd in restrictiebuffer met 10 µg/ml RNAse A, eerst zonder enzym en daarna met *Xba*I, en vervolgens gedurende 15-19 uur gedigesteerd bij 37°C en opgeslagen bij 5°C. De plugs werden ingegoten in de loop-gel (1% pulsed-field certified agarose, Biorad, in 0,5x TBE) en ge-elektroforeerd in 0,5x TBE met een CHEF-DR II pulsed-field opstelling (BioRad) bij 200V en 13°C met een 'switch-time ramp' van 5 tot 60 sec gedurende 24 uur.



Figuur 1. PFGE-analyse van *E. sakazakii*-isolaten. De nummers corresponderen met tekst en tabel. Het ziekenhuis waar de uitbraak plaatsvond wordt aangeduid als 'clusterziekenhuis'. 'M': 48,5 kb marker. Laan 1: clusterziekenhuis, patiënten-isolaat uit 1977. Laan 2 t/m 4: patiënten-isolaten uit drie Nederlandse ziekenhuizen. Laan 5: clusterziekenhuis, patiënten-isolaat uit 1979. Laan 6 t/m 9: clusterziekenhuis, patiënten-isolaten uit 1981. Laan 10 t/m 12: clusterziekenhuis, babyvoeding. Laan 13: clusterziekenhuis, afwasborstel-isolaat. Laan 14 en 15: Isolaten uit een Nederlandse ziekenhuiskeuken, 1983.

Tabel 1. PFGE-typering van 15 *E. sakazakii*-isolaten.

nr.	bron	datum	PFGE type
<i>clusterziekenhuis</i>			
1	liquor	12/08/77	A
5	liquor	13/04/79	B
6	liquor	15/04/81	C
7	liquor	16/04/81	C
8,9	liquor/bloed	13/07/81	C
13	afwasborstel	20/10/81	C
10,11	babyvoeding, fles 1	14/07/81	B
12	babyvoeding, fles 2	06/10/81	B
<i>controlestammen</i>			
2	liquor	13/02/78	D
3	liquor	14/07/79	E
4	liquor	23/09/79	F
14	afwasborstel	05/73	G
15	afwasborstel	05/73	H

nr. = isolaatnummer, nummers corresponderen met tekst en Figuur 1.

datum = datum van isolatie

PFGE type = classificatie in genotypen door middel van pulsed-field gel elektroforese

## Resultaten

In een periode van vier jaar kregen vijf patiënten (isolaten 1, 5 t/m 9, zie Figuur 1 en Tabel 1) met geboortegewichten tussen de 1670 en 2830 gram in een Nederlands ziekenhuis *E. sakazakii*-meningitis. Slechts één patiënt overleefde de infectie met ernstige mentale retardatie en chronische hydrocephalie. Twee patiënten van deze groep (isolaten 1 en 5) raakten in respectievelijk 1977 en 1979 besmet. Van hen waren de infectieverwekkers oorspronkelijk als *E. cloacae* geïdentificeerd en zijn er geen omgevingskweken beschikbaar. De andere drie patiënten (isolaten 6 t/m 9) zijn in 1981 in een tijdsbestek van drie maanden besmet geraakt. Kort daarna werd *E. sakazakii* gekweekt uit een afwasborstel (isolaat 13) en enkele malen uit klaargemaakte babyvoeding afkomstig van de betreffende afdeling (isolaten 10 t/m 12), maar niet uit melkpoedermonsters zelf.<sup>13</sup>

In de PFGE-analyse zijn de genotypen van de patiëntenisolaten (isolaten 6 t/m 9) identiek aan het isolaat van de afwasborstel uit de afdelingskeuken (isolaat 13). Dit genotype komt met geen van de andere isolaten overeen. De isolaten uit de klaargemaakte babyvoeding uit dezelfde periode in 1981 (isolaten 10 t/m 12) zijn van één genotype dat verschilt van de patiëntenisolaten uit 1981, maar identiek bleek aan het isolaat van de patiënt uit 1979 (isolaat 5), afkomstig uit hetzelfde ziekenhuis. In totaal onderscheidt de PFGE acht genotypen, waarbij alle epidemiologisch niet-gerelateerde isolaten (controle-isolaten 2-4, 14 en 15) van elkaar verschillen en er twee clusters gevonden werden met een mogelijk epidemiologisch verband (genotype B en C). Tevens zijn alle isolaten met PCR-fingerprinting getypeerd, maar de PFGE onderscheidt in ons onderzoek meer genotypen dan de PCR. Daarom zijn de resultaten van de RAPD-PCR-analyse hier buiten beschouwing gelaten.

## Discussie

De resultaten van de PFGE-analyse bevestigen het epidemiologisch verband tussen de drie ziektegevallen in 1981 waarbij de keuken waar de babyvoeding bereid werd als bron werd geïdentificeerd. Aangezien *E. sakazakii* als enig bekend natuurlijk reservoir melkpoeder heeft,<sup>16</sup> is het aannemelijk te veronderstellen dat de besmetting van de afwasborstel plaats heeft gevonden via melkpoeder, bijvoorbeeld door het schoonmaken van gecontamineerde flesjes. Daarna kan de borstel, flesjes of andere attributen voor het bereiden van flesvoeding gecontamineerd hebben. Waarschijnlijk is de stam enkele maanden in de keuken aanwezig gebleven, of zijn meer besmettingen opgetreden uit blikken melkpoeder van dezelfde productie-eenheid. Overigens lukte het niet om uit monsters van het bewuste melkpoeder *E. sakazakii* te kweken hetgeen echter mogelijk door de beperkte hoeveelheid afgenomen monster veroorzaakt zou kunnen zijn omdat met grotere monsters de kans om *E. sakazakii* in melkpoeder aan te tonen sterk stijgt.<sup>10</sup>

De isolaten gekweekt uit twee monsters van reeds klaargemaakte melk (isolaten 10 t/m 12), waarvan één kort na het laatste ziektegeval was bereid, blijken niet verwant met de uitbraakstam uit '81. Dit genotype is wel identiek aan het genotype geïsoleerd bij de patiënt uit 1979 (isolaat 5), die indertijd op dezelfde afdeling ziek was geworden. De houdbaarheidsstermijn van het melkpoeder was 24 maanden, zodat de partijen gebruikt in 1979 en 1981 niet erg lang na elkaar geproduceerd hoeven zijn.

Onze resultaten geven ook in het grootste cluster van *E. sakazakii*-meningitis in Nederland aanwijzingen voor babyvoeding en keukengeredschap als transmissieroute. Bij *E. sakazakii*-infecties zijn nooit aanwijzingen gevonden voor andere routes, bijvoorbeeld het geboortekanaal.<sup>15</sup> Transmissie via keukenbenodigdheden is eerder beschreven, waarbij *E. sakazakii* zich in één geval gedurende zes weken in een mixer wist te handhaven.<sup>9,11</sup>

Omdat *E. sakazakii* al in het melkpoeder aanwezig is, kan ook hygiënisch klaargemaakte voeding al besmetting veroorzaken, bijvoorbeeld als deze te warm wordt opgeslagen.<sup>8</sup> Bij infecties met *E. sakazakii* moet daarom altijd met een orale besmettingsroute rekening worden gehouden.

## Summary

### *Genetic characterisation of Enterobacter sakazakii.*

*E. sakazakii* can be found in milk powder and can cause severe neonatal infections. In the Netherlands a cluster of *E. sakazakii*-meningitis has been described in 1981 in which *E. sakazakii* was cultured both from baby-food and a washing-up brush. In this study, the isolated *E. sakazakii* strains from this cluster were genetically characterized by pulsed-field gel electroforese (PFGE). The isolates from both the patients and the brush were found to be identical. These results suggest an oral transmission route of *E. sakazakii* which confirms previous data described in the literature. In the case of *E. sakazakii* infection, an oral transmission should therefore be taken into account.

## Literatuur

1. Farmer III JJ, Asbury MA, Hickman F-W, Brenner DJ and the Enterobacteriaceae Study Group. *Enterobacter sakazakii*: a new species of 'Enterobacteriaceae' isolated from clinical specimens. Int J Syst Bacteriol 1980; 30:569-84.

2. Urményi AMC, Franklin AW. Neonatal death from pigmented coliform infection. *Lancet* 1961;i:313-5.
3. Kleiman MB, Allen SD, Neal P, Reynolds J. Meningoencephalitis and compartmentalization of the cerebral ventricles caused by *Enterobacter sakazakii*. *J Clin Microbiol* 1981;14:352-4.
4. Monroe PW, Tilt WL. Bacteremia associated with *Enterobacter sakazakii* (yellow-pigmented *Enterobacter cloacae*). *J Clin Microbiol* 1979;10:850-1.
5. Muijtjens HL, Kollée LAA. Neonatal meningitis due to *Enterobacter sakazakii*. *Tijdschr Kindergeneesk* 1982;50:110-2.
6. Willis J, Robinson JJ. *Enterobacter sakazakii* meningitis in neonates. *Pediatr Infect Dis J* 1988;7:196-9.
7. Gallagher PG, Ball WS. Cerebral infarctions due to CNS infection with *Enterobacter sakazakii*. *Pediatr Radiol* 1991;21:135-6.
8. Biering G, Karlsson S, Clark NC, Jónsdóttir KE, Lúdvíggsson P, Steingrímsson O. Three cases of neonatal meningitis caused by *Enterobacter sakazakii* in powdered milk. *J Clin Microbiol* 1989;27:2054-6.
9. Noriega FR, Martin MA, Schwalbe RS. Nosocomial bacteremia caused by *Enterobacter sakazakii* and *Listonella mesenteroides* resulting from extrinsic contamination of infant formula. *Ped Infect Dis J* 1990;9:447-9.
10. Muijtjens HL, Roelofs-Willemsse H, Jaspard GHJ. Quality of powdered substitutes for breast milk with regard to members of the family *Enterobacteriaceae*. *J Clin Microbiol* 1988;26:743-6.
11. Simmons BP, Gelfand MS, Haas M, Metts L, Ferguson J. *Enterobacter sakazakii* infections in neonates associated with intrinsic contamination of a powdered infant formula. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1989;10:398-401.
12. Clark NC, Hill BC, O'Hara CM, Steingrímsson O, Cooksey RC. Epidemiologic typing of *Enterobacter sakazakii* in two neonatal nosocomial outbreaks. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1990;13:467-72.
13. Muijtjens HL, Zanen HJC, Sonderkamp III, Kollée LA, Wachsmuth IK, Farmer JJ III. Analysis of eight cases of neonatal meningitis and sepsis due to *Enterobacter sakazakii*. *J Clin Microbiol* 1983;18:115-20.
14. Pfaller MA, Hollis RJ, Sader HS. PFGE analysis of chromosomal restriction fragments. In: *Clinical Microbiology Procedure Handbook*, H.D. Isenberg (ed.) American Society for Microbiology, Vol. 2, section 10, 1992.
15. Haertl R, Bandlow G. Epidemiological fingerprinting of *Enterobacter cloacae* by small-fragment restriction endonuclease analysis and Pulsed field gel electrophoresis of genomic restriction fragments. *J Clin Microbiol* 1993;31:128-33.
16. Muijtjens HL, Kollée LAA. *Enterobacter sakazakii* meningitis in neonates: causative role for formula? *Ped Infect Dis J* 1990;9:372-3.

L.C. Smeets, arts-assistent medische microbiologie,  
 A. Voss, medisch microbioloog,  
 H.L. Muijtjens, medisch microbioloog,  
 J.F.G.M. Meis, medisch microbioloog,  
 W.J.G. Melchers, moleculair bioloog,  
 Academisch Ziekenhuis Nijmegen St Radboud  
 Afdeling Medische Microbiologie  
 Postbus 9101  
 6500 HB Nijmegen  
 e-mail: W.Melchers@MMB.AZN.NL

(advertentie)

#### Productinformatie Trovan® (trovafloxacin/alatrofloxacin)

Trovan® (trovafloxacin) 23,2 mg trovafloxacin en alatrofloxacin, Trovan® (alatrofloxacin) 200 mg trovafloxacin en alatrofloxacin, Trovan® (trovafloxacin) 400 mg met 60 ml concentrat voor oplossing voor infusie bevat 314,5 mg alatrofloxacin en 200 mg trovafloxacin, Trovan® (trovafloxacin) 400 mg met 60 ml concentrat voor oplossing voor infusie bevat 471,7 mg alatrofloxacin en 200 mg trovafloxacin. **Indicaties:** Trovan® en Trovan® IV kunnen worden toegepast bij bacteriële infecties veroorzaakt door voor Trovan® gevoelige micro-organismen van de voorkeedschicht (acute sinusitis); de lagere luchtwegen (acute exacerbaties van chronische bronchitis), lichte, matige en ernstige pneumonie, zowel buiten als binnen het ziekenhuis (vergevoerd); gecompliceerde intra-abdominale infecties en acute infecties van het bekken, salpingitis, ongecompliceerde gonococcen urethritis en cervicitis en door Chlamydia veroorzaakte cervicitis; gecompliceerde infecties van de huid en weke delen. **Contra-indicaties:** Overgevoeligheid voor chinolonen of voor weefselverbindingen. Ernstig verminderde leverfunctie. Zwangerschap en borstvoeding. Toepassing bij kinderen niet bekend van de trovafloxacin. Glucose 6-fosfaatdehydrogenase-deficiënte. Aanname van nosocomiale infecties in verband met een fluïdumvoorn. **Waarschuwingen:** Trovafloxacin dient niet voor zichtbaarheid te worden toegepast bij patiënten met bekende of vermoede psychiatrische aandoeningen of aandoeningen van het CNS. Zeldzame gevallen van psoriasis-achtige reacties zijn gerapporteerd. Langdurige toediening aan sterk zonlicht of ultraviolet straling tijdens de behandeling dient te worden vermeden. Datzelfgheid of een licht gevoel in het hoofd (missief) min van darm, voortbijgaand en verval (niet bij voortgezette toediening) kan optreden. Voorzichtigheid wordt ook geroepen omtrent de combinatie met andere bacteriële bij de aanwezigheid van deze verschijnselen. Tardieve en/of peesmusculen van verlamming bij gebruik van cholinergica. Een snelle infusie van trovafloxacin (5-30 min) kan, verslechtere resultaten, of een infusie over een periode van 60 minuten oedeemen. **Interacties:** Het onderzoek is gebieden dat Trovan® G6PD significante interacties heeft met, waddal, theofylline, warfarine, digoxine, ampicillin, rimedime en cyclosporine. Absorptie kan worden beïnvloed door antacida, antacida en ijzertablettenvervangende producten. **Bijwerkingen:** Het klinisch onderzoek was de frequentie of een licht gevoel in het hoofd de meest frequent waargenomen bijwerking. Gastro-intestinale klachten zijn gemeeld. Tendinitis, reacties op de injectieplaats sinner vroelkemer. Zie verder: 1B (dat). **Dosering:** Alatrofloxacin Trovan® (alatrofloxacin) 100-300 mg (oral of IV). Voor volledig productinformatie zie 1B (dat). Trovan® (U.R.) is een merknaam van Pfizer Inc., New York, (R) Pfizer V.V., Postbus 37, 2000 AA Capelle a/d IJssel.

**TROVAN®** ORAAL  
 TROVAFLOXACIN  
 31 tot 1