

**Epidemiologie van ESBL genen TEM,
SHV en CTX-M en het quinolonen
resistentiegen *qnrA*
Opzetten real time multiplex PCR voor
CTX-M en *qnrA***

December 2007

Claudia van Oostveen
St. Antonius Ziekenhuis Nieuwegein

Epidemiologie van ESBL genen TEM, SHV en CTX-M en het quinolonen resistentiegen *qnrA* Opzetten real time multiplex PCR voor CTX-M en *qnrA*

Naam: Claudia van Oostveen

Opleiding: Hogeschool Utrecht
Faculteit Natuur en Techniek
Instituut for Life Sciences & Chemistry
Opleiding Biologie en Medisch Laboratorium Onderzoek

Afstudeerrichting: Medische Microbiologie

Stageplaats: St. Antonius Ziekenhuis Nieuwegein
Koekoekslaan 1
3534 CM Nieuwegein

Afdeling: Medische Microbiologie en Immunologie

Stagebegeleider: Dr. E.J. van Hannen

Schoolbegeleider: Dhr. D. van Brenk

Voorwoord

Na ruim vier jaar hard werken is het einde ineens inzicht! Ik heb bijna een half jaar stage gelopen in het St. Antonius ziekenhuis. Hoewel ik erg opzag tegen de afstudeeropdracht heb ik het erg leuk gevonden. Mijn opdracht was in het begin een behoorlijk onduidelijk, pas later begon de opdracht vorm aan te nemen. Het was wel duidelijk dat ik de epidemiologie moest bepalen van ESBL. Het opzetten van een real time PCR is er later bijgekomen. Het leukste en interessantst vond ik het in elkaar zetten van de enorme database voor de epidemiologie en het opzetten van de PCR.

Ik waardeer het heel erg dat ik, ondanks mijn overbelaste pipetteer armen, stage mocht lopen op de afdeling Medische Microbiologie. Ik vond het heel plezierig om Erik van Hannen als stagebegeleider te hebben. Ondanks alle lichamelijke tegenslagen bleek hij toch engelen geduld met mij te hebben. Tevens bleef hij mij toespreken, dat ik me vooral niet schuldig moest voelen. Hierdoor kijk ik echt met plezier terug op deze leerzame stage.

De afdeling Medische Microbiologie is een fijne afdeling om te werken. Iedereen is erg behulpzaam en geïnteresseerd in het verloop van het onderzoek. Daar wil ik natuurlijk iedereen voor bedanken.

De volgende personen wil ik in het bijzonder bedanken:

- Ben de Jong; voor de uitleg van voornamelijk de praktische vaardigheden en voor de tijd die hij altijd vrij wilde maken als ik met vragen zat.
- Petra Foppen en Wilma de Jong, voor het beantwoorden van alle vragen die ik op hen afvuurde.
- Rob van Oostveen; mijn vader, die me heeft geholpen met het verzinnen van de ingewikkelde formules voor de database en voor het helpen met de opmaak van mijn scriptie.
- John de Kanter; mijn vriend, voor het verbeteren van alle taalfouten in mijn scriptie en voor de steun en lieve woorden tijdens de afstudeerstress.
- Erik van Hannen; voor zijn relaxedheid, geduld, begeleiding en alles wat ik van hem geleerd heb.
- Bart Vlaminckx; voor zijn enthousiasme, interesse en ook voor zijn hulp.

Tenslotte wil ik de mensen om me heen die ik niet genoemd heb ook bedanken voor hun steun en het aanhoren van mijn verhalen en het geven van tips en adviezen.

*Claudia van Oostveen
Amsterdam, december 2007*

Samenvatting

ESBL wordt in Nederland en dus ook in het St. Antonius ziekenhuis een steeds groter probleem. In dit onderzoek werd voor *K. pneumoniae*, *E. cloacae* en *E. coli* de epidemiologie bepaald voor de ESBL genen TEM, SHV en CTX-M en voor het quinolonen resistentiegen *qnrA* om inzicht te krijgen in hoe groot het probleem in het St. Antonius ziekenhuis is. Ook is er een real time multiplex PCR opgezet voor CTX-M en *qnrA*. Deze real time PCR moet de door Lydia Kool (stagiaire MMI 2007) ontwikkelde PCR vervangen. De PCR is namelijk erg arbeidsintensief en de real time PCR geeft in 45 minuten een resultaat. Dit is ongeveer vijf uur sneller dan de oude PCR en twee dagen eerder dan de E-test die door het laboratorium wordt uitgevoerd.

Voor het bepalen van de epidemiologie is een database gemaakt. Aan de hand van formules die in de Excel database zijn verwerkt kon bepaald worden welk percentage klinische patiënten en screeningspatiënten er geïnfecteerd zijn met een ESBL of met een quinolonen resistentiegen *qnrA*. Ook is bepaald welke genen in de bacteriestammen het meest voorkwamen. Zo hebben *E. coli* stammen voornamelijk CTX-M genen, *E. cloacae* stammen voornamelijk *qnrA* en CTX-M genen en bij *K. pneumoniae* zit het SHV-1 gen geïntegreerd in het bacteriële chromosoom.

Voor het opzetten van de real time PCR zijn primers en probes ontwikkeld. Aan de hand van een validatieprotocol is de PCR gevalideerd door het bepalen van de juistheid, de selectiviteit, de detectiegrens, de robuustheid, de sensitiviteit en de specificiteit. CTX-M is onder te verdelen in vijf groepen. Er is een multiplex voormix gemaakt van de primers en probe van de vijf CTX-M groepen en van de primers en probe van *qnrA*. De PCR werd vergeleken met de “gouden standaard” de E-test. Met deze gevalideerde real time PCR worden van de wekelijkse ic screening de verdachte kolonies getest op CTX-M en *qnrA*. Ook worden de ESBL aanvragen van het Diakonessen ziekenhuis in Utrecht met de Real time PCR gedaan.

Summary

ESBL is a growing problem in hospitals in the Netherlands. In this research, epidemiology of ESBL genes TEM, SHV en CTX-M and of the quinolone resistance gene *qnrA* was determined, to gain insight in the growing ESBL problem in the St. Antonius hospital in Nieuwegein. Also, a real time multiplex PCR for CTX-M and *qnrA* was developed. This real time PCR replaced the rather labour - and time consuming PCR developed by Lydia Kool (trainee MMI 2007). This new real time PCR is capable of producing results in 45 minutes. This is a approximately five hours faster than the old PCR and two days earlier than the E-test done by the current laboratory procedure.

A database has been made to determine the epidemiology. With formulas, which have been processed in an Excel database, it could be determined which percentage of clinical- and screening patients are infected with an ESBL or *qnrA* (resistance gene for quinolones). Also, it was determined which ESBL genes where mostly common in the bacterial strains. Most of the *E. coli* isolates appeared to be positive for CTX-M, *E. cloacae* isolates are mostly positive for CTX-M and *qnrA* and for *K. pneumonia*, the SHV-1 gene is integrated in the bacterial chromosome.

To set up the real time PCR, primers and probes were developed. The real time PCR was validated by determining the correctness, selectivity, detection limits, robustness, sensitivity and the specificity by using a validation protocol. CTX-M can be subdivided into five groups. A multiplex premix was made for *qnrA* primers and probe and five CTX-M groups primers and probes. The PCR was compared to the E-test (golden standard). With this validated real time PCR, ESBL suspected colonies of the weekly IC screening were tested on CTX-M and *qnrA*. Also, the ESBL samples from the Diaconessenhuis in Utrecht were processed with the real time PCR.

Afkortingen

AMC	Amsterdams Medisch Centrum
AmpC	gen dat codeert voor ampicilline resistentie
AZN	Antonius Ziekenhuis Nieuwegein
bla	beta-lactamase
BSA	Bovine Serum Albumine
bp	basenparen
CFU	Colony Forming Unit
CME	ESBL gen
Ct waarde	Cycle threshold
CTX-M	ESBL gen; naam verwijst naar de grote hydrolytische activiteit voor cefotaxim
DNA	Desoxy Nucleic Acid
dNTP	desoxyriboNucleotide TriPhosphate
ESBL	Extended-Spectrum β -Lactamase
<i>E. cloacae</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
GES	ESBL gen
IC	Intensive Care
Kb	Kilobasen
<i>K. oxytoca</i>	<i>Klebsiella oxytoca</i>
<i>K. pneumonia</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
MIC	Minimal Inhibitory Concentration
nM	nano Molair
OXA	ESBL gen. Veroorzaakt hoge resistentie tegen <u>ox</u> acilline
OXY	Gen van <i>Klebsiella oxytoca</i> , dat bij hyperproductie een ESBL fenotype kan veroorzaken.
PBP	Penicilline Binding Proteïne
PCR	Polymerase Chain Reaction
PER	ESBL gen
<i>QnrA</i>	Resistentiegen tegen fluoroquinolonen
SFO	ESBL gen
SHV	ESBL gen; ‘ <u>S</u> ulf <u>H</u> ydryl <u>V</u> ariable’
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TEM	ESBL gen; naam afkomstig van <u>T</u> emoniera
TLA	ESBL gen
UMCU	Universitair Medisch Centrum in Utrecht
USA	United States of America
VEB	ESBL gen

Inhoudsopgave

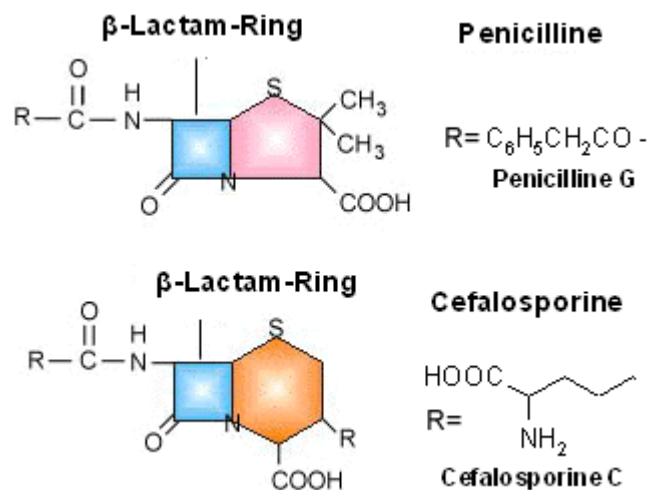
<i>Voorwoord</i>	3
<i>Samenvatting</i>	4
<i>Summary</i>	5
<i>Afkortingen</i>	6
<i>Inhoudsopgave</i>	7
1 Inleiding	9
1.1 β-lactam-antibioticum en β-lactamase	9
1.2 Resistentie	10
1.3 ESBL	11
1.4 Typen ESBL	12
1.4.1 TEM	12
1.4.2 SHV	12
1.4.3 CTX-M	13
1.4.4 <i>QnrA</i>	13
1.5 Detectiemethoden op het laboratorium van het St. Antonius Ziekenhuis	14
1.5.1 E-test	14
1.5.2 Vitek	15
1.5.3 PCR (oude methode)	15
1.6 Epidemiologie	15
1.6.1 Maatregelen bij een infectie	16
1.7 Doel	17
2 Materiaal en methoden epidemiologie	18
2.1 E-testen	18
2.2 Revco database	18
2.3 ESBL database	18
2.3.1 Onderscheid is belangrijk voor het onderzoek	18
2.3.2 Klinisch- of screeningsmateriaal	19
2.3.3 Positief monster	19
2.3.4 Positieve patiënt	20
3 Materiaal en methoden real time PCR	21
3.1 Real time PCR	21
3.2 Multiplex PCR	22
3.3 Stepone™	22
3.4 Optimalisatie van de PCR	22
3.4.1 Primers en probes	22
3.5 Validatie van de PCR	24
3.5.1 Juistheid (analytische validatie)	25

3.5.2	Selectiviteit (analytische validatie)	25
3.5.3	Detectiegrens (analytische validatie)	25
3.5.4	Robuustheid (analytische validatie)	25
3.5.5	Sensitiviteit (klinische validatie)	25
3.5.6	Specificiteit (klinische validatie)	26
4	<i>Resultaten epidemiologie</i>	27
4.1	Klinische patiënten en screeningspatiënten	27
4.2	Epidemiologie	27
4.2.1	<i>K. pneumoniae</i>	27
4.2.2	<i>E. cloacae</i>	28
4.2.3	<i>E. coli</i>	29
5	<i>Resultaten real time PCR</i>	31
5.1	Optimalisatie van de real time PCR	31
5.1.1	Primers en probes	31
5.2	Validatie van de real time PCR	33
5.2.1	Juistheid (analytische validatie)	33
5.2.2	Selectiviteit (analytische validatie)	33
5.2.3	Detectiegrens (analytische validatie)	34
5.2.4	Robuustheid (analytische validatie)	35
5.2.5	Sensitiviteit (klinische validatie)	36
5.2.6	Specificiteit (klinische validatie)	38
6	<i>Conclusie en discussie</i>	39
6.1	Doel	39
6.2	Opzetten PCR	39
6.3	Epidemiologie	40
6.4	Eindconclusie	41
	<i>Literatuurlijst</i>	42
	<i>Bijlage 1 Excel formules database</i>	44
	<i>Bijlage 2 Stammen die gebruikt zijn voor het testen van de primers en probes</i>	45

1 Inleiding

1.1 β -lactam-antibioticum en β -lactamase

De Britse arts en bacterioloog Alexander Fleming ontdekte, in 1929, per toeval de penicilline producerende schimmel, *Penicillium notatum*. De kweek waarmee hij bezig was, was besmet geraakt met deze schimmel. In de buurt van deze schimmel groeide de bacteriekolonies niet, waardoor hij concludeerde dat deze schimmel een antibacteriële stof moest produceren. Vandaag de dag zijn de β -lactam antibiotica zoals de breedspectrum penicillines, cefalosporines, monobactams en carbapenems de meest voorgeschreven antibiotica wereldwijd; dit vanwege hun efficiëntie en hun lage toxiciteit. β -lactam-antibioticum bevat een beta-lactam groep (een ring bestaande uit drie koolstofatomen en een stikstofatoom), zie figuur 1. Deze β -lactam-antibiotica werken in op de celwand van de bacteriën en remmen/stoppen de synthese van delende, dus niet van rustende, bacteriën. Hierdoor verzwakt de celwand waardoor de cel lyseert. Het meest bekende β -lactam antibioticum is penicilline. Het grote nadeel van penicilline is dat het erg gevoelig is voor penicillinases. Penicillinases en β -lactamasen zijn enzymen die worden geproduceerd door veel Gram-negatieve bacteriën. Ze zijn in staat penicilline en penicillinederivaten (monobactams, cefalosporines, carbapenems) af te breken door de amideverbinding in de β -lactam ring open te knippen. [1, 2, 3]



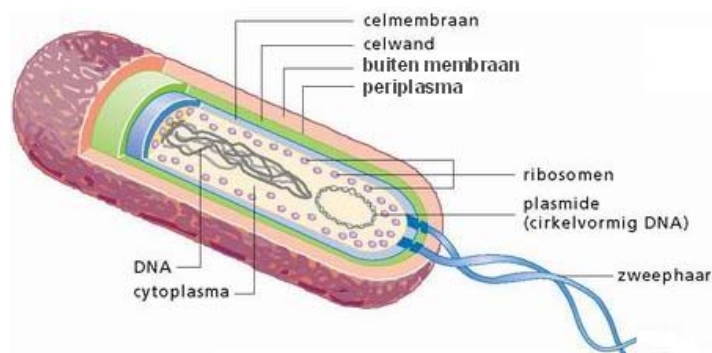
Figuur 1: β -lactam antibiotica, de β -lactam ring is de vierkante structuur in het midden.

Vaak worden penicillinen en cefalosporinen toegediend met een β -lactamase remmer, zoals clavulaanzuur. Clavulaanzuur inactieveert het β -lactamase. Het maakt dat penicillinen en cefalosporinen, die de productie van dit soort enzymen tegenhouden en normaal niet meer effectief zijn, toch hun werk kunnen doen. [2]

Cefalosporinen komen oorspronkelijk uit de schimmel *Cephalosporium acremonium*. Deze schimmel werd in 1945 op Sardinië uit het rioolwater geïsoleerd. De eerste cefalosporinen kwamen in 1962 op de markt. Ze komen qua structuur en aangrijpingspunt overeen met de penicillinen. Cefalosporinen remmen de mucopeptide synthese van de celwand van een bacterie door zich te binden aan PBP's (penicilline-binding-proteïns). De meeste cefalosporinen hebben een breed werkingsspectrum en een lage toxiciteit voor de patiënt. Ze kunnen aan de hand van hun antimicrobiële eigenschappen worden onderverdeeld in vier groepen. Deze groepen worden generaties genoemd. Elke nieuwere generatie heeft een bredere activiteit tegen Gram-negatieve bacteriën en een smallere activiteit tegen Gram-positieve bacteriën en is minder gevoelig voor de β -lactamasen dan de voorgaande generatie. In eerste instantie

leken de derde generatie cefalosporinen stabiel te zijn in aanwezigheid van β -lactamase. Helaas werden er binnen een paar jaar mutaties ontwikkeld die zorgden voor resistentie tegen deze derde generatie. Van 2001 tot 2005 is het percentage *E. coli* en *K. pneumoniae* isolaten die resistent zijn tegen derde generatie cefalosporinen toegenomen. Op dit moment zijn er vier generaties cefalosporinen. [1, 4, 5, 6]

β -lactamase worden door veel verschillende bacteriën geproduceerd inclusief aerobe Gram-positieve en Gram-negatieve species en anaerobe species. β -lactamase zijn gevonden in het periplasma van de Gram-negatieve species. Periplasma is de ruimte tussen de celwand en de buitenste celmembraan (zie figuur 2). Bij Gram-positieve bacteriën worden de β -lactamase uitgescheiden, deze missen de buitenmembraan. De gecodeerde genen kunnen op het chromosoom of op het plasmide liggen. [7]



Figuur 2: Gram-negatieve bacterie

1.2 Resistentie

Resistentie tegen antibiotica kan ontstaan zijn door de opname van mobiele DNA elementen, zoals plasmiden of transposons of door mutaties in het chromosoom van de bacterie. Plasmiden zijn kleine zelfstandig replicerende DNA moleculen. Plasmide moleculen zijn voor een cel niet van vitaal belang. Ze kunnen echter wel een bonte verzameling aan biologische eigenschappen bezitten.

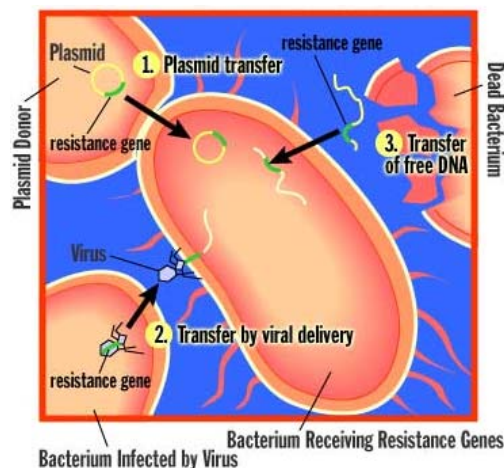
Plasmiden kunnen overgedragen worden via (zie figuur 3):

- Transformatie, opname van een plasmide-DNA-molecuul;
- Conjugatie, overdracht door cel-cel contact waardoor in de donorcel een kopie van het plasmide blijft;
- Transductie, plasmide DNA wordt via een faag overgebracht naar een andere bacterie van dezelfde soort.

Mutaties in het chromosoom zijn in tegenstelling tot de plasmiden niet overdraagbaar. De genen die coderen voor β -lactamase kunnen ook op de plasmiden liggen. Hierdoor kunnen ze zich gemakkelijk verspreiden. Er zijn grote aantallen plasmiden die coderen voor zogenaamde smal-spectrum β -lactamase en cefalosporinase. De bekendste zijn de TEM- en SHV-plasmiden. Hierbij is dus sprake van een overdraagbare vorm van resistentie. [1, 8]

Er zijn drie mechanismen die resistentie kunnen veroorzaken bij β -lactam antibiotica [7, 9]:

- 1) Een verandering in het penicilline bindend eiwit die het aangrijpingspunt zijn voor de antibiotica via aminozuur substitutie.
- 2) Een verandering in de eiwitten van de buitenste cellaag kan ervoor zorgen dat de membraan permeabiliteit afneemt. Dit voorkomt antibiotica passage naar de cel.
- 3) De productie van een inactiverend enzym, zoals β -lactamase, die antibiotica inactiveren door het hydrolyseren van de β -lactam ring. Dit is van klinisch belang voor de Gram-negatieven zoals *E. cloacae*, *E.coli* en *K. pneumoniae*



Figuur 3: Overdracht van antibiotica resistentiegenen via conjugatie, transductie en transformatie

1.3 ESBL

De afkorting “ESBL” staat voor Extended Spectrum β -lactamase. Dit is een enzym dat bepaalde antibiotica (penicillinen, eerste-, tweede- en derdegeneratie cefalosporinen en aztreonam) kan hydrolyseren. Deze Extended- Spectrum β -lactamase worden geremd door β -lactamase inhibitors zoals clavulaanzuur. De ESBL enzymen, er zijn verschillende typen, worden geproduceerd door bacteriën die van oorsprong in de darm voorkomen [10, 11]. Over het algemeen kunnen ESBL's geen carbapenem of cefamycine hydrolyseren, hoewel er wel ESBL varianten gevonden zijn met carbapenemase activiteit. Gelukkig zijn deze nog erg zeldzaam. ESBL's zijn meestal gecodeerd op grote plasmiden, tot 100 kb en soms wel meer. Deze plasmiden zijn overdraagbaar tussen verschillende bacteriestammen. Hoewel ESBL's voornamelijk zijn aangetoond in *Klebsiella* spp. en *E. coli*, worden ze in toenemende mate aangetroffen in andere *Enterbacteriaceae* zoals *Enterobacter* en *Salmonella* spp. en af en toe ook in non-fermentors zoals *P. aeruginosa* en *B. cepacia*. [3, 12]

1.4 Typen ESBL

Er zijn verschillende typen ESBL, zoals TEM en SHV. De meeste ESBL's zijn afgeleid van de TEM- of SHV-enzymen. TEM-1, TEM-2 en SHV-1 zijn geen ESBL's. Ze zijn wel resistent tegen ampicilline, amoxicilline en andere penicillines en ook tegen vroege generatie cefalosporinen. Van deze beide groepen enzymen kunnen aminozuur substituties op specifieke plaatsen in het gen plaatsvinden. Deze substituties veroorzaken dat de andere TEM en SHV varianten wél derde generatie cefalosporinen en aztreonam kunnen hydrolyseren. Er zijn nog meer soorten ESBL's zoals CTX-M, OXA, PER, VEB, CME, TLA, SFO en GES. Deze zijn niet gerelateerd aan SHV en TEM. In de volgende paragrafen worden de groepen beschreven die in dit onderzoek van belang zijn. [3, 4, 11]

1.4.1 TEM

TEM-1 was de eerste plasmide gemedieerde β -lactamasen en is voor het eerst beschreven in 1965. Deze kwam van een *E. coli* isolaat van een klein meisje uit Athene, Griekenland. De naam van dit patiëntje is Temoneira, hier heeft het enzym zijn naam 'TEM' aan te danken. TEM-2, de eerste derivaat van TEM-1, verschilt één enkel aminozuur met TEM-1. TEM-1 en TEM-2 zijn geen ESBL's maar zijn β -lactamasen die niet instaat zijn de extended-spectrum cefalosporinen aan te vallen. TEM-1 is daarvan de meest voorkomende beta-lactamase in Gram-negatieve bacteriën en is wereldwijd verantwoordelijk voor 90% van de ampicilline resistentie in *E. coli*. TEM-3 is de eerst volgende in het rijtje en is wel een ESBL, maar niet de eerste die ontdekt is. De eerste TEM-type ESBL werd geïsoleerd in Liverpool Engeland, in 1982. De stam werd geïsoleerd uit een *K. oxytoca* producerende TEM-1 uitbraak op een neonatale intensive care unit. De patiënt werd behandeld met ceftazidime. Vervolgens werden, van dezelfde afdeling, *K. oxytoca* stammen gevonden die TEM-type ESBL bevatten. Deze wordt nu TEM-12 genoemd. Inmiddels zijn er 160 TEM-type β -lactamasen beschreven. TEM type β -lactamasen komen het meest voor in *E. coli* en in *K. pneumoniae*. [3, 7, 11, 12]

1.4.2 SHV

SHV dankt zijn naam aan sulfhydryl variable. Deze benoeming werd gebruikt, omdat men dacht dat de remming van SHV activiteit door p-chloromercuribenzoate substraat gerelateerd was én variabel, afhankelijk van het substraat dat gebruikt werd voor de analyse. Deze activiteit is in latere studies nooit bevestigd. SHV-1 β -lactamase wordt het meest gevonden in *K. pneumoniae*. Het SHV-1 gen, of een gerelateerd gen, is geïntegreerd in het bacteriële chromosoom. Hieruit blijkt dat het gen voor SHV-1 β -lactamase evolueerde als een chromosomaal gen in *Klebsiella* en dat het later werd opgenomen in een plasmide waardoor het zich verspreidde naar andere bacterie species. SHV-1 is verantwoordelijk voor meer dan 20% van de plasmide gemedieerde ampicilline resistentie in *K. pneumoniae*. SHV-1 is net als TEM-1 en TEM-2 geen ESBL, maar een β -lactamase dat resistentie veroorzaakt tegen ampicilline. De eerste SHV-type ESBL werd ontdekt in Duitsland in 1983 in een *K. ozaenae* stam die een β -lactamase bezat. Deze stam was niet alleen resistent tegen penicilline, maar ook tegen cefotaxime en ceftazidime. Na sequensen bleek dat deze β -lactamase één aminozuur verschilde met SHV-1. Door deze mutatie werd het een ESBL en deze heet nu SHV-2. SHV-type ESBL's worden in grote mate gedetecteerd in *Enterobacteriaceae*. Ze worden ook gezien in *P. aeruginosa* en *Acinobacter* spp. [3, 11, 12]

1.4.3 CTX-M

De naam CTX-M verwijst naar de hydrolytische activiteit van deze enzymen tegen cefotaxim. Cefepime wordt door CTX-M ook met grote efficiëntie gehydrolyseerd. Ze zijn vaak wel gevoelig voor ceftazidim. In Duitsland werd in 1989 een cefotaxime resistente *E. coli* stam gevonden, deze produceerde een ESBL die geen TEM of SHV was. Deze kreeg de naam CTX-M-1. Vervolgens werden er andere CTX-M varianten ontdekt. CTX-M is meer divers dan de SHV en TEM familie. Onderling kunnen de CTX-M stammen tot 20% verschillen in hun aminozuursequenties. De CTX-M enzymen kunnen worden onderverdeeld in vijf groepen, gebaseerd op aminozuur homogeniteit (zie tabel 1). Op dit moment bestaan er 67 verschillende CTX-M varianten, alle varianten zijn een ESBL. Het CTX-M gen blijkt ook van nature chromosomaal voor te komen in verschillende *Kluyvera* species. CTX-M genen komen meestal voor op plasmiden die variëren in grootte van 7 kb tot 160 kb. Het TEM-1 gen komt vaak op hetzelfde plasmide voor als CTX-M waarbij ook associaties met TEM-2, OXA-1, SHV en AmpC genen mogelijk zijn. Deze plasmiden kunnen ook resistentiegenen tegen andere antibiotica bezitten. Het is mogelijk dat CTX-M genen worden overgedragen tussen plasmiden en van plasmiden naar chromosomen. CTX-M komt vooral voor in de familie van de *Enterobacteriaceae*. [3, 13]

Tabel 1: Indeling van de CTX-M varianten in de groepen I t/m V

Groep I	CTX-M-1, CTX-M-3, CTX-M-10, CTX-M-11, CTX-M-12, CTX-M-15, CTX-M-22, CTX-M-23, CTX-M-28, CTX-M-29, CTX-M-30, CTX-M-32, CTX-M-33, CTX-M-34, CTX-M-36, CTX-M-37, CTX-M-38, CTX-M-42, CTX-M-52, CTX-M-53, CTX-M-55, CTX-M-57, CTX-M-58, CTX-M-60, CTX-M-61
Groep II	CTX-M-2, CTX-M-4, CTX-M-5, CTX-M-6, CTX-M-7, CTX-M-20, CTX-M-31, CTX-M-35, CTX-M-43, CTX-M-44, CTX-M-54, CTX-M-56
Groep III	CTX-M-8, CTX-M-40, CTX-M-63
Groep IV	CTX-M-9, CTX-M-13, CTX-M-14, CTX-M-16, CTX-M-17, CTX-M-18, CTX-M-19, CTX-M-21, CTX-M-24, CTX-M-27, CTX-M-45, CTX-M-46, CTX-M-47, CTX-M-48, CTX-M-49, CTX-M-50, CTX-M-51, CTX-M-65
Groep V	CTX-M-25, CTX-M-26, CTX-M-39, CTX-M-41

1.4.4 *QnrA*

Quinolonen zijn een groep breedspectrum antibiotica die verwant zijn aan nalidixinezuur. Quinolonen remmen het bacteriële DNA-gyrase, in Gram-negatieve bacteriën. Of het topoïsomerase IV, in Gram-positieve bacteriën. Hierdoor komt de DNA-replicatie in het gedrang. Ze werden in 1962 geïntroduceerd en werkten op dat moment tegen de meeste *Enterobacteriaceae*. Quinolonen resistentie wordt hoofdzakelijk veroorzaakt door mutaties in het chromosoom van de *Enterobacteriaceae*, maar resistentie als gevolg van een *qnr* plasmide komt ook voor. Het eerste plasmide-gemedieerde quinolonen resistentie eiwit (*qnr*) werd gevonden in een urine in een *K. pneumoniae* isolaat in Birmingham, USA in 1994. Later werd dit *qnrA* genoemd. Eind 2002 is er een uitbraak geweest van *E. cloacae* die een plasmide bezat waarop onder andere CTX-M-9 voorkwam, samen met andere resistentie genen. Deze uitbraak was in het Universitair Medisch Centrum in Utrecht. Op dit plasmide zat het resistentie gen *qnrA1*. Het *qnrA1* eiwit beschermt het DNA gyrase en topoïsomerase IV voor de remmende activiteit van fluorquinolonen. In het St. Antonius Ziekenhuis zijn ook stammen gevonden met het *qnrA* gen. Om die reden worden de stammen tegelijk op ESBL resistentie en *qnrA* resistentie getest. [14, 15, 16]

1.5 Detectiemethoden op het laboratorium van het St. Antonius ziekenhuis

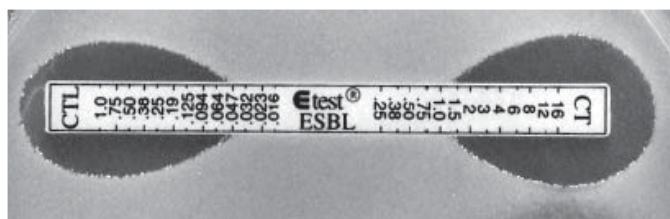
In het St. Antonius ziekenhuis worden de patiënten op de intensive care unit elke week gescreend op ESBL. Elke maandag wordt er een wattenstok (stuart medium) afgenomen van de keel en het perineum. Dit wordt beënt op een BLSE plaat en een Tobramycine plaat. De BLSE plaat wordt na 24 uur afgelezen. Wanneer deze verdachte kolonies vertoont, wordt er een reinkweek van deze kolonies gemaakt. Op woensdag wordt er van deze reinkweek een identificatietest ingezet met behulp van de Vitek. Wanneer de Vitek een melding maakt van een mogelijke ESBL positieve stam, wordt er op donderdag een E-test ingezet. Deze test wordt op vrijdag afgelezen. Op donderdag, drie dagen na het afnemen van de wattenstok, is bekend wanneer een patiënt een ESBL positieve stam bij zich draagt. De patiënt kan drie dagen lang de verkeerde antibiotica hebben gekregen, of andere patiënten hebben geïnfecteerd. Om deze reden wordt er op dinsdag de door Lydia Kool (stagiaire MMI St. Antonius Ziekenhuis 2007) ontwikkelde PCR ingezet van de verdachte kolonies van de BLSE plaat. [17]

1.5.1 E-test

Deze test bestaat uit een plastic met antibiotica geïmpregneerde strip (AB Biodisk, Solna, Zweden), met aflopende concentratie antibiotica. Voor het bepalen van een ESBL worden drie verschillende antibiotica strips gebruikt:

- Een strip met ceftazidim en ceftazidim + clavulaanzuur;
- een strip met cefotaxim en cefotaxim + clavulaanzuur;
- een strip met cefepime en cefepime + clavulaanzuur.

Deze strips worden op een met een te testen stam beënte voedingsbodem gelegd en geïncubeerd bij 35°C. De aanwezigheid van ESBL wordt aangetoond door de MIC (Minimale Inhiberende Concentratie) van het antibioticum te delen op de MIC van het antibioticum + clavulaanzuur. Wanneer één van de drie strips een ratio geeft die groter is dan 8,0 dan beschikt de stam over een ESBL (zie figuur 4).



Figuur 4: Deze E-test is ESBL positief

1.5.2 Vitek

De Vitek is een geautomatiseerd identificatiesysteem. De Vitek wordt gebruikt voor de identificatie en resistentie bepaling van Gram-negatieve en Gram-positieve bacteriën. Om de bacterie te kunnen identificeren wordt er een bacteriesuspensie en een “kaart” in de Vitek gezet. In deze kaart zitten verschillende resistentiebepalingen. Zodra de bacteriesuspensie in de kaart komt, lost deze erin op. Het aflezen van de kaart gebeurt door middel van optische fluorescentie en de lichtdoorlaatbaarheid. De Vitek meet indirect de groei door bij het inzetten de lichtdoorlaatbaarheid te meten. Elke 15 minuten wordt de lichtdoorlaatbaarheid opnieuw gemeten en zo wordt er bijgehouden of deze significant vermindert. Wanneer de lichtdoorlaatbaarheid verminderd is, is het micro-organisme in staat te groeien in het cupje onder de specifieke omstandigheden.

1.5.3 PCR (oude methode)

De multiplex PCR voor CTX-M, TEM, SHV en *qnrA* is ontwikkeld door Lydia Kool en wordt gebruikt om eerder uitspraak te kunnen doen over de aan- of afwezigheid van een ESBL bij Intensive Care patiënten. De methode van Lydia Kool is in dit onderzoek ook gebruikt voor het bepalen van de ESBL genen voor de epidemiologie. De PCR is een methode om kleine hoeveelheden van een specifiek stukje DNA een groot aantal keer te verdubbelen (amplificeren). Deze methode wordt gebruikt, omdat voor het analyseren van het DNA, meer materiaal nodig is dan dat er geïsoleerd kan worden. De PCR is bedacht in 1983 door Kary Mullis, hij won hiermee in 1993 de Nobelprijs voor scheikunde. De reactie bestaat uit 3 stappen. In de eerste stap (denaturatie) wordt de dubbele helix gescheiden door het monster te verwarmen tot 94°C. De ontstane enkelstrengs ketens dienen als mal. Het monster wordt afgekoeld naar 55°C tijdens de tweede stap (hybridisatie). De primers binden aan het enkelstrengs DNA wanneer de onbekende sequentie overeenkomt met de primersequentie. In de derde stap (elongatie) wordt de temperatuur verhoogd naar 72°C, de optimum temperatuur voor Taq polymerase. De polymerase voegt de dNTP's die complementair zijn aan de template toe in 5' => 3' richting. In de volgende cyclus wordt het DNA opnieuw verhit en afgekoeld, waardoor de nieuwe dubbele strengen gescheiden worden en elk afzonderlijk gekopieerd worden door het Taq DNA polymerase. In elke cyclus wordt het aantal strengen van het gewenste stuk DNA verdubbeld. Deze drie stappen worden 25 keer herhaald. Na de laatste PCR-cyclus wordt er een lange elongatiestap uitgevoerd (7 min. bij 72°C), die ervoor zorgt dat alle geamplificeerde PCR-producten volledig geëlongeerd worden. [18, 19, 20]

Het DNA wordt zichtbaar gemaakt met behulp van gelelektroforese. Door de gel te kleuren met Ethidiumbromide worden de ontstane PCR producten zichtbaar onder UV licht.

1.6 Epidemiologie

ESBL's zijn een groeiend probleem wereldwijd, vooral voor ziekenhuispatiënten. De resistentie tegen β -lactam antibiotica is al ontstaan voordat het eerste β -lactam antibioticum (penicilline) werd geïntroduceerd. Vele studies zijn gepubliceerd over de epidemiologie van nosocomiale infecties met ESBL producerende bacteriën. ESBL producerende bacteriën zijn voor het eerst in Europa gevonden, waarschijnlijk omdat de extended-spectrum cefalosporinen als eerst in Europa gebruikt werden. De eerste grote uitbraak in Europa was in Frankrijk in 1986. 54 patiënten in drie intensive care units waren geïnfecteerd met ESBL producerende bacteriën. Deze infectie spreidde zich in korte tijd uit over vier andere afdelingen. In 1990 waren 25-35% van de nosocomiaal verkregen *K. pneumoniae* isolaten in Frankrijk ESBL positief. In 2000 was de prevalentie in Noord Frankrijk gedaald naar 7,9% als gevolg van de goede infectie controle. In 2004 is er een studie geweest naar het voorkomen van ESBL in Nederland. Gedurende één week zijn er 360 Gram-negatieve staven van vijf verschillende Amsterdamse ziekenhuizen (Academisch Medisch Centrum, Vrije Universiteit Medisch Centrum, Onze Lieve Vrouwen Gasthuis, Slotervaart Ziekenhuis, Sint Lucas Andreas Ziekenhuis) verzameld en getest op ESBL. Eén isolaat per species per patiënt is meegenomen in deze studie. De ESBL positieve isolaten zijn getest op aanwezigheid van SHV, TEM en CTX-M. Hiervan waren in totaal 28 isolaten positief voor ESBL (7,8%); waarvan achttien isolaten positief waren voor CTX-M en tien isolaten positief voor SHV. Geen enkel isolaat was positief bevonden voor TEM. Dit onderzoek toonde aan dat de prevalentie van ESBL producerende Gram-negatieve organismen in de hierboven genoemde ziekenhuizen in Amsterdam in 2004 onder de tien procent was. Dit was veel hoger dan de prevalentie van een nationaal onderzoek in 1997. Aan het onderzoek in 1997 deden acht universiteits ziekenhuizen mee (inclusief het AMC dat ook meedeed aan het onderzoek in 2004) en drie grotere regionale laboratoria. Het onderzoek in 1997 toonde aan dat de prevalentie van ESBL producerende *E. coli* en *Klebsiella species* kleiner was dan één procent. [3, 11, 21]

1.6.1 Maatregelen bij een infectie

Het voorkomen en terugdringen van ESBL infecties is van groot belang. Door het bepalen van de epidemiologie wordt zichtbaar hoe een positieve ESBL bacteriestam zich verspreidt in het ziekenhuis. Door zoveel mogelijk te weten te komen over de verspreiding kunnen er maatregelen getroffen worden om de verspreiding terug te dringen. Een ziekenhuishygiënist speelt hierin een grote rol. Een ziekenhuishygiënist verzamelt gegevens over de infectie en de genomen maatregelen en doet daar onderzoek naar. Een ziekenhuishygiënist adviseert de afdelingen met betrekking tot de preventie. Medewerkers van de betrokken afdelingen worden geadviseerd over de maatregelen om ESBL infecties bij patiënten te voorkomen en om zichzelf te beschermen.

Wanneer een patiënt positief wordt bevonden voor een ESBL positieve bacterie, worden er contactislatie maatregelen genomen. Deze contactislatie maatregelen houden in dat verpleegkundigen, artsen en andere medewerkers van het ziekenhuis bij de verzorging van de patiënt handschoenen dragen en soms ook een schort. De patiënt wordt op een éénpersoonskamer verpleegd om contacten met andere patiënten op de afdeling te beperken. Tevens wordt de patiënt behandeld met antibiotica. De isolatiemaatregelen worden pas gestopt, als na het stoppen met antibiotica, er van minimaal twee afgenomen kweken geen desbetreffende bacteriën meer worden gekweekt.

1.7 Doel

Het doel van dit onderzoek is om de epidemiologie van de ESBL producerende organismen te bepalen in het St. Antonius Ziekenhuis. ESBL's zijn een groeiend probleem wereldwijd. En ook in het St. Antonius Ziekenhuis komt het steeds vaker voor dat er een ESBL gevonden wordt. Lydia Kool heeft in haar onderzoek in het St. Antonius Ziekenhuis een multiplex PCR opgezet zodat het plasmide waarop het ESBL gen zich bevindt gedetecteerd kan worden. De multiplex PCR is een tijdrovende methode. Uit het onderzoek van Lydia Kool blijkt dat op dit moment CTX-M het meest voorkomt. Hiervoor heeft ze 48 unieke stammen van de ic-screening getest die op microbiologische wijze op ESBL zijn getest. Hiervan kwam CTX-M het meest voor (59%) gevolgd door TEM (30%) en daarna SHV (11%). Door verder te gaan met Lydia Kool haar onderzoek wordt nu gekeken naar het voorkomen van ESBL in de afgelopen vijf jaar. Dit epidemiologische onderzoek geeft inzicht in de verspreiding en het groeiende probleem van de ESBL in het St. Antonius Ziekenhuis en laat zien of het nodig is om een real time PCR op te zetten. De bacteriën die we hiervoor gebruikten in dit onderzoek waren *E. coli*, *K. pneumoniae* en de *E. cloacae* omdat uitsluitend deze stammen positief werden bevonden op ESBL in het onderzoek van Lydia Kool. Met het opzetten van de real time PCR wordt begonnen met het CTX-M gen, omdat die het meest voorkomt. Wanneer er nog tijd over is, wordt *qnrA* hier aan toegevoegd. [17]

2 Materiaal en methoden epidemiologie

2.1 E-testen

Voor het bepalen van de epidemiologie werd vanaf 2002 gekeken naar de drie bacteriën waarin de ESBL in het St. Antonius Ziekenhuis het meest voorkomt. Dat zijn *E. coli*, *E. cloacae* en *K. pneumoniae*. Van deze drie bacteriën werd vanaf 2002 een database gemaakt (ESBL database) in Excel zodat er mee gerekend kan worden en zodat er grafieken gemaakt kunnen worden. Ook is er een database gemaakt van de 4419 E-testen. De MIC waarden van deze E-testen staan in de database, maar de ratio van deze MIC waarden niet zodat niet in één keer bekeken kon worden of een stam ESBL positief is. Deze waarden werden eerst berekend. Helaas stonden deze MIC waarden als commentaar in één cel zodat ze niet met Excel berekend konden worden (zie tabel 2). Ze moesten met de rekenmachine uitgerekend worden.

Tabel 2: Voorbeeld tabel E-testen

labnummer	labcode	Commentaar 1	Commentaar 2	ESBL
B0000001	ESBL1	MIC TZ:>32 TZL:>4 ;MIC PM:0,25 PML:0,19	MIC CT:12 CTL:>1,0	0
B0000002	ESBL1	MIC TZ: 24 TZL: 0,19 ;MIC PM: >16 PML: <0,064	MIC CT: 0,25 CTL: 0,094	1

De berekening staat uitgelegd in paragraaf 1.5.1. Wanneer één ratio waarde groter is dan 8 dan heeft de bacteriestam een ESBL. De waarden in de noemer moeten gelijk zijn aan, of groter zijn dan 0,50. Wanneer de waarde kleiner is dan 0,50 mag met de waarde niet gerekend worden. Als de waarden in alle noemers kleiner zijn dan 0,50 wordt de uitslag van de E-test als negatief beschouwd.

De resultaten van deze E-test zijn met een zoek en plaats functie automatisch naar Excel databases van de drie bacteriën getransporteerd.

2.2 REVCO database

Alle positieve ESBL bacterie stammen op de medische microbiologie worden volgens een protocol opgeslagen in -80°C vriezers. Hier is een database van gemaakt die de "REVCO" database heet. Van deze database zijn de ESBL positieven er uitgefilterd. Hiervan is de door Lydia Kool ontwikkelde PCR gedaan, waarvan er één bacteriestam per patiënt is getest. Ook deze resultaten zijn in de ESBL database gezet.

2.3 ESBL database

2.3.1 Onderscheid is belangrijk voor het onderzoek

Om de epidemiologie te bepalen zijn een paar gegevens belangrijk. Deze gegevens moesten zichtbaar gemaakt worden in de ESBL database. Van alle patiënten die meegenomen worden in het bepalen van de epidemiologie, moest bepaald worden of de patiënt klinisch was getest op een ESBL of dat het afgenomen monster was meegenomen in de screening. Voor de screening wordt er een wattenstok afgenomen van de keel, neus of het perineum.

Wanneer een patiënt klinisch wordt getest op een ESBL, wordt dat beschouwd als een toevallige bevinding als het resultaat positief is. In een screeningsmonster wordt bewust gezocht naar ESBL positieven en zullen er meer positieve ESBL's gevonden worden. Dit kan

de echte epidemiologische conclusie beïnvloeden. Een patiënt wordt als een klinische patiënt beschouwt wanneer het eerste materiaal wat afgenomen is geen neus, keel of perineum monster is. Omdat de database uit ongeveer 20.000 records bestaat, zijn er in Excel formules gemaakt (zie bijlage 1), die ervoor zorgen dat het aantal positieve klinische- en screeningspatiënten kan worden bepaald. De database is gesorteerd op patiëntnummer en daarbinnen op de datum dat een monster is afgenomen. Dit is belangrijk voor het opstellen van de formules.

2.3.2 Klinisch- of screeningsmateriaal

De eerste stap is het bepalen of een monster klinisch materiaal is of dat het bij de screening hoort. Dit kan simpelweg gedaan worden met een “als” functie die “ééntjes” zet bij keel, neus en perineum en “nulletjes” bij de overige monsters (zie figuur 5).

labnummer	patientnr	afname datum	jaar	Revco hulp kolom	Revco	MATERIAAL			ESBL POSITIEF				
						materiaal	Klin	screening	vriezer hulp kolom	In vriezer	E-test hulp kolom	E-test	Totaal pos
B383905	AA 190205	27-dec-05	2005	#N/B		BRO	1	0	#N/B	0	#N/B	0	0
B297207	AAM040801	16-aug-04	2004	#N/B		KEE	0	1	#N/B	0	#N/B	0	0
B457373	AAN161218	23-jan-07	2007	#N/B		SPU	1	0	#N/B	0	#N/B	0	0
B460298	AAR340718	08-feb-07	2007	#N/B		BRO	1	0	#N/B	0	#N/B	0	0
B460782	AAR340718	10-feb-07	2007	#N/B		SPU	1	0	#N/B	0	#N/B	0	0
B461688	AAR340718	15-feb-07	2007	#N/B		BRO	1	0	#N/B	0	#N/B	0	0
B420204	ACH330426	15-jul-06											
B420203	ACH330426	15-jul-06	2006	#N/B		BLO	1	0	#N/B	0	#N/B	0	0
B405927	ADI451027	02-mei-06	2006	#N/B		BRO	1	0	#N/B	0	#N/B	0	0

Figuur 5: Screenshot materiaal ESBL database

2.3.3 Positief monster

De volgende berekening geeft aan of een monster positief is. Daarbij is er een “vriezer” kolom waarvan de positieve resultaten uit de “REVCO” database komen. Een E-test kolom waarvan de positieve resultaten uit E-test database komen. En een CTX-M kolom waarvan de resultaten van de PCR komen die gedaan is op screeningspatiënten en patiëntenmateriaal die zijn opgeslagen in de vriezer (zie figuur 6). Indien één van deze drie kolommen positief is, is het monster positief. Van de PCR resultaten kan er alleen gekeken worden naar monsters die positief zijn voor CTX-M. Wanneer een monster positief is voor SHV of TEM bestaat er een mogelijkheid dat dit geen ESBL is omdat SHV-1, TEM-1 en TEM-2 geen ESBL's zijn.

Revco	MATERIAAL			ESBL POSITIEF						
	materiaal	Klin	screening	vriezer hulp kolom	In vriezer	E-test hulp kolom	E-test	Totaal pos	CTX-M (542bp)	CTX-M (542bp) kopie
	BRO	1	0	#N/B	0	#N/B	0	0	#N/B	0
	KEE	0	1	#N/B	0	#N/B	0	0	#N/B	0
	SPU	1	0	#N/B	0	#N/B	0	0	#N/B	0
	BRO	1	0	#N/B	0	#N/B	0	0	#N/B	0
BN166	BLO	1	0	0	0	#N/B	0	0	#N/B	0
	BLO	1	0	#N/B	0	#N/B	0	0	#N/B	0
	BRO	1	0	#N/B	0	#N/B	0	0	#N/B	0
	BRO	1	0	#N/B	0	#N/B	0	0	#N/B	0
	BRO	1	0	#N/B	0	#N/B	0	0	#N/B	0

Figuur 6: Screenshot positieve monsters ESBL database

2.3.4 Positieve patiënt

Het bepalen van een positieve patiënt vergt een paar stappen. Zoals eerder is aangegeven, is de database gesorteerd op patiëntnummer en daarbinnen op de datum dat een monster is afgenomen. Dit laatste is van belang om vast te kunnen stellen of het eerste positieve resultaat een klinisch- of een screeningsmonster is. De eerste keer dat een patiëntnummer voorkomt, wordt dit met een kenmerk, met een ééntje, aangegeven (zie figuur 7). Hiermee wordt bepaald welk materiaal bij dezelfde patiënt hoort en wordt tevens het aantal patiënten bepaald. Daarna wordt gekeken of het eerste monster van een patiënt een keel, neus of perineum monster is, dan is het namelijk een screeningspatiënt. In het andere geval betreft het een klinische patiënt.

ESBL POSITIEF				PATIENTEN						
In vriezer	E-test hulp kolom	E-test	Totaal pos	Totaal patiënt en	eerste pos resultaat van patiënt	Klinische patiënt	screenings patiënt	CTX-M (542bp)	CTX-M (542bp) kopie	SHV (335bp)
0	#N/B	0	0	1	0	0	0	#N/B	0	#N/B
0	#N/B	0	0	1	0	0	0	#N/B	0	#N/B
1	1	=ALS(B4=B3;0;1)			1	1	=ALS(P4=1;P4*I4;0)			0
0	0				2	0				#N/B
0	0				4	0				#N/B
0	0	=ALS(B4=B3;P3*2+N4;N4)					=ALS(P4=1;P4*H4;0)			1
1	0				13	0				#N/B
0	0				38	0				#N/B
1	1	1	1	0	77	0	0	#N/B	0	#N/B
1	1	1	1	0	155	0	0	#N/B	0	#N/B
0	#N/B	0	0	0	310	0	0	#N/B	0	#N/B
0	#N/B	0	0	0	620	0	0	#N/B	0	#N/B
0	#N/B	0	0	0	1240	0	0	#N/B	0	#N/B

Figuur 7: screenshot positieve patiënten ESBL database

3.2 Multiplex PCR

Multiplex PCR is een reactie waarin verschillende target sequenties gelijktijdig worden geamplificeerd, elk met zijn eigen primerset. Omdat er verschillende genen aangetoond moeten worden, worden er meerdere probes en primersets in één reactievaatje gebruikt. Dit scheelt veel tijd en geld. Het ontwikkelen van een multiplex PCR kan meer problemen opleveren dan het ontwikkelen van een gewone PCR. De reactie in multiplex is een zeer complexe reactie. Er is een grote kans op amplificatie van aspecifiek DNA. Humane contaminatiebronnen moeten daarom bijzonder goed uitgesloten worden. Verschillende factoren kunnen het resultaat van de multiplex analyse beïnvloeden. Bij het ontwikkelen van de primers moet bedacht worden dat de primers elkaar niet mogen verstoren en dat ze geen primer dimeren vormen. De Ct waarden van de amplicons moeten ongeveer bij elkaar in de buurt liggen, dit kan bereikt worden door het veranderen van de verschillende primer concentraties. De primers zijn gemiddeld iets groter dan bij een gewone PCR. [20, 23, 24]

3.3 StepOne™

Het StepOne™ real-Time PCR apparaat van Applied Biosystems is een nieuw nog niet geïmplementeerd PCR apparaat in het St. Antonius Ziekenhuis. De StepOne™ gaat gebruikt worden voor de multiplex PCR voor CTX-M en *qnrA*. Het PCR apparaat met vrouw-vriendelijke software is in staat om in 40 minuten een resultaat te geven met behulp van “The GeneAmp® Fast PCR MasterMix” van Applied Biosystems. Deze MasterMix bevat een “hot start” polymerase systeem dat ervoor zorgt dat de reactie pas begint wanneer deze is verwarmd tot 95°C. De meeste gevallen van mispriming blijken namelijk te ontstaan tijdens het opwarmen van de reactiemix voorafgaande aan de PCR. Het “hot start” polymerase systeem zorgt ervoor dat de enzymen geblokkeerd worden en pas actief worden wanneer deze een temperatuur van 95°C hebben bereikt.

3.4 Optimalisatie van de PCR

3.4.1 Primers en Probes

CTX-M bestaat uit vijf verschillende groepen en voor elke groep is er een andere primerset nodig. Ook voor *qnrA* is een andere probe en primerset nodig. De probes en primers voor CTX-M en *qnrA* worden ontwikkeld met het software programma “BioEdit Sequence Alignment Editor”. Er is gezocht naar een probe die kan volstaan voor alle vijf de CTX-M groepen. De alignments van alle CTX-M varianten zijn door Lydia Kool in het software programma “BioEdit Sequence Alignment Editor” gezet. Van de vijf CTX-M groepen zijn een paar varianten in het programma onder elkaar gezet. Er wordt gekeken naar een regio waar zich zo weinig mogelijk variatie bevindt tussen de vijf groepen. Daarbij past CTX-M groep IV perfect op de probe die uiteindelijk gekozen is, terwijl de andere CTX-M groepen één “g” nucleotide mismatch hebben. Een stuk sequentie om de probe heen wordt vanuit “BioEdit Sequence Alignment Editor” gekopieerd naar het software programma “Primer Express 2.0”. Daarin worden de primers door het programma zelf uitgekozen. De reverse primer voor CTX-M groep V is dezelfde als de reverse primer voor CTX-M groep III. Voor *qnrA* heeft het “Primer Express 2.0” zelf de probe en ook de primers geselecteerd. Na het selecteren van de primers moeten ze op de volgende eigenschappen getest worden:

- Er wordt gekeken of de primers geen loops vormen en of de smelttemperatuur overeenkomt, dit gebeurt met het programma “OLIGO.EXE”;
- Er wordt gekeken of de primers onderling geen primer dimeren vormen met het programma “AutoDimerv1.exe”;
- En er wordt gekeken of de primers specifiek zijn en niet overeenkomen met andere targets, dit gebeurt met het programma NCBI BLAST.
(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

De CTX-M probe krijgt een FAM label en de *qnrA* probe krijgt een VIC label. De verschillende genen krijgen verschillende labels zodat het PCR apparaat onderscheid kan maken tussen de verschillende genen.

Tabel 3: Primers voor multiplex PCR

Primer	Target	Sequentie
Primer 428 Forward	CTX-M groep I	GCT GGA CTG CCT GCT TCC T
Primer 429 Reverse	CTX-M groep I	CGT TGG TGG TGC CAT AGT CA
Primer 430 Forward	CTX-M groep II	TGC CGA AAT CAT GGG TAG TG
Primer 431 Reverse	CTX-M groep II	TCG TTG GTG GTG CCA TAA TCT
Primer 432 Forward	CTX-M groep III	CTA CCC ACA TCG TGG GTT GTC
Primer 433 Reverse	CTX-M groep III*	GAT GTC ATT CGT CGT ACC ATA ATC A
Primer 434 Forward	CTX-M groep IV	ATT CGG GCC GGC TTA CC
Primer 435 Reverse	CTX-M groep IV	ATC ATT GGT GGT GCC GTA GTC
Primer 436 Forward	CTX-M groep V	GCG ATA TCA TTC GTC GTA CCA TAA
Primer 437 Forward	<i>qnrA</i>	GCC GCT GCC GCT TTT A
Primer 438 Reverse	<i>qnrA</i>	AAT CCT CGA AAC TGG CAT C

* De reverse primer van CTX-M groep III is hetzelfde als de reverse primer van CTX-M groep V.

Tabel 4: Probes voor Multiplex PCR

Probe	Sequentie
Probe CTX-M	CCG CTG CCG GTC TTA TC
Probe <i>qnrA</i>	TCA GTG TGA CTT CAG C

Allereerst werden de primers en probes per set afzonderlijk van elkaar getest om te kijken of de primers en de probes het deden. De positieve stammen die hiervoor gebruikt waren, zijn te zien in bijlage 2. De voormix die hiervoor gebruikt werd is per primerset hetzelfde.

Tabel 5: Benodigdheden voormix

PCR oplossing	Fabrikant	Volume voor één reactie
Water	Sigma Aldrich	3,0
Forward primer	Isogen, Ijsselstein	2,0
Reverse primer	Isogen, Ijsselstein	2,0
probe	Isogen, Ijsselstein	0,2
BSA	Biolabs, Ipswich, Engeland	0,8
Mastermix	The GeneAmp® Fast PCR MasterMix, Applied Biosystems	10,0
Monster		2,0
Totaal		20,0

Wanneer de voormix gemaakt is, wordt dit vervolgens met 2,0 µl van de bekende stam in een 48 well optical reaction plate (Applied Biosystems) gepipetteerd. Als negatieve controle wordt er Sigma water gebruikt. De reaction plate wordt in de lade van de StepOne™ gelegd. Het PCR programma begint met één keer 20 seconden verwarmen op 95°C (hot start), vervolgens wordt er 40 cycli lang afgewisseld met één seconde op 95°C en 20 seconden op 60°C.

De volgende stap is het testen van de primers en probes in multiplex. Per reactie wordt een volume van 20 µl gebruikt. Omdat er zoveel primers en probes inzitten, wordt het volume van de primers aangepast. Hierdoor verandert de concentratie van de primers. Door verschillende primer concentraties te testen wordt de meest optimale primerconcentratie bepaald.

Tabel 6: Benodigdheden voormix multiplex

PCR oplossing	Volume voor één reactie
water	1,3
Primer 428 F	0,5
Primer 429 R	0,5
Primer 430 F	0,5
Primer 431 R	0,5
Primer 432 F	0,5
Primer 433 R	0,5
Primer 434 F	0,5
Primer 435 R	0,5
Primer 436 R	0,5
probe CTX-M	0,2
Primer 437 F	0,5
Primer 438 R	0,5
Probe <i>qnrA</i>	0,2
BSA	0,8
Mastermix	10,0
Monster	2,0
Totaal	20,0

3.5 Validatie van de PCR

De validatie van de PCR gebeurt volgens een standaard protocol [27] dat gebruikt wordt op het laboratorium van de Medische Microbiologie. Deze nieuwe PCR gaat géén oude methode vervangen. Deze PCR gaat gebruikt worden naast een bestaande methode die tevens de gouden standaard is (de E-test). Wel gaat deze nieuwe snellere PCR de PCR van Lydia Kool vervangen voor het testen van de kolonies die gevonden zijn tijdens de IC screening. Omdat de PCR van Lydia Kool niet als gouden standaard beschouwd wordt, wordt deze PCR beschouwd als een “eigen kwalitatieve methode”. In het protocol staat een overzicht van alle testen die gedaan moeten worden om de PCR te valideren. In de volgende paragrafen staat uitgelegd wat die testen inhouden en hoe ze uitgevoerd zijn. De testen worden onderverdeeld in een analytische validatie en een klinische validatie. Bij de analytische validatie gaat het om de validatie van de technische parameters. Bij de klinische validatie gaat het om de verificatie van de referentiewaarden binnen een relevante patiënten populatie. Voor het gemak wordt de PCR van Lydia Kool de “oude” PCR genoemd.

3.5.1 Juistheid (analytische validatie)

De juistheid geeft informatie over een systemische afwijking van een methode. En wordt in dit geval bepaald door de vergelijking met een referentie methode. De juistheid wordt bepaald door het testen van 22 monsters volgens de oude methode in vergelijking met de nieuwe methode. Omdat het hierbij gaat om het aantonen van de ESBL groepen wordt als oude methode de oude PCR gebruikt en niet de E-test die alleen aantoont of een monster positief of negatief is voor ESBL. De 22 monsters die worden gebruikt voor het bepalen van de juistheid zijn de stammen die ook gebruikt zijn voor het testen van de oude PCR. Dit zijn *E. coli*, *K. pneumoniae* en *E. cloacae* stammen. Deze stammen dienen in de real-time PCR dezelfde uitslagen voor CTX-M groep I t/m V en *qnrA* te geven als de gewone PCR.

3.5.2 Selectiviteit (analytische validatie)

De selectiviteit geeft duidelijkheid over het onderscheid dat gemaakt kan worden tussen de te bepalen componenten en niet relevante componenten. Deze methode overlapt de methode voor het bepalen van de juistheid. Dezelfde 22 stammen die gebruikt zijn voor het testen van de juistheid worden ook gebruikt voor het testen van de selectiviteit. Deze 22 stammen dienen positief te zijn voor CTX-M groep I t/m V en *qnrA* in de nieuwe PCR. En 15 negatieve ESBL stammen, die negatief zijn getest in de E-test, dienen ook negatief te zijn in de nieuwe PCR.

3.5.3 Detectiegrens (analytische validatie)

De detectiegrens is de laagste betrouwbaar te meten concentratie die met de juiste precisie en juistheid kan worden geïnterpreteerd. Bij deze real time PCR gaat het om het aantonen van de aan- of afwezigheid van een gen. De ondergrens waarmee enkele kopieën aangetoond kunnen worden, is bij deze real time PCR niet van belang. Voor elke CTX-M groep en voor *qnrA* worden er van bacteriekolonies verdunningsreeksen gemaakt in een range van 5×10^0 t/m 5×10^{10} . Van deze verdunningen werd 2 µl getest in de real time PCR en 2 µl uitgespateld op bloed-agar-platen.

3.5.4 Robuustheid (analytische validatie)

Is de gevoeligheid, van de methode, voor variaties in omstandigheden bij de uitvoering. Deze externe factoren kunnen de resultaten beïnvloeden.

3.5.5 Sensitiviteit (klinische validatie)

De sensitiviteit geeft informatie over de fout negatieven. Er wordt gekeken naar het percentage terecht positieve monsters. Van 50 bacteriestammen wordt een real time PCR ingezet waarvan ook een E-test (gouden standaard) is gedaan. Deze stammen dienen in de real time PCR hetzelfde resultaat te geven. De E-test geeft aan wanneer iets een ESBL positieve stam is of niet, deze real time PCR geeft alleen aan of een stam CTX-M groep I t/m V of *qnrA* gen bevat.

3.5.6 Specificiteit (klinische validatie)

De specificiteit geeft informatie over de fout positieven. Er wordt gekeken naar het percentage terecht negatieve monsters. Voor het testen van de specificiteit wordt dezelfde test gedaan met dezelfde bacteriestammen als bij de sensitiviteit

4 Resultaten epidemiologie

4.1 Klinische patiënten en screeningspatiënten

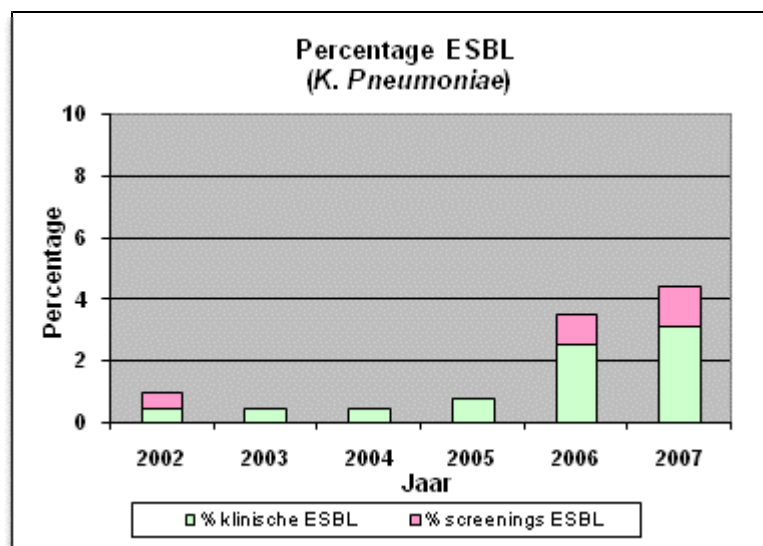
Het bepalen van de epidemiologie wordt opgedeeld in klinische patiënten en screeningspatiënten. Wanneer er bewust wordt gezocht naar ESBL positieve bacteriën dan zullen er altijd meer ESBL positieve bacteriën gevonden worden. Een epidemiologische curve wordt zo “puur” mogelijk gehouden door alleen van de toevallige bevindingen een curve te maken (klinische patiënten). Alleen op het moment dat er gescreend wordt op ESBL zullen er minder toevallige bevindingen zijn. De echte curve zal hierdoor meer in het midden komen te liggen.

4.2 Epidemiologie

4.2.1 *K. pneumoniae*

Met behulp van een draaitabel zijn de gegevens van de database verwerkt.

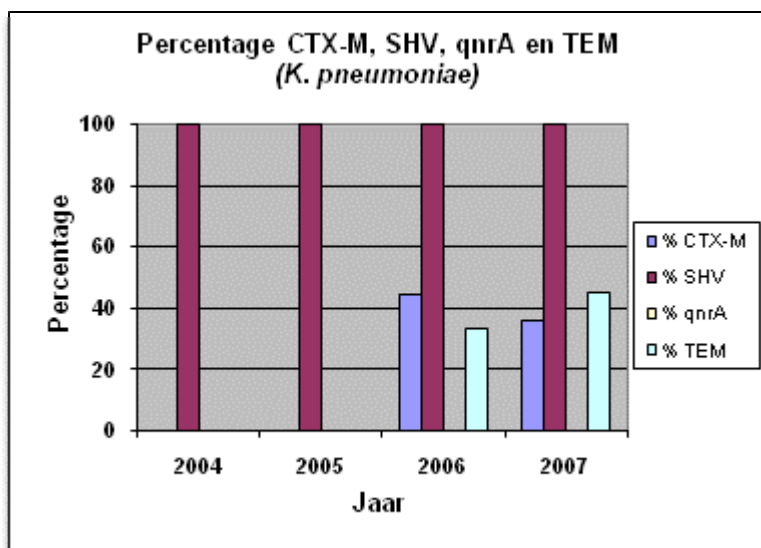
Van 2002 t/m september 2007 zijn in totaal 1388 patiënten geïnfecteerd geraakt met een *K. pneumoniae*. 27 patiënten hadden een ESBL positieve *K. pneumoniae*. Van de 27 patiënten waren 20 patiënten toevallige bevindingen (klinisch) en 7 patiënten zijn positief bevonden tijdens de screening. In 2002 was 1% van de patiënten besmet geraakt met een ESBL positieve *K. pneumoniae*, waarvan 0,5% een klinische besmetting was (zie figuur 11). Vanaf 2005 worden er meer besmettingen gevonden. In 2007 is dit opgelopen tot 3,1% voor de toevallige bevindingen en 1,3% is gevonden met de wekelijkse screening van patiënten die op de intensive care liggen. In totaal is dit in 2007 4,4% van de *K. pneumoniae* stammen die een ESBL gen bij zich dragen.



Figuur 11: Epidemiologische curve ESBL positieve *K. pneumoniae*

In figuur 12 is te zien dat elke positieve ESBL een SHV gen bezit. *K. pneumoniae* wordt volgens de literatuur [12] het meest gevonden met een SHV gen. Het SHV-1 gen of een gerelateerd gen is geïntegreerd in het bacteriële chromosoom. Van de ESBL positieve *K. pneumoniae* zijn er 23 getest in de PCR. Als er van een patiënt meerdere monsters waren is het eerste afgenomen monster dat opgeslagen is in de vriezer getest op ESBL. In 2006 had

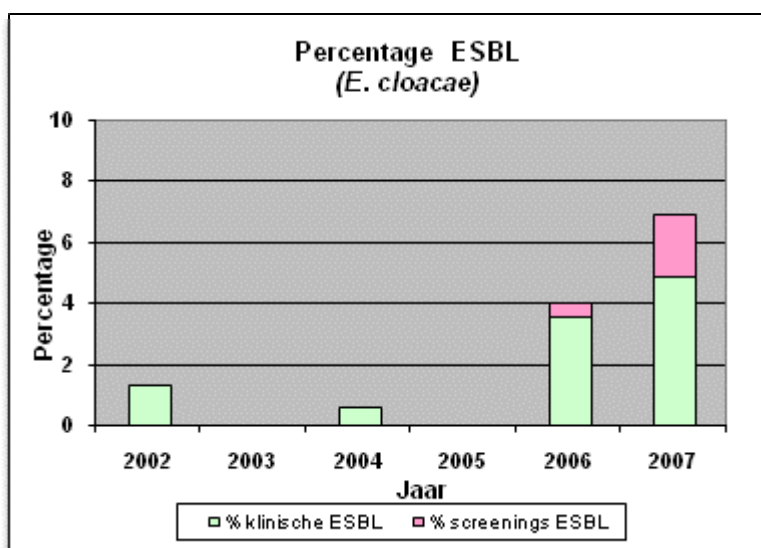
44% van de ESBL's een positief gen voor CTX-M en 33% een positief gen voor TEM. In 2007 had 36% een positief gen voor CTX-M en 45% een positief gen voor TEM. Vier patiënten hadden een gen voor zowel SHV, CTX-M als TEM.



Figuur 12: Percentage CTX-M, SHV, qnrA en TEM in ESBL positieve *K. pneumoniae*

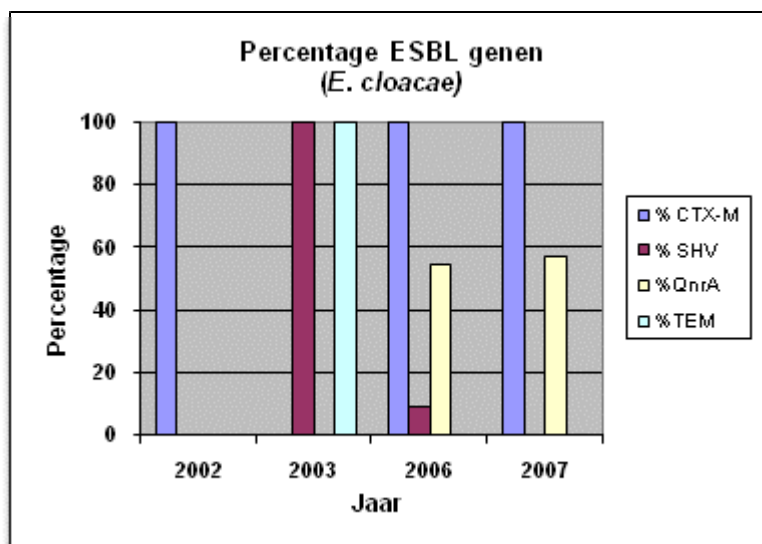
4.2.2 *E. cloacae*

Van 2002 t/m september 2007 zijn in totaal 1001 patiënten geïnfecteerd geraakt met een *E. cloacae*. 22 patiënten hadden een ESBL positieve *E. cloacae*. Van de 22 patiënten waren 18 patiënten toevallige bevindingen (klinisch) en vier patiënten zijn positief bevonden tijdens de screening. In 2002 was 1,3% van de patiënten besmet geraakt met een ESBL positieve *E. cloacae* (zie figuur 13). Vanaf 2006 worden er meer besmettingen gevonden. In 2007 is dit opgelopen tot 4,9% voor de toevallige bevindingen en 2,1% is gevonden met de wekelijkse screening van patiënten die op de intensive care liggen. In totaal is dit in 2007 7,0% van de *E. cloacae* stammen die een ESBL gen bij zich dragen.



Figuur 13: Epidemiologische curve ESBL positieve *E. cloacae*

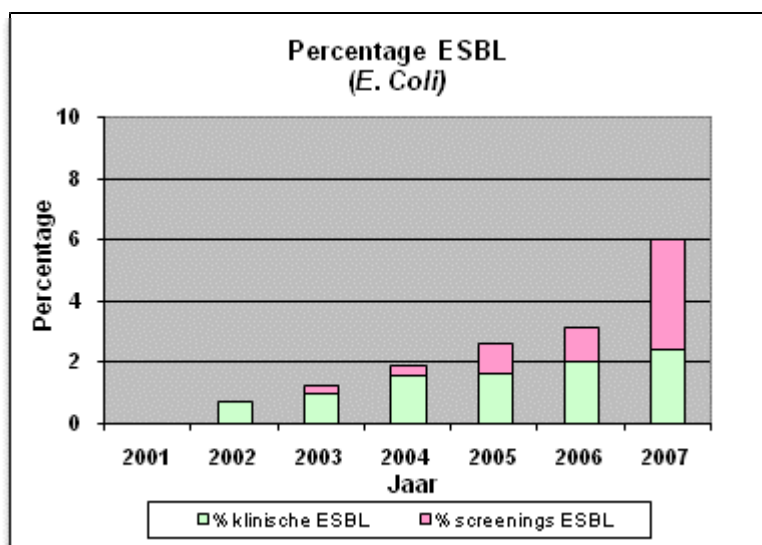
In figuur 14 is te zien dat in 2006 en 2007 elke ESBL positieve *E. cloacae* een CTX-M gen heeft. Van 2002 en 2003 waren er te weinig ESBL positieve *E. cloacae* stammen opgeslagen in de vriezer en getest met de PCR om hier een betrouwbare uitspraak over te doen. Van beide jaren is er één stam getest. In 2004 en 2005 waren er geen positieve *E. cloacae* stammen opgeslagen. Van elke patiënt is alleen het eerst afgenomen monster getest in de PCR. Van de *E. cloacae* stammen dragen in 2006 55% en in 2007 57% het *qnrA* gen bij zich. Het *qnrA* resistentie gen zit op hetzelfde plasmide als het CTX-M gen.



Figuur 14: Percentage CTX-M, SHV, qnrA en TEM in ESBL positieve *E. cloacae*

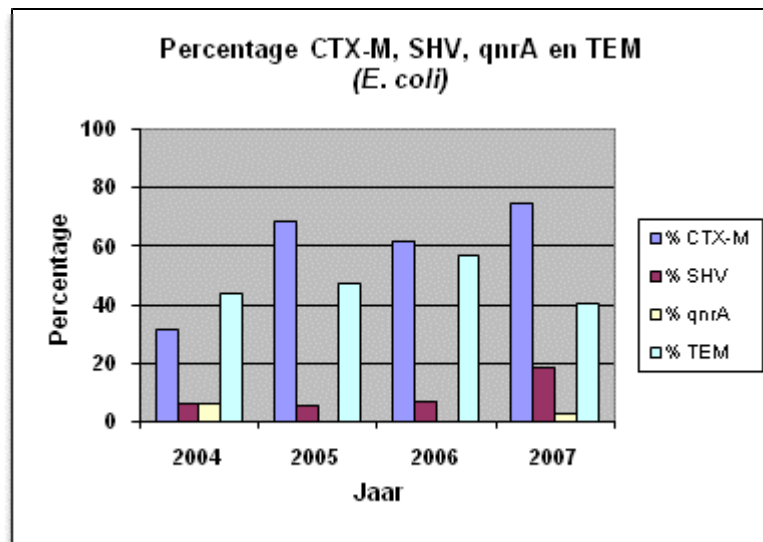
4.2.3 *E. coli*

De *E. coli* database is de meest omvattende database met meer dan 15.000 records. In de periode van 2001 t/m september 2007 zijn er in totaal 6731 patiënten geïnfecteerd geraakt met een *E. coli*. Hiervan waren er 108 klinische patiënten met een ESBL positieve *E. coli* en 69 patiënten die tijdens de screening ESBL positief werden bevonden. In 2001 had niemand een ESBL positieve *E. coli* (zie figuur 15). Dit is opgelopen tot 6% in 2007. Van deze 6% is 3,6% gevonden tijdens de screening en 2,4% zijn klinische patiënten dus toevallig gevonden.



Figuur 15: Epidemiologische curve ESBL positieve *E. coli*

In figuur 16 is te zien dat CTX-M het meest voorkomt. En dat dit in een snel tempo is toegenomen. In 2004 had 31% van de *E. coli*'s die ESBL positief waren een CTX-M gen. In 2007 is dit meer dan verdubbelt tot 75% van de ESBL positieve *E. coli*'s die een CTX-M gen hebben. In totaal zijn er 109 ESBL positieve *E. coli* stammen getest in de PCR. Van elke patiënt is weer alleen het eerste afgenomen monster getest in de PCR. Ook is te zien dat TEM veel voorkomt bij ESBL positieve *E. coli* stammen.



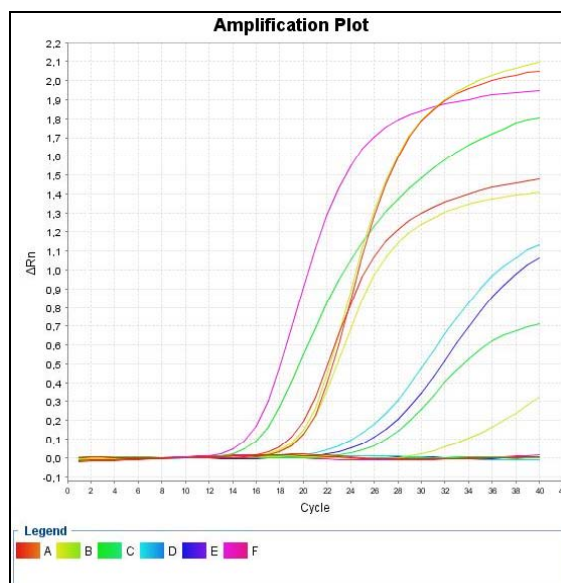
Figuur 16: Percentage CTX-M, SHV, qnrA en TEM in ESBL positieve *E. coli*

5 Resultaten real time PCR

5.1 Optimalisatie van de real time PCR

5.1.1 Primers en probes

Primers worden bij binnenkomst in het St. Antonius Ziekenhuis opgelost en verdund in water zodat er uiteindelijk 500 nM primer in de primeroplossing zit. Probes worden verdund tot 15 nmol/ml met TE buffer (Sigma). Met deze concentraties zijn de primers en probes getest op bekende positieve bacteriestammen. Als eerst zijn de primers en probes van de CTX-M groepen getest. Omdat er van CTX-M groep V geen positieve bacteriestam is, kon er niet gekeken worden of de probe werkt. CTX-M groep V is zeer zeldzaam en komt in Nederland niet voor. Wel wordt er vanuit gegaan dat de primers voor CTX-M groep V goed zijn ontworpen en deze worden dus meegenomen in het ontwikkelen van deze PCR. De primers voor CTX-M groep I en IV gaven direct het gewenste signaal. De primers van CTX-M groep II en III gaven geen signaal in de real time PCR. Om uit te sluiten of dit aan de primers lag, werden de positieve bacteriestammen getest in de oude PCR. Hier gaven ze een positief resultaat. Dezelfde bacteriestammen zijn ook getest met de primers van CTX-M groep I en IV. Hier gaven ze geen signaal. De positieve bacteriestammen waren dus wel degelijk van CTX-M groep II en III. Daarna is er voor alle vier de CTX-M groepen een real time PCR ingezet met SYBR® Green als mastermix. SYBR® Green heeft als eigenschap dat de fluorescerende labels binden aan al het dubbelstrengs DNA, dus ook aan niet specifiek dubbelstrengs DNA. Hoe meer dubbelstrengs DNA, des te meer fluorescentie signaal. Omdat er voor een PCR met SYBR® Green geen probe nodig is, kan op deze manier bekeken worden of het aan de probe of aan de primers ligt. De positieve stammen van CTX-M groep I en IV gaven een positief signaal en de positieve stammen van CTX-M groep II en III niet. Er kan dus gezegd worden dat het niet aan de probe lag maar aan de primers van groep II en III. Er werd vanuit gegaan dat de primers goed ontworpen waren. De enige mogelijkheid was dat de primers niet goed bereid waren bij Isogen (in IJsselstein). De primers voor CTX-M groep II en III werden opnieuw besteld. Deze nieuwe primers gaven direct het gewenste signaal met de positieve bacteriestammen. De primers en probe van *qnrA* gaven ook in één keer het gewenste signaal. De volgende stap is om alle primers en probes van CTX-M groep I t/m V en de primers en probe van *qnrA* in één voormix samen te voegen en multiplex te testen. Omdat de uiteindelijke reactie volume wel 20µl moest blijven werden de volumes van de primers aangepast. De primer concentratie was in plaats van 500 nM dan nog maar 100 nM. Eerst werd er met deze primerconcentraties gekeken of ze in multiplex goed functioneerden.



Figuur 17: Alle primers en probes in multiplex

Alle primers gaven een positief signaal bij het testen in multiplex (zie figuur 17). De onderste gele lijnt is het signaal van een bacteriestam met *qnrA*. Deze is nog erg zwak. Het VIC label, die gebruikt werd om het *qnrA* gen aan te tonen, heeft een lagere intensiteit dan de FAM label, die gebruikt werd om CTX-M aan te tonen. Het is dus logisch dat *qnrA* zwakkere signalen geeft, het signaal moet wel sterker worden dan hier zichtbaar is.

Omdat de primerconcentraties erg laag waren (100 nM), werden de primers opnieuw verdund en uitgevuld. Er werd een verdunningsreeks gemaakt van de primers en daar werd een real time PCR van ingezet om te testen bij welke primerconcentratie de meest gunstige signalen zichtbaar werden. De primerconcentraties waarvan een PCR werd ingezet waren: 100 nM, 200 nM, 300 nM en 400 nM.

Tabel 7: Testen van verschillende primerconcentraties

Stam nr.	Gen	Ct bij 100 nM		Ct bij 200 nM		Ct bij 300 nM		Ct bij 400 nM	
		CTX-M	<i>qnrA</i>	CTX-M	<i>qnrA</i>	CTX-M	<i>qnrA</i>	CTX-M	<i>qnrA</i>
5	CTX-M groep I	18,08	-	18,06	-	19,53	-	19,54	-
85	CTX-M groep II	17,26	-	16,95	-	17,34	-	17,43	-
201	CTX-M groep III	28,22	-	21,32	-	19,56	-	18,27	-
21	CTX-M groep IV	20,59	-	20,51	-	20,85	-	20,94	-
8	CTX-M, SHV, <i>qnrA</i>	20,21	32,65	20,08	23,98	20,33	21,75	20,36	20,96
81	SHV, TEM, <i>qnrA</i>	-	27,07	-	22,03	-	21,44	-	20,32

De *qnrA* bacteriestammen gaven bij een primerconcentratie van 400 nM het beste signaal. (zie tabel 7). Dit gold ook voor de bacteriestam met het CTX-M groep III gen. Omdat het VIC label van *qnrA* een zwakker signaal geeft dan het FAM label die gebruikt wordt om CTX-M aan te tonen, werd met het kiezen van de concentratie vooral gekeken naar de meest optimale primerconcentratie voor *qnrA*. Bij de andere bacteriestammen waren de verschillen tussen de primerconcentraties niet zo groot dus er wordt in het vervolg gebruik gemaakt van een primerconcentratie van 400 nM.

5.2 Validatie van de real time PCR

5.2.1 Juistheid (analytische validatie)

De 22 monsters die worden gebruikt voor het bepalen van de juistheid zijn de stammen die ook gebruikt zijn voor het testen van de oude PCR. Dit zijn *E. coli*, *K. pneumoniae* en *E. cloacae* stammen.

Tabel 8: Positieve validatie stammen

Stam nr.	Aanwezig gen	Species	Ct CTX-M	Ct <i>qnrA</i>
1	SHV	<i>K. pneumoniae</i>	-	-
2	SHV	<i>K. pneumoniae</i>	-	-
4	CTX-M IV, TEM	<i>E. coli</i>	19,64	-
5	CTX-M I, TEM	<i>E. coli</i>	19,32	-
6	TEM	<i>E. coli</i>	-	-
7	CTX-M IV	<i>E. coli</i>	24,95	-
8	CTX-M IV, SHV, <i>qnrA</i>	<i>E. cloacae</i>	20,75	20,85
13	SHV	<i>K. pneumoniae</i>	-	-
14	CTX-M IV, SHV	<i>K. pneumoniae</i>	17,80	-
15	CTX-M IV, SHV, TEM	<i>K. pneumoniae</i>	21,11	-
21	CTX-M IV, TEM	<i>E. coli</i>	21,22	-
23	CTX-M I	<i>E. coli</i>	21,13	-
24	TEM	<i>E. coli</i>	-	-
27	CTX-M IV, TEM	<i>E. coli</i>	23,37	-
33	TEM	<i>E. coli</i>	-	-
38	CTX-M IV, <i>qnrA</i>	<i>E. cloacae</i>	24,13	24,34
48	CTX-M IV, <i>qnrA</i>	<i>E. cloacae</i>	21,40	20,88
49	CTX-M IV, <i>qnrA</i>	<i>E. cloacae</i>	20,39	20,48
81	SHV, TEM, <i>qnrA</i>	<i>E. cloacae</i>	-	20,51
85	CTX-M II	<i>P. mirabilis</i>	17,55	-
200	CTX-M III en V	<i>E. coli</i>	17,42	-
201	CTX-M III en V	<i>E. coli</i>	18,68	-

Alle stammen die in de gewone PCR positief zijn voor CTX-M en *qnrA* zijn in de real time PCR ook positief voor CTX-M en *qnrA*.

5.2.2 Selectiviteit (analytische validatie)

Deze methode overlapt de methode voor het bepalen van de juistheid. Dezelfde 22 stammen die gebruikt zijn voor het testen van de juistheid worden ook gebruikt voor het testen van de selectiviteit. Deze 22 stammen dienen positief te zijn voor CTX-M groep I t/m V en *qnrA* in de nieuwe PCR. En 15 negatieve ESBL stammen, die negatief zijn getest in de E-test, dienen ook negatief te zijn in de nieuwe PCR.

Tabel 9: Negatieve validatie stammen

stam nr.	ESBL test	Species	Ct CTX-M	Ct <i>qnrA</i>
416	Neg ESBL E-test	<i>E. cloacae</i>	-	-
417	Neg ESBL E-test	<i>E. cloacae</i>	-	-
418	Neg ESBL E-test	<i>E. cloacae</i>	-	-
419	Neg ESBL E-test	<i>E. cloacae</i>	-	-
420	Neg ESBL E-test	<i>E. cloacae</i>	17,53	17,96
421	Neg ESBL E-test	<i>K. Pneumoniae</i>	-	-
422	Neg ESBL E-test	<i>K. Pneumoniae</i>	-	-
423	Neg ESBL E-test	<i>K. Pneumoniae</i>	-	-
424	Neg ESBL E-test	<i>K. Pneumoniae</i>	-	-
425	Neg ESBL E-test	<i>K. Pneumoniae</i>	-	-
426	Neg ESBL E-test	<i>E. Coli</i>	-	-
427	Neg ESBL E-test	<i>E. Coli</i>	-	-
428	Neg ESBL E-test	<i>E. Coli</i>	-	-
429	Neg ESBL E-test	<i>E. Coli</i>	16,56	-
430	Neg ESBL E-test	<i>E. Coli</i>	-	-

Alle CTX-M groep I t/m V en *qnrA* stammen zijn positief. Alle negatieve stammen, op stam 420 en 429 na, zijn in de real time PCR negatief. Achteraf blijkt dat stam 429 verkeerd staat ingevoerd in REVCO en wel positief is. De patiënt van stam 420 is wél bekend met ESBL. De E-test had aan beide kanten doorgroei, waardoor aan de hand van deze E-test niet gezegd kon worden of deze stam ESBL positief of ESBL negatief is. De real time PCR maakt goed onderscheid tussen de te bepalen componenten en niet relevante componenten.

5.2.3 Detectiegrens (analytische validatie)

De detectiegrens is de laagste betrouwbaar te meten concentratie die met de juiste precisie en juistheid kan worden geïnterpreteerd. Bij deze real time PCR gaat het om het aantonen van de aan- of afwezigheid van een gen. De ondergrens waarmee enkele kopieën aangetoond kunnen worden, is bij deze real time PCR niet van belang.

Voor elke CTX-M groep en voor *qnrA* werden er van de bacteriestammen verdunningsreeksen gemaakt in een range van 5×10^0 t/m 5×10^{10} . Hiervoor werd een klein stukje van een kolonie opgelost in fysiologisch zout en doorverdund. Deze verdunningsreeksen werden uitgespateld op bloed-agar-platen. De verdunningsreeksen werden ingevroren om te voorkomen dat de bacteriën zich zouden delen. Een dag later werd bekeken hoeveel CFU's zich op de bloedplaten bevonden. Vanaf de bloed-agar-plaat waar nul CFU's opzaten werden zes verdunningen in de PCR gezet. De voorspelling was dat er tussen elke verdunning ongeveer drie cycli zouden zitten. Dit was echter niet het geval. Van elke verdunning en van elke bacteriestam kwam er rond de 34^e cycli een signaal op. Een reden hiervan kon zijn dat door het vriezen en dooien van de verdunningsreeks de bacteriën samenklonterden. Opnieuw werd er een verdunningsreeks gemaakt. Deze keer werd er van de verdunningen direct een PCR gedaan en terwijl de PCR draaide werden de verdunningen uitgespateld op de bloed-agar-platen. Na het incuberen van de bloed-agar-platen (24 uur later) konden de CFU's geteld worden en de detectiegrens bepaald worden.

Tabel 10: PCR van de verdunningsreeks

Stam nr.	Gen	Ct (10 ⁰)	Ct (10 ¹)	Ct (10 ²)	Ct (10 ³)	Ct (10 ⁴)	Ct (10 ⁵)	Ct (10 ⁶)	Ct (10 ⁷)
25	CTX-M I	21,93	25,42	28,96	31,25	35,11	-	-	-
85	CTX-M II	18,40	22,10	25,39	29,33	31,76	35,95	-	-
200	CTX-M III	19,25	23,35	27,72	31,89	35,86	-	-	-
21	CTX-M IV	21,69	25,55	29,16	32,26	36,47	-	-	-
393	CTX-M	21,54	25,12	28,45	31,41	34,71	-	-	-
393	<i>qnrA</i>	24,09	27,83	31,28	34,97	-	-	-	-

Tabel 11: CFU's op uitgespatelde platen

Stamn.	25	85	200	21	393
verdund factor	aantal CFU	aantal CFU	aantal CFU	aantal CFU	aantal CFU
5×10 ⁰	>100	>100	>100	>100	>100
5×10 ¹	>100	>100	>100	>100	>100
5×10 ²	>100	>100	>100	>100	>100
5×10 ³	>100	>100	>100	>100	>100
5×10 ⁴	67	>100	112	72	102
5×10 ⁵	6	13	7	6	16
5×10 ⁶	1	0	0	0	0
5×10 ⁷	0	0	0	0	0

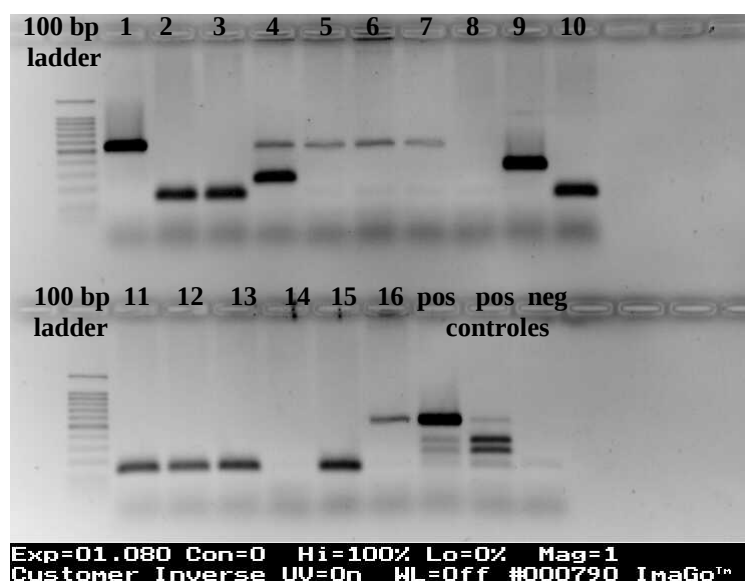
Van alle CTX-M groepen werden er in de 5×10⁴ verdunning nog kopieën aangetoond met de PCR (zie tabel 10) dit zijn ±100 kopieën per reactie (zie tabel 11). Van *qnrA* werden er in de 5×10³ verdunning nog kopieën aangetoond met de PCR dit zijn ±1000 kopieën per reactie. Voor CTX-M kunnen er minimaal 50.000 kopieën per ml aangetoond worden en voor *qnrA* kunnen minimaal 500.000 kopieën per ml per reactie aangetoond worden.

5.2.4 Robuustheid (analytische validatie)

Er zijn een aantal externe factoren die de PCR kunnen beïnvloeden. Bijvoorbeeld de gevoeligheid van de probe. Een probe kan maar maximaal zes keer ingevroren en ontdooid worden. Een probe mag ook niet bloot gesteld worden aan teveel licht. Het licht in de lufkast wordt niet aangedaan bij het maken van de voormix.

5.2.5 Sensitiviteit (klinische validatie)

De sensitiviteit geeft informatie over de fout negatieven. Er wordt gekeken naar het percentage terecht positieve monsters. Van 50 bacteriestammen werd een real time PCR ingezet waarvan ook een E-test (gouden standaard) is gedaan. Deze stammen dienen in de real time PCR hetzelfde resultaat te geven. De E-test geeft aan wanneer iets een ESBL is of niet, deze real time PCR geeft alleen aan of een stam CTX-M groep I t/m V of *qnrA* gen bevat. Van de 50 bacteriestammen waren er 16 discrepanties. Om na te gaan of het hier om SHV en TEM ging is er van deze discrepanties een oude PCR gedaan (zie figuur 18).



Figuur 18: Discrepanties multiplex PCR oude methode. Lengte van het TEM gen is 145 bp, *qnrA* gen is 246 bp, van het SHV gen 335 bp en van het CTX-M gen 542 bp

Tabel 12: Discrepanties: E-test, nieuwe PCR en oude PCR

Nr.	stam	ESBL E-test	Ct CTX-M (nieuwe PCR)	Bandje (oude PCR)
1	B502802	-	15,8567	CTX-M bandje; Geen discrepantie, E-test verkeerd berekend (E-test is ook positief)
2	B502720	+	---	TEM
3	B502709	+	---	TEM
4	B502328	-	13,9488	oude PCR geeft CTX-M bandje. patient bekend met ESBL
5	B501129	+	---	CTX-M vaag bandje (K. oxytoca)
6	B499890	+	---	CTX-M vaag bandje (K. oxytoca)
7	B499889	+	---	CTX-M vaag bandje (K. oxytoca)
8	B499643	+	---	--- (E. coli) andere ESBL??
9	B496739	+	---	SHV
10	B490993	+	---	TEM
11	B490992	+	---	TEM
12	B490700	+	---	TEM
13	B487991	+	---	TEM
14	B487090	-	---	--- (E-test in serimba geen ESBL)
15	B483467	+	---	TEM
16	B499891	-	---	Geen discrepantie. CTX-M vaag bandje (K. oxytoca)

In tabel 12 staan de resultaten van de discrepanties van de E-test, de nieuwe PCR en de oude PCR weergegeven. Bacteriestam nummer 1 bleek geen discrepantie te zijn, de E-test was verkeerd berekend. De E-test bleek dus positief te zijn. Dit gold ook, maar dan andersom,

voor bacteriestam nummer 14. Deze bacteriestam is in Serimba (laboratorium informatie-systeem van het St. Antonius Ziekenhuis) negatief. Bacteriestam 16 was geen discrepantie. Deze stam is meegenomen in de oude PCR omdat in Serimba bekend is dat dit een *K. oxytoca* is. Bacteriestam 5, 6 en 7 zijn ook *K. oxytoca*'s. *K. oxytoca*'s zijn altijd positief in de oude PCR voor CTX-M omdat *K. oxytoca* een chromosomaal β -lactamasegen, blaOXY-2 bezit. Dit gen heeft veel overeenkomsten met de primerbinding sites van CTX-M. Deze blaOXY positieve *K. oxytoca*'s kunnen een ESBL fenotype hebben door hyperproductie van blaOXY en zijn hierdoor ook positief in de E-test. Ze zijn te onderscheiden van echte ESBL positieve bacteriën doordat ze gevoelig zijn voor ceftazidim [25, 26]. Omdat het blaOXY-2 gen niet helemaal overeenkomt met de primer van CTX-M, is dit gen als een vaag bandje te zien op de agarosegel en daardoor makkelijk te herkennen; helemaal wanneer bekend is dat de bacterie een *K. oxytoca* is. De primer van de real time PCR heeft minder overeenkomsten met het blaOXY-2 gen waardoor de fout positieve ESBL een negatief resultaat geeft. Dit verhaal wordt bevestigd met stam 5, 6 en 7. Daar is te zien dat de E-testen positief zijn. De agarosegel laat een vaag bandje zien voor CTX-M (zie figuur 18) en de real time PCR geeft een negatief resultaat. Stam 2, 3, 9, 10, 11, 12, 13 en 15 zijn positief voor TEM of SHV en dus niet te herkennen voor de real time PCR. Dit zijn discrepanties die verwacht werden. De patiënt van stam 4 is wel bekend met ESBL. Andere E-testen van andere bacteriën geven bij deze patiënt een positief resultaat voor ESBL. Stam 8 is in de E-test positief, de oude PCR methode en de real time PCR geven echter een negatief resultaat. Hier gaat het om een ander soort ESBL, dus geen CTX-M, SHV of TEM.

Voor het berekenen van de sensitiviteit werd er een tabel gemaakt.

Tabel 13: berekenen sensitiviteit en specificiteit

		Resultaten E-test	
		Positief	Negatief
Resultaten real time PCR	Positief	21 _A	1 _B
	Negatief	12 _C	16 _D

De sensitiviteit kan met de volgende formule berekend worden (voor de waarden zie tabel 13):

$$\frac{A}{A+C} \times 100\% = \frac{21}{21+12} 100\% = 64\%$$

Sensitiviteit laat zien dat 64% van de ESBL positieve bacteriestammen aangetoond kan worden met de real time PCR. Er wordt met de real time PCR alleen CTX-M en *qnrA* aangetoond. SHV en TEM worden niet aangetoond. Wanneer deze wel aangetoond zouden worden, kan er nog niet gezegd worden of het dan om een ESBL gaat. Zie paragraaf 1.4.1 en 1.4.2.

5.2.6 Specificiteit (klinische validatie)

De specificiteit geeft informatie over de fout positieven. Er wordt gekeken naar het percentage terecht negatieve monsters. Voor het testen van de specificiteit werden dezelfde testen gedaan met dezelfde bacteriestammen die ook voor het testen van de sensitiviteit zijn gebruikt. Voor het berekenen van de specificiteit werd de volgende formule gebruikt (voor de waarden zie tabel 13):

$$\frac{D}{B+D} \times 100\% = \frac{16}{16+1} 100\% = 94\%$$

De specificiteit ligt in de lijn der verwachtingen. De enige discrepantie die het percentage van de specificiteit omlaag heeft gebracht, is de discrepantie met bacteriestam nummer 4. Deze patiënt is wel bekend met ESBL, hoewel de E-test voor deze bacterie negatief is voor ESBL. Ook de oude PCR bevestigt dat deze patiënt positief is voor CTX-M.

6 Conclusie en discussie

6.1 Doel

ESBL wordt in Nederland en dus ook in het St. Antonius Ziekenhuis een steeds groter probleem. In dit onderzoek is voor *K. pneumoniae*, *E. cloacae* en *E. coli* de epidemiologie bepaald voor de ESBL genen TEM, SHV en CTX-M en voor het quinolonen resistentiegen *qnrA* om inzicht te krijgen in hoe groot het probleem in het St. Antonius Ziekenhuis is. Ook is er een real time PCR opgezet voor CTX-M en *qnrA*. Deze real time PCR moet de door Lydia Kool (stagiaire MMI 2007) ontwikkelde PCR vervangen. De PCR is namelijk erg arbeidsintensief en de real time PCR belooft in 45 minuten een resultaat te geven. Dit is een paar uur sneller dan de oude PCR en twee dagen sneller dan de E-test die door het laboratorium wordt uitgevoerd.

6.2 Opzetten PCR

Voor het opzetten van de PCR zijn primers en probes ontwikkeld. Hiervoor is met een verdunningsreeks een optimale concentratie bepaald. Daarna is de PCR gevalideerd door het testen van de juistheid, de selectiviteit, de detectiegrens, de robuustheid, de sensitiviteit en de specificiteit. CTX-M is onder te verdelen in vijf groepen. Er is een multiplex voormix gemaakt van de primers en probe van de vijf CTX-M groepen en van de primers en probe van *qnrA*. CTX-M groep V is erg zeldzaam en daar is in Nederland nog geen stam van bekend. Er wordt vanuit gegaan dat de primers van CTX-M groep V goed zijn ontworpen maar dit kan niet gecontroleerd worden. Bij het kiezen van de primerconcentratie is gekozen voor 400 nM. Voor *qnrA* was dit de meest optimale concentratie en voor CTX-M waren de verschillen niet groot. Het valideren van de PCR werd volgens een standaard laboratoriumprotocol gedaan. De detectiegrens voor de real time PCR is wat minder van belang voor het valideren, omdat het vooral om de detectie van de aan- of afwezigheid van CTX-M of *qnrA* in geïsoleerde stammen gaat. De PCR kan voor CTX-M 50.000 kopieën per ml aantonen en voor *qnrA* 500.000 kopieën per ml aantonen.

De sensitiviteit van de real time PCR is 64%. De sensitiviteit zegt iets over de fout negatieven; er wordt gekeken naar het percentage terecht positieve monsters. Het percentage dat is gevonden zegt dat 64% van de met ESBL geïnfecteerde patiënten twee dagen eerder behandeld kunnen worden met geschikte antibiotica en twee dagen eerder in een eenpersoons isolatiekamer gelegd kunnen worden om verdere besmetting te voorkomen.

Van de 50 bacteriestammen die getest waren voor het bepalen van de sensitiviteit waren er dertien discrepanties. Daarvan waren er acht stammen positief voor TEM en SHV. Dit zijn de stammen die inderdaad niet aangetoond kunnen worden in de real time PCR. Drie van de 50 bacteriestammen waren *K. oxytoca*'s, deze zijn positief voor ESBL in de E-test omdat *K. oxytoca* chromosomaal β -lactamasegen, blaOXY-2 bezit. Dit gen heeft veel overeenkomsten met de met de primerbinding sites van CTX-M. Deze blaOXY positieve *K. oxytoca*'s kunnen een ESBL fenotype hebben door hyperproductie van blaOXY en zijn hierdoor ook positief in de E-test. De primer van de real time PCR heeft minder overeenkomsten met het blaOXY-2 gen waardoor de fout positieve ESBL een negatief resultaat geeft in de real time PCR. Helaas heeft dit het percentage van de sensitiviteit van de PCR omlaag gebracht, doordat de *K. oxytoca*'s in de E-test fout positief waren en in de PCR goed negatief. Een andere echte discrepantie was een stam die in de E-test positief was en in zowel de oude

PCR als de real time PCR een negatief resultaat gaf. Deze stam is waarschijnlijk een andere ESBL dan TEM, SHV of CTX-M.

De specificiteit van de real time PCR is 94%. De enige discrepantie die het percentage van de specificiteit omlaag heeft gebracht is een bacteriestam van een patiënt die wel bekend is met ESBL hoewel de E-test voor deze bacterie negatief is voor ESBL. Ook de oude PCR bevestigt dat deze patiënt positief is voor CTX-M.

6.3 Epidemiologie

De epidemiologie is bepaald om inzicht te krijgen in het aantal geïnfecteerde klinische patiënten en het aantal geïnfecteerde screeningspatiënten en in het percentage TEM, SHV, CTX-M en *qnrA* genen van de ESBL positieve bacteriestammen. De epidemiologie is opgesplitst in klinische patiënten en screeningspatiënten (keel, neus en perineum monsters) omdat het bewust zoeken naar ESBL positieve stammen meer positieve stammen oplevert. Dit beïnvloedt dan gelijk ook de werkelijke klinische curve want zodra men meer zoekt en dus meer vindt, blijven er minder toevallige vondsten (klinisch) over.

Voor *K. pneumoniae* is er inderdaad een stijgende lijn te zien in het aantal ESBL infecties in de afgelopen vijf jaar. Van de 1388 patiënten die geïnfecteerd zijn geraakt met *K. pneumoniae* waren in totaal 27 patiënten positief voor ESBL. Dit was 1% in 2002 en 4,4% in 2007. In 2007 was 1,3% gevonden met de screening. 3,1% waren klinische patiënten. Van de positieve stammen had 100% een gen voor SHV. Volgens de literatuur klopt dit want het SHV-1 gen of een gerelateerd gen is geïntegreerd in het bacteriële chromosoom [12]. In 2006 en 2007 hadden respectievelijk 44% en 36% van de patiënten een CTX-M gen. Deze patiënten kunnen met behulp van de nieuwe PCR twee dagen eerder behandeld worden. En ze kunnen in een eenpersoons isolatiekamer gelegd worden zodat ze geen andere patiënten meer kunnen infecteren.

Voor *E. cloacae* is er een extremere stijgende lijn te zien. 1001 patiënten zijn in de afgelopen vijf jaar geïnfecteerd geraakt met een *E. cloacae*. 22 patiënten hadden een ESBL positieve *E. cloacae*, hiervan waren er 18 toevallige bevindingen. Vier ESBL positieve monsters zijn gevonden tijdens de screening. In 2002 was 1,3% geïnfecteerd geraakt met een ESBL positieve *E. cloacae*. In 2003 en 2005 is er niemand geïnfecteerd geraakt met een ESBL positieve *E. cloacae*. In 2004 was dit 0,6% en in 2007 is dit percentage gestegen tot 7%. En van deze 7% in 2007 was 100% CTX-M en 57% was óók in het bezit van het *qnrA* gen. *QnrA* komt vooral veel voor bij *E. cloacae*, bij de andere bacteriestammen is het probleem nog niet zo groot.

De *E. coli* database is de meest omvattende database met meer dan 15.000 records. Met zoveel records ontstaat er een nauwkeurige epidemiologische curve. In het jaar 2001 is er niemand gevonden met een ESBL positieve *E. coli*. In 2007 had in totaal 6% een ESBL positieve *E. coli*. In 2007 werd 3,6% van de ESBLs gevonden tijdens de wekelijkse screening. In deze curve is goed te zien dat het screenen van IC patiënten zijn vruchten afwerpt. Ook het percentage CTX-M neemt ernstig toe. In 2004 had 31% van de ESBL positieve *E. coli*'s een CTX-M gen en in 2007 is dit percentage vóór gestegen tot 75%.

6.4 Eindconclusie

Bij *E. cloacae*, *K. pneumoniae* en *E. coli* is goed te zien dat het ESBL probleem steeds groter wordt. En dat ook het percentage CTX-M drastisch toe neemt. Het is dus van groot belang om dit te blijven volgen. Hiervoor is een real time PCR ontwikkeld zodat in een uur bepaald kan worden of een verdachte stam een ESBL is. Deze real time PCR wordt momenteel gebruikt om de verdachte stammen van de IC screening te testen op ESBL. Ook worden de aanvragen voor ESBL van het Diakonessen ziekenhuis (Utrecht) getest met de real time PCR. De real time PCR kan nu alleen nog vaststellen of een stam een CTX-M gen en/of een *qnrA* gen heeft. Het zou mooi zijn als er in de toekomst ook SHV en TEM mee bepaald kan worden. Het is gecompliceerder om hier een goede PCR voor te ontwikkelen omdat TEM-1, TEM-2 en SHV-1 geen ESBL's zijn. Wanneer er dan een TEM of SHV aangetoond wordt kan er niet met zekerheid vast gesteld worden of een bacteriestam een ESBL is of niet. Voor dit probleem zou dan nog iets verzonnen moeten worden. Ook is het aan te raden dat het StepOne™ apparaat een eigen computer krijgt of aangesloten wordt op het netwerk zodat er ook echt "real time" gekeken kan worden naar het verloop van de test. Op deze manier ziet men nog sneller wanneer een monster positief is.

Literatuurlijst**Artikelen**

3. **N. al Naiemi**, *Extended-Spectrum β -lactamases; Detection & Epidemiology*, Academisch proefschrift, Universiteit van Amsterdam, 2007
4. **D.L. Paterson**, *Resistance in gram-negative bacteria: Enterobacteriaceae*, Associated for professional infection control and epidemiology, Vol 34 No. 5 Supplement I, Juni 2006.
7. **L. Rice**, *Evolution and clinical importance of extended-spectrum β -lactamases*, official publication of the American college of chest physicians. 2001
11. **Paterson, D.L.**, *Extended-Spectrum β -Lactamases: a Clinical Update*, Clinical Microbiology Reviews, p657-686, October 2005.
12. **Bradford, P.A.**, *Extended-Spectrum β -Lactamases in the 21st Century: Characterization, Epidemiology, and detection of This Important Resistance Threat*, Clinical Microbiology Reviews, p. 933-951, October 2001
13. **R. Bonnet**, *Growing group of extended-spectrum β -lactamases: the CTX-M enzymes*, Antimicrobial Agents and chemotherapy, p1-14, januari 2004
14. **A. Pauw, A.C. Fluit, J. Verhoef, M.A. Lverstein – van Hall**, *Enterobacter cloacae outbreak and emergence of Quinolone resistance gene in dutch hospital*, Emerging infectious diseases, Vol. 12, No. 5, Mei 2006
15. **A. Robicsek, G.A. Jacoby, D.C. Hooper**, *The worldwide emergence of plasmid-mediated quinolone resistance*, Lancet infect Dis, 2006
16. **P. Nordmann, L. Poirel**, *Emergence of plasmid-mediated resistance to quinolones in enterobacteriaceae*, Journal of antimicrobial chemotherapy 56, p 463 – 469, juli 2005
17. **L. Kool**, *Moleculaire identificatie van de Extended-Spectrum β -Lactamase genen TEM, SHV en CTX-M en het quinolonen resistentiegen QnrA*, afstudeerscriptie, Hogeschool van Utrecht, mei 2007.
21. **N. al Naiemi, A. Bart, M. D. de Jong, C. M. Vandenbroucke-Grauls, P. J. G. M. Rietra, Y. J. Debets-Ossenkopp, P. C. Wever, L. Spanjaard, A. J. Bos, B. Duim**, *Widely Distributed and Predominant CTX-M Extended-Spectrum β -lactamases in Amsterdam, The Netherlands*. Journal of Clinical Microbiology, p. 3012-3014, 2006
23. **O. Henegariu, N.A. Heerema, S.R. Dlouhy, G.H. Vance, P.H. Vogt**, *Multiplex PCR: Critical Parameters and Step-by-Step Protocol*, BioTechniques Vol. 23, p 504-511, September 1997
24. **D. Lipson**, *optimization problems in design of oligonucleotides for hybridization based methods*, Research thesis, Israel institute of thechnology, September 2002
25. **M. Edelstein, M. Pimkin, I. Palagin, I. Edelstein, L. Stratchounski**, *Prevalence and Molecular Epidemiology of CTX-M Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae in Russian Hospitals*, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Vol. 47, No. 12, p 3724-3732, september 2003
26. **D. Décré, B. Burghoffer, V. Goutier, J.C. Petit, G. Arlet**, *Outbreak of multi-resistant klebsiella oxytoca involving strains with extended-spectrum β -lactamases and strains with extended-spectrum activity of the chromosomal β -lactamase*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 54, p 881-888, oktober 2004

Boeken

1. **H.A. Verburgh, R.P. Mouten, A.M. Polderman**, *Medische microbiologie: leerboek voor bacteriologie, mycologie en parasitologie*, Bohn Stafleu van Loghum, achtste druk, Houten/Zaventem, mei 1992
8. **M.D. Victor Lorian**, *Antibiotics in laboratory medicine*, Williams & Wilkins, vierde druk, New York, 1996
20. **E. van Pelt-Verkuil, M.F. van Berlo, A. van Belkum, H.G.M niesters**, *Moleculaire Diagnostiek*, Bohn Stafleu van Loghum, Houten/Diegem, mei 2001.

Websites

2. <http://www.rivm.nl/infectieziektenbulletin/bul89/abdeel1.html>; 8 juni 2007
5. <http://www.chemicalland21.com/info/cephalosporins.htm>; 8 juni 2007
6. <http://www.fk.cvz.nl/default.asp?soort=inleidendetekst&naam=inl%20cefalosporinen>; 8 juni 2007
9. [http://www.fk.cvz.nl/default.asp?soort=inleidendetekst&naam=inl%20middelen %20bij%20 infectieziekten](http://www.fk.cvz.nl/default.asp?soort=inleidendetekst&naam=inl%20middelen%20bij%20infectieziekten); 27 juli 2007
10. <http://www.rivm.nl/infectieziektenbulletin/bul1307/esbl.html>; 24 mei 2007
18. http://www.accessexcellence.org/RC/CT/polymerase_chain_reaction.html; 3 augustus 2007
19. http://www.microbiologie.info/de_polymerase_chain_reaction.htm
22. <http://www.bio.davidson.edu/Courses/Molbio/MolStudent/spring2003/Pierce/realtimepcr.htm>; 21 september 2007

Protocollen

27. Medische Microbiologie en Immunologie, AZN-OR-PRC-VAL-04 Validatie (nieuwe) methoden, november 2005

Figuren

- | | |
|------------------|---|
| Figuur 1: | http://www.zum.de/Faecher/Materialien/beck/13/bs13-7.htm |
| Figuur 2: | http://www.10voorbiologie.nl/index.php?cat=9&id=258&par=279&sub=280 |
| Figuur 3: | http://whyfiles.org/shorties/090antibio_resist/index.html |
| Figuur 4: | Bijsluiter; E-test for detection of ESBL |
| Figuur 5 t/m 7: | Screenshot <i>E. Cloacae</i> database |
| Figuur 8 t/m 10: | http://www.bio.davidson.edu/Courses/Molbio/MolStudents/spring2003/
Pierce/ realtimepcr.htm; 21 september 2007 |
| Figuur 11 en 12: | Grafieken uit de <i>K. pneumoniae</i> database |
| Figuur 13 en 14: | Grafieken uit de <i>E. cloacae</i> database |
| Figuur 15 en 16: | Grafieken uit de <i>E. coli</i> database |
| Figuur 17: | Amplificatie plot StepOne™ nieuwe primers en probes multiplex |
| Figuur 18: | Agarose gel van de discrepanties |

Bijlage 1 Excel formules database

Kolommen in de database			formule
A	Patient gegevens	labnummer	Uit access
B		patientnr	Uit access
C		afname datum	Uit access
D		jaar	Uit access
E	REVCO	Revco hulp kolom	=VERT.ZOEKEN(A3;REVCO!\$B\$4:\$C\$297;2;ONWAAR)
F		Revco	WAARDE KOPIE VAN KOLOM E => #N/B vervangen door 0
G	materiaal	materiaal	Uit access
H		klin	=ALS(G3<>"NEU";ALS(G3<>"KEE";ALS(G3<>"PER";1;0);0);0)
I		screen	=ALS(H3=1;0;1)
J	ESBL positief	vriezer hulp kolom	=VERT.ZOEKEN(A3;REVCO!\$B\$2:\$K\$299;10;ONWAAR)
K		In vriezer	WAARDE KOPIE VAN KOLOM J => #N/B vervangen door 0
L		E-test hulp kolom	=VERT.ZOEKEN(A3;'E-test'!\$A\$2:\$F\$1049;7;ONWAAR)
M		E-test	WAARDE KOPIE VAN KOLOM L => #N/B vervangen door 0
N		Totaal positief	=ALS(K3=1;1;ALS(M3=1;1;ALS(T3=1;1;0)))
O	aantal positieve patiënten	Totaal patiënten	=ALS(B3=B2;0;1)
P		Eerste pos resultaat patient	=ALS(B3=B2;P2*2+N3;N3)
Q		Klinische patiënten	=ALS(P3=1;P3*H3;0)
R		Screenings patiënten	=ALS(P3=1;P3*I3;0)
S	ESBL gen	CTX-M (542bp)	=VERT.ZOEKEN(\$A3;Genen!\$D\$1:\$N\$116;8;ONWAAR)
T		CTX-M (542bp) kopie	Kopie van kolom S => #N/B vervangen door 0
U		SHV (335bp)	=VERT.ZOEKEN(\$A3;Genen!\$D\$1:\$N\$116;9;ONWAAR)
V		SHV (335bp) kopie	Kopie van kolom Z => #N/B vervangen door 0
W		QnrA (246bp)	=VERT.ZOEKEN(\$A3;Genen!\$D\$1:\$N\$116;10;ONWAAR)
X		QnrA (246bp) kopie	Kopie van kolom Z => #N/B vervangen door 0
Y		TEM (145bp)	=VERT.ZOEKEN(\$A3;Genen!\$D\$1:\$N\$116;11;ONWAAR)
Z		TEM (145bp) kopie	Kopie van kolom Z => #N/B vervangen door 0

Bijlage 2 Stammen die gebruikt zijn voor het testen van de primers en probes

Stamnr.	Aanwezig gen	Species
4	CTX-M IV	<i>E. coli</i>
5	CTX-M I	<i>E. coli</i>
8	CTX-M IV, SHV, <i>qnrA</i>	<i>E. cloacae</i>
10	CTX-M I	<i>K. oxytoca</i>
14	CTX-M IV, SHV	<i>K. pneumoniae</i>
17	CTX-M I	<i>K. pneumoniae</i>
19	CTX-M IV	<i>E. coli</i>
21	CTX-M IV, TEM	<i>E. coli</i>
22	CTX-M IV	<i>E. coli</i>
23	CTX-M I	<i>E. coli</i>
25	CTX-M I	<i>E. coli</i>
34	CTX-M I	<i>E. coli</i>
35	CTX-M I	<i>E. coli</i>
37	CTX-M I	<i>E. coli</i>
38	CTX-M IV, QnrA	<i>E. cloacae</i>
39	CTX-M IV	<i>E. cloacae</i>
40	CTX-M IV	<i>E. cloacae</i>
48	CTX-M IV, <i>qnrA</i>	<i>E. cloacae</i>
81	SHV, TEM, QnrA	<i>E. cloacae</i>
85	CTX-M II	<i>P. mirabilis</i>
200	CTX-M III en V	<i>E. coli</i>
201	CTX-M III en V	<i>E. coli</i>
393	<i>qnrA</i>	<i>E. cloacae</i>