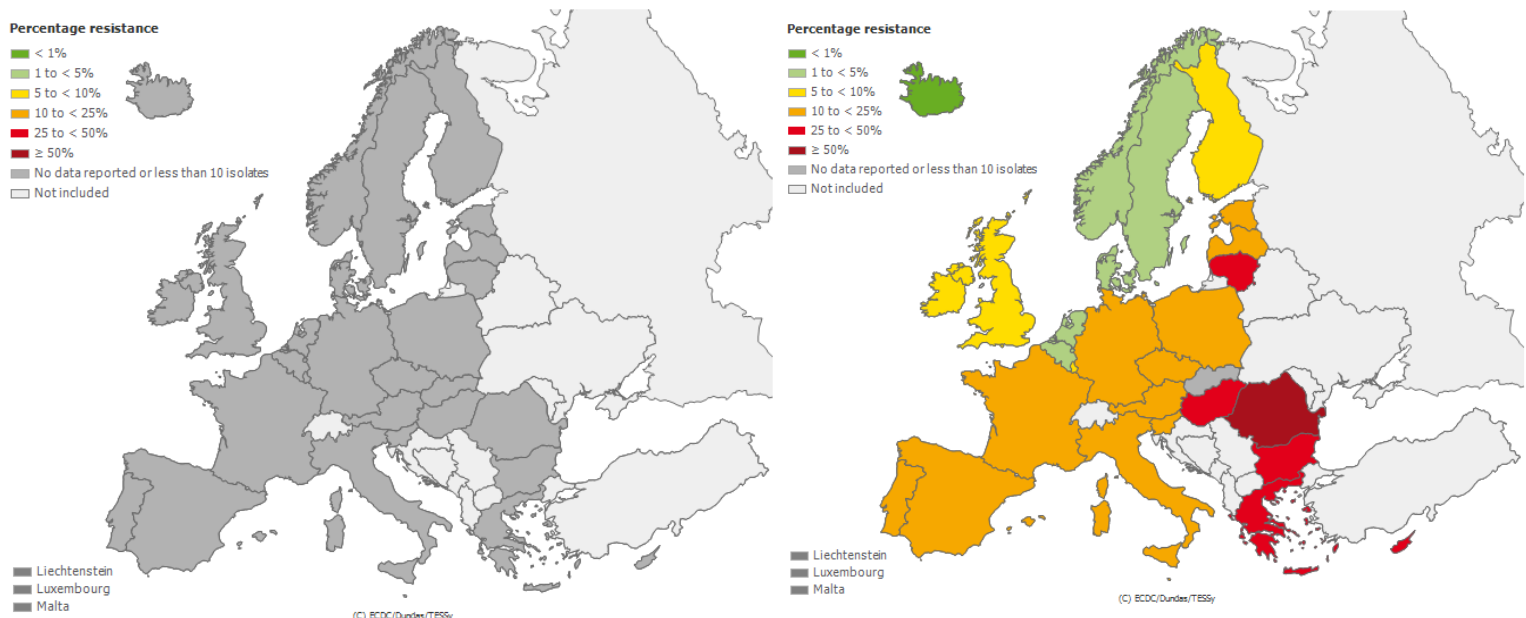


EPIDEMIOLOGIE EN RESISTENTIE MECHANISMEN VAN CARBAPENEM- RESISTENTE *PSEUDOMONAS* *AERUGINOSA*

Epidemiology and resistance mechanisms of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*



Figuur 1 Proportion of Carbapenems resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates in participating countries in 2000(left) and 2010(right)(53)

Door: T. van der Schalk



Begeleider Erasmus universitair
Medisch Centrum: Dr. W. Goessens



Begeleider Hogeschool Utrecht,
Insitute for Life sciences and Chemistry:
Dr. H. Nottet

Datum: 28-08-2012

Student: Thomas Ewout van der Schalk

t.vanderschalk@hotmail.com

Opleiding: Biologie en medisch laboratorium onderzoek, medische microbiologie

Hogeschool Utrecht, Faculteit Natuur en Techniek: Institute for Life sciences and Chemistry

Afstudeerplaats: Erasmus universitair medisch centrum Rotterdam, Medisch microbiologie en Infectieziekten, Onderzoek en Ontwikkeling

Afstudeerperiode: 01-02-2012 tot en met 30-08-2012

Begeleiders Erasmus universitair medisch centrum:

Dr. W.H.F. Goessens

w.goessens@erasmusmc.nl

Dr. A.K. van der Bij

N.A. Lemmens- den Toom

Begeleider Hogeschool Utrecht:

Dr. H.S.L.M. Nottet

hans.nottet@hu.nl



VOORWOORD

Voor de afstudeeropdracht van mijn opleiding: Biologie en medisch laboratorium onderzoek, specialisatie medische microbiologie aan de Hogeschool Utrecht Institute for Life sciences and Chemistry heb ik stage gelopen bij het Erasmus medisch centrum. Daar heb ik gewerkt aan een onderzoek van Akke van der Bij naar carbapenem resistentie in *Pseudomonas aeruginosa*.

In deze scriptie staat de werkwijze met de handelingen die zijn uitgevoerd voor dit onderzoek, de ondersteunende theorie, de resultaten, de van de resultaten afgeleide conclusie en discussie en afsluitend advies voor een vervolg onderzoek.

Voor dat u verder leest wil ik eerst een paar mensen bedanken: Akke van der Bij en Wil Goessens voor het toelaten van mij aan het project en de begeleiding tijdens de afstudeeropdracht. Nicole Lemmens voor het begeleiden van mij tijdens het uitvoeren van de MLVA en de IEF, Marian ten Kate voor het begeleiden van mij tijdens isolatie van de eiwitten en enzymextractie, Saskia de Walick voor het begeleiden van mij tijdens de SDS-PAGE, Gerjo de Knecht voor de hulp bij de RT-qPCR en Corné de Vogel voor hulp bij de theoretische informatie van de technieken. Hiernaast wil ik ook nog Rosa van Mansfeld bedanken van het UMC Utrecht die de MLVA typen heeft toegewezen aan de gevonden loci.

SAMENVATTING

Vanwege een toenemende frequentie van carbapenem-resistente *Pseudomonas aeruginosa* moet er onderzoek worden gedaan naar het epidemiologisch beeld van deze bacterie in Nederland. In dit onderzoek wordt er vooral gekeken naar de epidemiologie en daarnaast naar de mogelijke resistentie mechanismen. Om een beeld te krijgen van de verspreiding van carbapenem-resistente *P.aeruginosa* in Nederland wordt er gebruikt gemaakt van Multiple-Locus Variable-Number Tandem-Repeat Analysis (MLVA). Verder wordt er met Natrium Dodecyl Sulfaat PolyAcrylamide Gel Elektroforese (SDS-PAGE) gekeken naar de permeabiliteit van verschillende carbapenem-resistente isolaten door te kijken naar het OprD porie eiwit, en met IsoElektrisch Focussen (IEF) wordt er gekeken naar de productie van AmpC- β -lactamase in verschillende carbapenem-resistente isolaten.

De MLVA laat zien dat er binnen 127 MBL negatieve carbapenem-resistente *P.aeruginosa* stammen 109 MLVA-typen zijn. Dit betekent dat er weinig klonale verwantschap is binnen de carbapenem-resistente *P.aeruginosa*, wat volgens eerder onderzoek wel aanwezig is bij MBL positieve *P.aeruginosa*.

Na een paar keer te testen met SDS-PAGE is er gebleken dat de resultaten die hieruit kwamen moeilijk te interpreteren zijn op de afwezigheid van OprD, om die reden is er besloten om ook te kijken naar de RNA expressie van het OprD gen ten opzichte van het rpoD huishoud gen. Om dit te doen moest er wel eerst een Reverse Transcription- quantitative Polymerase Chain Reaction (RT-qPCR) worden opgezet.

Om te kijken of er de SDS-PAGE als nog gebruikt kon worden voor dit onderzoek is deze techniek ook geoptimaliseerd door te kijken naar het percentage gel en de hoeveelheid monster met een bepaalde optische dichtheid. Het resultaat wat hieruit kwam was dat er het beste een 12% polyacrylamide gel gebruikt kon worden en ook dat de beste hoeveelheid monster dat op de gel geplaatst moest worden 12-15 μ l was.

Bij het opzetten van de RT-qPCR moesten er een aantal factoren worden geoptimaliseerd: de annealingstemperatuur, de concentratie primers van het OprD gen, de concentratie primers van het rpoD gen en de magnesiumchloride concentratie. De optimale annealingstemperatuur is bepaald agarose gel elektroforese en hieruit is gebleken dat 58°C de beste annealingstemperatuur was. De optimale primer concentraties en de optimale magnesiumchloride concentraties zijn bepaald door te kijken in de qPCR naar de smelttemperatuur van het product, de afgeleide van de amplificatie plot, het aantal cycli waarbij de drempelwaarde werd bereikt en de hoogte van de amplificatie plot. Van al deze gegevens is een procentuele verandering gemaakt ten opzichte van de standaard concentratie primers en magnesiumchloride. Hieruit is de conclusie gekomen dat de optimale concentratie voor de OprD primers 0,5 μ M is, de optimale concentratie voor de rpoD primers is 1 μ M en de optimale concentratie magnesiumchloride is 4 mM.

Er zijn 47 stammen getest op de aanwezigheid van AmpC- β -lactamasen en op de aanwezigheid van andere β -lactamasen met uitzondering van metallo- β -lactamasen, in deze 47 stammen zaten ook vier VIM-2 positieve stammen. Deze VIM-2 stammen waren in een eerder onderzoek door middel van PCR positief getest op VIM-2. Binnen de 47 getest stammen waren er 12 AmpC- β -lactamasen gevonden en 15 andere β -lactamasen, er waren twee stammen waarin AmpC- β -lactamase en een ander β -lactamase aanwezig was, er was één stam waarin twee β -lactamasen aanwezig waren en er waren twee VIM-2 stammen die naast VIM-2 een ander β -lactamase hadden.

SUMMARY

It is important to get a better epidemiological view of *Pseudomonas aeruginosa* because of an increasing frequency of carbapenem resistance in this bacterium. This means that it is necessary to do more research in to this subject. The main focus of this study is to get an epidemiological view of carbapenem-resistant *P. aeruginosa* and to get more insight in the mechanisms of resistance in these bacteria. The technique that is used for the epidemiological part of this study is the Multiple-Locus Variable-Number Tandem-Repeat Analysis (MLVA). The techniques that are used to get more insight in the resistance mechanisms are Sodium Dodecyl Sulphate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) to look at the permeability because of loss of the OprD-porin and IsoElectric Focusing to look at the production of AmpC- β -lactamase in the carbapenem-resistant isolates

The MLVA shows that within 127 MBL negative carbapenem-resistant *P. aeruginosa* strains there are 109 MLVA types. This means that there is almost no clonal relationship between these isolates, where in a previous study metallo- β -lactamase positive strains were shown that there is a very high clonal relationship.

After testing a couple of times with SDS-PAGE there had to be concluded that it was difficult to interpret the loss of OprD that there was decided to look into the expression of OprD with Reverse Transcription-quantitative Polymerase Chain Reaction(RT-qPCR). The RT-qPCR worked by comparing the RNA expression of the OprD gene to the RNA expression of the household gene *rpoD*. To do this there had to be made an RT-qPCR protocol, including an optimization.

To see if the SDS-PAGE could still be used for this study there was decided that it should be optimized on the manner of the percentage of the gel and the amount of sample with the same optical density. The results were that the best type of gel for this research is a 12% gel and that the best amount of sample is between the 12 and 15 μ l.

For the creation of the RT-qPCR protocol there had to be an optimization of a few factors: the annealingtemperature, the concentration of the primers for OprD, the concentration of the primers for *rpoD* and the concentration of magnesium chloride. The optimal annealingtemperature was determined by agarose gel electrophoresis and the result of this was that 58°C was the optimal annealingtemperature. The optimal primer and magnesium chloride concentrations where determined by looking in to the melting temperature of the created products, the derivative of the amplification plot, the number of cycles that was needed to reach the threshold and the height of the amplification plot. From all this data was made a percentage change relative to the standard concentration primers and magnesium chloride. Out of this percentage there is concluded that the optimal concentration for the OprD primers is 0.5 μ M, the optimal concentration for the *rpoD* primers is 1 μ M and the optimal concentration magnesium chloride is 4mM.

There were 47 strains tested IEF for the presence of AmpC- β -lactamases and for the presence of other β -lactamases with the exception of metallo- β -lactamases. Within these 47 strains there were four VIM-2 positive strains. The four VIM-2 positive strains were tested positive for VIM-2 by PCR in a previous study.

Within the 47 strains there were found 12 AmpC- β -lactamases and 15 other β -lactamases. There were two strains that had both AmpC- β -lactamases and another β -lactamase, there was one strain that had two β -lactamases and there where to VIM-2 positive strains that had alongside VIM-2 one other β -lactamase.

AFKORTINGENLIJST

ADP	Adenosinedifosfaat
AIM	Australian imipenemase
AmpC(-β-lactamase)	Breed spectrum antibiotica hydrolyserend enzym, voornamelijk cefamycines en oxyimino-β-lactams
<i>ampD</i> , <i>ampR</i> & <i>ampG</i>	Regulator genen van AmpC-β-lactamase
AST	Antimicrobial susceptibility testing
bp	Basenparen
CbrA, CbrB, CrcZ	Koolstof- en stikstof metabolisme en Crc regulatoren
cDNA	Complement desoxyribonucleïnezuur
CF	Cystische fibrose
cfu	Colony-forming unit
CMY-2	cefamycinase-2
Crc	Regulator van de koolstofmetabolisme
Ct	Cycle threshold(bij detectie van DNA in een qPCR)
CTX-M	Cefotaximinase
DHP-I	Dehydropeptidase I
DIM	Dutch imipenemase
DNA	Desoxyribonucleïnezuur
DNase/RNase	Een enzym dat DNA/RNA afbreekt
dUTP	Deoxyuridinetrifosfaat
ESBL	Extended spectrum-β-lactamase
ETA	Exotoxine A
Exo(S, T, U & Y)	Exoenzym(S,T, U & Y)
<i>f'</i>	Afgeleide
FRET	Fluorescence Resonance Energy Transfer
GES	Guiana extended-spectrum
GIM	German imipenemase
HGDI	Hunter Gaston Discriminatory Index
IEF	Isoelektrisch focussen
IL-8	Interleukine-8
IMI	Imipenemase
IMP	Imipenemase
kDa	kiloDalton
KHM	Kyorin University Hospital imipenemase
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemase
LasA	Een serine protease
LasB	Een zink metallo protease
LB	Lysogeny broth
Lon	Regulator van de eiwit kwaliteitscontrole
LPS	Lipopolysacharide
MBL	Metallo-β-lactamase
MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN, MexGHI-OpmD, MexJK-OprM/OpmH, MexMN, MexPQ-OpmE, MexVW-OprM, MexXY-OprM, TriABC-OpmH, MuxABC-OpmB	Buitenmembraan efflux pompen van <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
MexT	Regulator van MexEF-OprN
MIC	Minimaal inhiberende concentratie
MLVA	Multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis
NDM	New Delhi metallo-β-lactamase
NMC-A	Nonmetallocarbapenemase-A
NT	Niet getest
°C	Graden Celsius
OD	Optische dichtheid
OMV	Outer membrane vesicle

Epidemiologie en resistentie mechanismen van carbapenem-resistente *Pseudomonas aeruginosa*

OprD	Buitenmembraan porie eiwit van <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
OXA(- β -lactamase)	Oxacillinase
PAO1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> stam, gebruikt als positieve controle
PAGE	Polyacrylamide gel electroforese
PBP	Penicillin-binding-protein
PCR	Polymerase chain reaction
Pel& Psl	Polysacchariden in <i>Pseudomonas aeruginosa</i> biofilms
pH	$-\log([H^+])$, de zuurgraad
pI	Isoelektrisch punt
PsrA	Type III transcriptionele regulator
qPCR	Kwantitatieve polymerase chain reaction
RA	Raman spectroscopie analyse
RNA	Ribonucleïnezuur
RND	Resistentie-nodulatie-celdelings pompen
Rpm	Rotaties per minuut
RpoS	Regulating protein sigma (reguleert transcriptie)
RT	Reverse transcriptie
SDS	Sodium dodecyl sulfaat
SHV	Sulfhydryl geremde β -lactamase
SIM	Seoul imipenemase
SME	<i>Serratia marcescens</i> enzym
SPM	Sao Paulo metallo- β -lactamase
Taq polymerase	<i>Thermus aquaticus</i> polymerase
TEM	Temoneira(1 ^{ste} patiënt waarbij TEM is geïdentificeerd)
TH broth	Todd Hewit broth
Tm	Smelttemperatuur(temperatuur waarbij een DNA product openbreekt)
TMB	Tripoli metallo- β -lactamase
UV	Ultraviolet
VIM	Verona integron-encoded metallo- β -lactamase
VNTR	Variable-number tandem-repeat

INHOUDSOPGAVE

Voorwoord	3
Samenvatting	4
Summary	5
Afkortingenlijst.....	6
1.0 Inleiding.....	11
1.1 Theoretische achtergrond	12
1.1.1 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	12
1.1.2 Resistentie van <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1
1.1.3 Carbapenems.....	17
1.2 Theoretische onderbouwing praktijk onderzoek.....	18
1.2.1 MLVA	18
1.2.2 SDS-PAGE.....	19
1.2.3 IEF	20
1.2.4 RT-qPCR	21
1.2.5 RA	22
2.0 Materiaal en Methode	23
2.1 Genotypering met behulp van MLVA	23
2.1.1 DNA isolatie	23
2.1.2 Polymerase Chain reaction.....	23
2.1.3 Agarose gel elektroforese.....	23
2.2 Expressie van het OprD porine eiwit met behulp van SDS-PAGE	24
2.2.1 Negatieve controle	24
2.2.2 Isolatie van outer membrane vesicles(OMV's).....	24
2.2.3 SDS Monster voorbereiding	25
2.2.4 SDS-PAGE.....	25
2.3 Scheiden van β -lactamasen met behulp van IEF	26
2.3.1 Isolatie van β -lactamasen.....	26

Epidemiologie en resistentie mechanismen van carbapenem-resistente *Pseudomonas aeruginosa*

2.3.2 IEF	26
2.4 OprD EXPRESSIE bepaling met behulp van RT-qPCR	26
2.4.1 RT-qPCR optimalisatie	26
2.4.2 RNA isolatie	27
2.4.3 RNA zuivering	27
2.4.4 Reverse transcriptie Reactie.....	28
2.4.5 Kwantitatieve PCR	28
3.0 Resultaten	29
3.1 Genotypering met behulp van MLVA	29
3.1.1 Controle aflezen MLVA.....	29
3.1.2 Typering vergelijking	30
3.1.3 genotypen carbapenem-resistente <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	30
3.2 Expressie van het OprD porine eiwit met behulp van SDS-PAGE	30
3.2.1 Negatieve controle	30
3.2.2 Optimalisatie van de SDS-PAGE.....	32
3.3 Scheiden van - β lactamasen met behulp van IEF	33
3.4 OprD Expressie bepaling met behulp van RT-qPCR	34
3.4.1 Optimalisatie	34
4.0 Discussie en Conclusie.....	36
Aanwijzingen voor een vervolg onderzoek.....	39
Bronnen.....	40
Bijlagen.....	43
BIJLAGE 1, primer gegevens van de RT-qPCR	43
OprD primers.....	43
rpoD primers	44
BIJLAGE 2, MLVA data.....	45
Tabel B 2-1: MLVA Foto overzicht eerste run& de foto's.....	45
Tabel B 2-2: MLVA Foto overzicht van overgedane tests& de foto's	51
Tabel B 2-3: Ruwe data MLVA	55

Epidemiologie en resistentie mechanismen van carbapenem-resistente *Pseudomonas aeruginosa*

BIJLAGE 3, IEF resultaten: foto's en tabel	59
BIJLAGE 4, Ruwe data van de RT-qPCR optimalisatie	61



1.0 INLEIDING

Begin jaren negentig werd er voor het eerst een metallo- β -lactamase(MBL) producerende *Pseudomonas aeruginosa* aangetoond in Japan(1, 2, 3). In 2007 werden voor het eerst in Nederland, 2 MBL producerende *P.aeruginosa* isolaten aangetroffen(2, 4) op een totaal van 650 *P.aeruginosa* isolaten. In 2008-2009 werd er in het Erasmus universitair medisch centrum een hoge prevalentie van imipenem-resistente *P.aeruginosa* isolaten aangetroffen. Een groot aantal van deze isolaten bleken achteraf Verona integron-encoded metallo- β -lactamase(VIM)-2 MBL positief te zijn(2).

Omdat carbapenem-resistentie bij *P.aeruginosa* steeds vaker voorkomt werd vervolgens een multi-center studie in Nederland uitgevoerd. In een aantal van deze isolaten werd wederom de aanwezigheid van het VIM-2 metallo-beta-lactamase aangetoond. Echter in ongeveer de helft van de andere multi-resistente isolaten kon geen MBL worden aangetoond. In de huidige studie wordt dan ook een aanvang gemaakt met het karakteriseren van de mogelijke resistentie mechanismen in desbetreffende isolaten. Verder wordt van de isolaten verzameld in deze multi-center studie in het huidige onderzoek de onderlinge verwantschap vastgesteld tussen de verschillende geïsoleerde organismen met behulp van de MLVA-genotyperingstechniek. De aanwezige mechanismen van resistentie zijn onderzocht met verschillende technieken. Zo werden de porie-eiwitten van het buitenmembraan zichtbaar gemaakt met de SDS-PAGE techniek. Hierbij is onderzocht of het buitenmembraan van de *P. aeruginosa* isolaten in het bezit zijn van het porie-eiwit OprD. Tevens is er een RT-qPCR ontwikkeld om de expressie van OprD kwantitatief te kunnen vaststellen. De aanwezigheid en expressie van eventuele β -lactamasen is vast gesteld middels isoëlectrisch focussen.

Dit onderzoek begint met een theoretisch deel en daarna volgt het praktisch deel. Het theoretische deel van dit onderzoek handelt o.a. over de algemeen kenmerken van *P.aeruginosa*, de carbapenems en de resistentie mechanismen van

P.aeruginosa. Het praktijk gedeelte van dit onderzoek gaat over hoe het epidemiologisch onderzoek is gedaan, hoe het onderzoek naar een aantal resistentie mechanismen is gedaan en hoe de optimalisatie van een tweetal technieken is gedaan. Het praktijk gedeelte wordt in eerste instantie theoretisch onderbouwd over welke technieken er worden gebruikt.

Na het praktijk gedeelte worden de verkregen resultaten weergegeven en wordt daar uit een conclusie getrokken. Aan het einde van de conclusie en discussie worden er ook nog aanwijzingen gegeven voor een vervolgonderzoek.

1.1 THEORETISCHE ACHTERGROND

1.1.1 PSEUDOMONAS AERUGINOSA

Pseudomonas aeruginosa is een Gram-negatieve non-fermentatieve staafvormige bacterie. Deze bacterie is alomtegenwoordig in het milieu, maar heeft een voorkeur voor vochtige omgevingen. *P.aeruginosa* heeft verschillende reservoirs in ziekenhuizen: drinkbaar water, kranen, wasbakken, douches, desinfectans, zeep, beademingsapparatuur, ijsmakers, bloemenvazen, scheerspullen, tandenborstels, oogdruppels, flacons voor meerdere dosissen en mondwater, dweilen, emmers, endoscopen, urometers, waterbaden, hydrotherapie baden, babyvoeding bassins, schoonmaak spullen(5). Het is een opportunistisch pathogeen voor planten, dieren en mensen en is een van de belangrijkste verwekkers van nosocomiale infecties(5-10).

P.aeruginosa infecteert vooral immuungecompromitteerde en cystic fibrose(CF) patiënten, en kan infecties veroorzaken van de luchtwegen, urinewegen, huid en weke delen, oog en oorinfecties. Daarnaast kan *P.aeruginosa* ook een bacteriëmie veroorzaken en endocarditis(5, 6, 8, 9, 11).

P.aeruginosa heeft verschillende virulentie factoren, zoals proteases, elastase en fenazine pigmenten die toxisch zijn.

Exotoxine A(ETA) is een van de belangrijkste virulentie factoren van *P.aeruginosa* omdat dit toxine de eiwit synthese van de gastheer verstoort. ETA zorgt voor necrose bij brandwonden, hoornvlies beschadigingen bij ooginfecties, weefselschade bij chronische longinfecties en immuunsuppressie (5, 10, 11, 12).

Pyocyanin is een blauw pigment van *P.aeruginosa* dat het vrijkomen van interleukine-8 stimuleert(5, 10, 11, 12).

Pyoverdine is een geel pigment van *P.aeruginosa* dat bindt aan ijzer voor gebruik in het metabolisme en reguleert de secretie van virulentie factoren waaronder ook ETA(5, 10, 11, 12).

P.aeruginosa heeft twee belangrijke proteasen: 1 serine protease LasA en 2 zink metalloprotease LasB. Deze twee proteasen werken samen om elastine af te breken, complement onderdelen af te breken en chemotaxis van neutrofiele granulocyten te remmen. De diagnose van *P.aeruginosa* infecties wordt soms verkregen door het uitvoeren van een agglutinatieve reactie van antistoffen gericht tegen LasA en LasB(5, 10, 11, 12).

Verschiedende secretie mechanisme met in het bijzonder type III secretie systemen.

Vier verschillende effector proteïnen: ExoS en ExoT, Exoenzym S en exoenzym T zijn extracellulaire toxines die door *P.aeruginosa* geproduceerd worden. Deze bezitten adenosinedifosfaat(ADP)-ribosyltransferase activiteit, dit zorgt voor schade aan epitheel cellen, helpt met de verspreiding van de bacterie door het lichaam, weefsel invasie en necrose. Exo U is een cytotoxine met fosfolipase activiteit en Exo Y is een adenylaat. Deze vier proteïnen kunnen schade toe brengen aan het menselijk lichaam(5, 10, 11, 12).

Fosfolipase C is een hitte stabiel hemolysine die lipiden en lectines afbreekt waardoor weefselschade ontstaat(5, 10, 11, 12).

Lipopolysacharide(LPS) O antigeen komt voor bij veel bacteriën en ook bij *P.aeruginosa* wat zorgt voor bescherming tegen het complementsysteem(12).

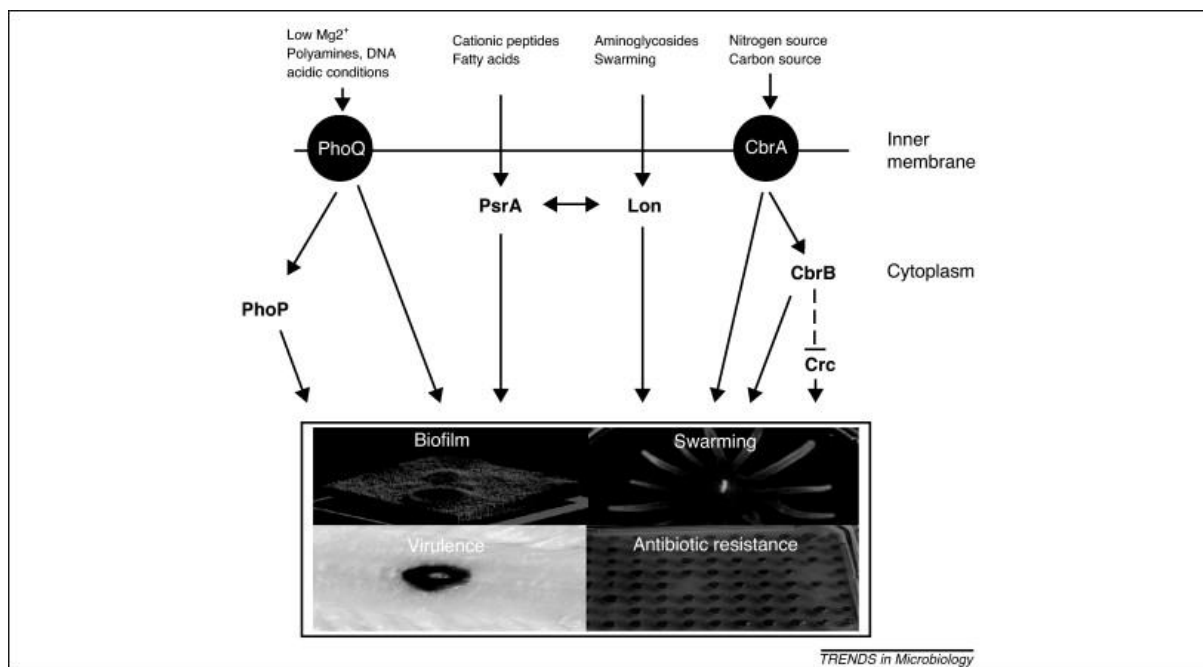
P.aeruginosa kan biofilms vormen en zwermen waardoor de overleving- en infectiemogelijkheden van deze bacterie groter worden(5, 10-13). Het vormen van biofilms en het zwermen van *P.aeruginosa* zijn complexe vormen van aanpassing die plaats vinden onder invloed van meerdere factoren. De vorming van biofilms wordt geïnitieerd door flagellen-gemedieerde bewegingen waardoor cellen naar een oppervlak bewegen om zich daar vervolgens te hechten. De hechting van bacteriën in de biofilm is veel sterker door groei in een specifieke vorm in de aanwezigheid van de polysacchariden Pel en Psl. Biofilms worden meestal geassocieerd met chronische infecties op epitheel of groei op medische apparatuur(13). Het zwermen van *P.aeruginosa* door flagellen-gemedieerde beweging, zorgt dat bacteriën over een semisolid oppervlak kunnen bewegen met als gevolg dat op een agarplaat de kolonies dendritische vormen aannemen. Het zwermen geeft *P.aeruginosa* meer kans om te infecteren. Tevens wordt het makkelijker voor de bacterie om zich door lagen mucus te bewegen(13).

Voor het vormen van biofilms en zwermen zijn een heleboel regulatoren nodig, in figuur 1-1-1 zijn deze te zien met hun functie is(13).

1.1.2 RESISTENTIE VAN PSEUDOMONAS AERUGINOSA

RESISTENTIE KLASSEN VAN *P.AERUGINOSA*

Pseudomonas aeruginosa heeft 3 manieren om resistent te worden tegen antibiotica: 1 Intrinsieke resistentie 2 Verworven resistentie en 3 Adaptieve resistentie. Intrinsieke resistentie is een stabiele vorm van resistentie, de mechanismen die hieronder vallen zijn erfelijk en zijn niet afhankelijk van omgevingsfactoren. De mechanismen die tot deze klasse van antibiotica behoren zijn: verlaagde permeabiliteit van het buitenmembraan, β -lactamase productie en efflux pomp overexpressie. De verworven resistentie klasse is net als de intrinsieke resistentie klasse stabiel, erfelijk en niet afhankelijk van omgevingsfactoren. De mechanismen die tot de verworven resistentie klasse behoren zijn de resistentie mechanismen van de intrinsieke resistentie maar die worden beïnvloed door horizontale genoverdracht en mutaties. De adaptieve resistentie klasse is het tegenovergestelde van de andere 2 resistentie klassen. De adaptieve resistentie klasse is niet stabiel, is niet erfelijk en is afhankelijk van omgevingsfactoren. De mechanismen die tot deze



Figuur 1-1-1 Antibiotic resistance and virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. Overview of the complexity underlying the regulation of antibiotic resistance and virulence-related processes. The interaction among regulatory networks dictates the contribution of each gene to both antibiotic resistance and virulence. The figure represents different stimuli that induce inner membrane and cytoplasmic proteins, which then positively (thin arrow) or negatively (dotted line) regulate other proteins. All of them are involved in antibiotic resistance and virulence (thick arrow). A possible crosstalk between CbrA and PhoQ has been recently suggested (13).

Door: Thomas van der Schalk

Epidemiologie en resistentie mechanismen van carbapenem-resistente *Pseudomonas aeruginosa*

klasse behoren zijn: veranderingen in gen expressie door factoren zoals blootstelling aan β -lactam antibiotica en overexpressie van efflux pompen, die invloed hebben op regulator genen(13).

INTRINSIEKE RESISTENTIE MECHANISMEN

P. aeruginosa heeft uit zichzelf resistentie mechanismen tegen antibiotica. Hier onder vallen verminderde doorlaatbaarheid en/of efflux van antibiotica, mutaties in het DNA gyrase, chromosomale β -lactamasen en topoisomerase hierbij spelen de celwand poriën en de efflux pompen de grootste rol in de resistentie(6, 8, 9, 10).

CELWAND PORIËN

De celwandporiën spelen een belangrijke rol in de intrinsieke resistentie van *P. aeruginosa*. Deze celwandporiën worden ook wel OprD porie eiwitten genoemd. Verlaagde expressie of verandering van het OprD porie eiwit leidt vaak tot een basale vorm van resistentie. OprD fungeert als een specifiek kanaal voor essentiële aminozuren en kleine peptiden. OprD heeft 2 loops die dienen als ingang voor de aminozuren en peptiden, verder dienen deze loops ook als bindingsplaatsen voor imipenem(5, 8, 10, 14, 15).

De carbapenems binden aan loop twee van het OprD porie eiwit waardoor de porie verstopt raakt maar wat steeds vaker in vitro te zien is, is dat bij blootstelling aan carbapenems er mutaties in het gen van OprD ontstaan en een verlaagde expressie van OprD. Dit zou betekenen dat het verlies van het OprD porie eiwit als bindingsplaats voor antibiotica het eerste resistentie mechanisme is dat is geïnduceerd door selectieve druk(14). Verlies van het OprD porie in combinatie met verhoogde efflux is een van de belangrijkste redenen voor carbapenem resistentie in *P. aeruginosa*. (14, 16, 17)

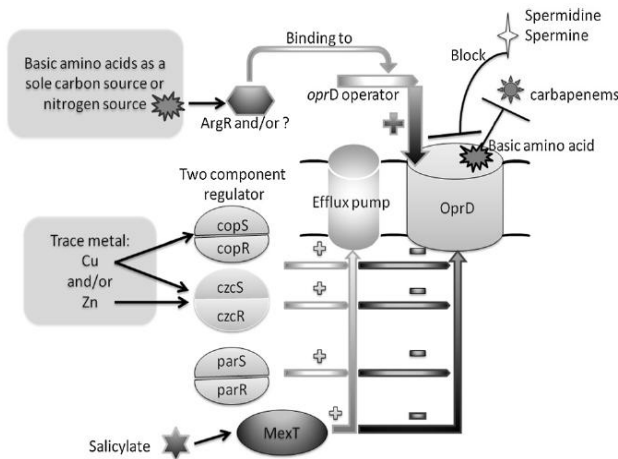
EFFLUX POMPEN

De meeste efflux pompen die betrokken zijn bij antimicrobiële resistentie zijn de resistentie-nodulatie-celdelings pompen(RND), deze pompen gebruiken energie om antibiotica kwijt te raken. Er zijn tot nu toe 11 verschillende efflux pompen aangetoond: 1 MexAB-OprM, 2 MexCD-OprJ, 3 MexEF-OprN, 4 MexGHI-OpmD, 5 MexJK-OprM/OpmH, 6 MexMN, 7 MexPQ-OpmE, 8 MexVW-OprM, 9 MexXY-OprM, 10 TriABC-OpmH en 11 MuxABC-OpmB(18). Het eerste gedeelte van de efflux pompen is de naam van de pomp, en het tweede gedeelte is de naam van het porie eiwit wat de uitgang vormt(15). Er zijn twee efflux pompen van de 11 die toegelicht zullen worden vanwege de grotere rol die deze pompen hebben in de antibiotica resistentie van *P. aeruginosa*.

De MexEF-OprN efflux pomp is de enige positief gereguleerde RND pomp, en wordt geactiveerd door het Mex-T eiwit(16).

Wat verder ook nog bijzonder is aan de MexEF-OprN efflux pomp is dat onder invloed van antibiotische stress er een verhoogde expressie is met behulp van het Mex-T eiwit mechanisme en onder invloed van metabolische stress kwam er een verhoogde expressie zonder een Mex-T mechanisme(18).

Het is aangetoond dat het Mex-T eiwit zorgt voor een verhoogde expressie van het MexEF-OprN en een verlaagde expressie van het OprD porie eiwit (figuur 1-1-2)(14, 18).



Figuur 1-1-2 Regulators of expression of OprD and factors affecting the bacterial penetration of carbapenems. Basic amino acids acting as sole carbon and/or nitrogen source drive ArgR or other regulators that bind to the oprD gene operator and increase the expression of OprD. OprD expression is suppressed by two-component regulators, including copSR, czcSR, parSR, and efflux pump regulator MexT. These regulators also increase the expression of specific efflux pumps (as shown in the figure, “+” means increase, “-” means decrease). Basic amino acids can directly compete with carbapenem for penetration through the OprD channel. Some molecules, such as spermidine and spermine, can block the OprD channel and affect entry of carbapenems. Salicylate decreases the expression of OprD through regulating the expression of MexT(17).

De MexAB-OprM efflux pump speelt een grotere rol in de resistentie dan de MexEF-OprN efflux pump. Het is in een aantal studies aangetoond dat de overexpressie van MexAB-OprM leidt tot resistentie tegen fluoroquinolonen, tetracyclines, chloramfenicol en β -lactam antibiotica. Wat hierbij op valt, is dat organismen ongevoeliger zijn voor meropenem dan voor imipenem. Dit komt waarschijnlijk omdat de pomp bedoeld is om schadelijke stoffen uit de cel te verwijderen, maar imipenem heeft in tegenstelling tot de andere carbapenems geen schadelijke zijketens(8, 15, 16, 17).

Er is aangetoond dat de MexAB-OprM efflux pump effectiever is in het extruderen van antibiotica dan andere efflux pompen(19).

CLASSIFICATIE VAN BETA-LACTAMASEN

Er zijn verschillende manieren om β -lactamase te classificeren. De meest gebruikte manier van β -lactamase classificatie is volgens Ambler. De Ambler classificatie bestaat uit vier klassen van enzymen. Deze klassen zijn: klasse A met als meest voorkomende soort de ESBL's, klasse B met de MBL's, klasse C met als meest frequent de AmpC's en klasse D met als grootste soort de OXA β -lactamase(3, 20).

AMBLER KLASSE A: ESBL'S

De term Extended Spectrum β -Lactamase komt oorspronkelijk uit 1983. Hierbij werd voor gesteld om plasmide gemedieerde β -lactamase die ongevoelig zijn tegen breed spectrum cefalosporines als ESBL's te definiëren(21).

ESBL's zijn enzymen die breed spectrum cefalosporines met een oxyimino-zijketen en monobactams hydrolyseren. Hier vallen voornamelijk de derde generatie cefalosporines onder (20, 22). De meeste ESBL's die worden aangetroffen kunnen in een van de volgende groepen worden geplaatst: 1 TEM, 2 SHV en 3 CTX-M. Er zijn tot nu toe al meer dan 130 verschillende TEM enzymen beschreven, meer dan 50 SHV enzymen en meer dan 40 CTX-M enzymen. Andere ESBL types komen minder vaak voor en zijn vaak gebonden aan bepaalde geografische plaatsen (23).

Tot de klasse A worden ook enzymen gerekend met carbapenemase activiteit zoals: GES, KPC, SME, IMI en NMC-A. Het meest voorkomend is KPC. Er zijn 11 KPC varianten, maar de verwachting is dat er snel meer bij zullen komen(20, 21, 24). Tot 2010 kwamen de enzymen GES en KPC alleen voor bij *Enterobacteriaceae*, maar ondertussen zijn deze enzymen ook al aangetroffen in *P. aeruginosa* en in *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii*(3).

AMBLER KLASSE B: MBL'S

Metallo- β -lactamasen werden voor het eerst aangetoond begin jaren zestig. In 1990 werden deze MBL's in *P. aeruginosa* aangetoond. MBL's vormen een groot gevaar doordat de genen op mobiele plasmiden voorkomen (1, 2, 23). Deze klasse van carbapenemasen is moleculair het meest divers en vormen de grootste klinische bedreiging van alle carbapenemasen(3). De enzymen worden MBL's genoemd omdat hun activiteit afhankelijk is van de aanwezigheid van metalen en in het bijzonder tweewaardige zink ionen(24, 25).

Het grootste gevaar van de afgelopen tijd op het gebied van MBL's is de opkomst van MBL's in *Enterobacteriaceae*. Het gevaar hierbij is dat er panresistente stammen kunnen opduiken(3).

Er zijn tot nu toe 10 verschillende MBL type enzymen aangetoond: imipenemase(IMP), VIM, Sao Paulo metallo- β -lactamase(SPM), German imipenemase(GIM), Australian imipenemase(AIM), Seoul imipenemase(SIM), New Delhi metallo- β -lactamase(NDM), Dutch imipenemase(DIM), Tripoli metallo- β -lactamase(TMB), Kyorin University Hospital imipenemase(KHM)(3).

Het IMP-type enzym heeft 20 varianten die grotendeels verbonden zijn aan geografische locaties, maar ze bezitten de mogelijkheid om intercontinentaal verspreid te worden(25).

Er zijn net als bij de IMP-type enzymen meer dan 20 VIM-type enzymen, en hebben net zoals de IMP-type enzymen een geografische distributie. Maar VIM-1 en VIM-2 hebben een breder distributie vermogen dan de IMP-type enzymen. De VIM-type enzymen zijn uniek binnen de MBL's vanwege de hoge affiniteit voor de carbapenems(25).

Het SIM-1 enzym was het derde MBL-type dat is ontdekt, tot nu toe is SIM-1 alleen nog maar aangetroffen in Brazilië in *P. aeruginosa*. Het NDM-1 enzym is een van de laatste MBL's en komt over de hele wereld voor. Hoewel het eerste NDM-1 enzym werd aangetroffen in een patiënt in Zweden, is aangetoond dat de infectie met *Klebsiella pneumoniae* werd opgelopen in India.

Ondertussen is het NDM-1 enzym ook al aangetroffen in *Acinetobacter baumannii*. De andere MBL-typen(SIM-1, GIM-1, DIM-1, AIM-1, KHM-1 en TMB-1) hebben een kleinere impact op de wereldwijde gezondheid en verspreiden minder gemakkelijk dan de vier boven genoemde typen enzymen(25).

AMBLER KLASSE C: AMPC'S

AmpC- β -lactamasen zijn β -lactamase enzymen waarvan de genen chromosomaal gecodeerd zijn. Veel Gram-negatieve bacteriën(onder andere *P. aeruginosa*) bevatten chromosomaal gecodeerde β -lactamasen. Echter plasmide gecodeerde AmpC β -lactamasen zijn ook beschreven (23). De door plasmide-gemedieerde AmpC- β -lactamasen zijn in 1989 ontdekt en komen voor bij nosocomiale verwekkers en niet nosocomiale verwekkers. De plasmide-gemedieerde AmpC- β -lactamasen komen minder vaak voor dan de chromosomaal-gemedieerde AmpC- β -lactamasen(26).

Het AmpC- β -lactamase is het eerste enzym dat penicilline kon afbreken(26), verder geeft AmpC resistentie tegen cefamycine en oxyimino- β -lactams(21). Wat opvallend is bij de AmpC- β -lactamasen is dat bij overproductie de organismen toch gevoelig blijven voor carbapenem antibiotica(8).

Van chromosomale AmpC- β -lactamasen vindt overproductie plaats als er blootstelling is aan β -lactam antibiotica(8, 26). Dit is niet de meest voorkomende vorm van overproductie van AmpC, de meest voorkomende vorm van overexpressie is door een mutatie(9, 26). De meest voorkomende mutatie is in regulerende genen zoals in het *ampD* gen, daarna komen de mutaties in het *ampR* en *ampG* gen. Deze mutaties resulteren ook in hyperproductie van het AmpC gen. .

AMBLER KLASSE D: OXA'S

De OXA- β -lactamasen lijken veel op Ambler klasse A en C β -lactamasen, deze β -lactamasen hydrolyseren in eerste instantie oxacilline-achtige antibiotica wat niet een eigenschap is van alle Ambler klasse D β -lactamasen. Verder hydrolyseren OXA- β -lactamasen vele andere breed en smal-spectrum β -lactam antibiotica. Wat opvalt

Epidemiologie en resistentie mechanismen van carbapenem-resistente *Pseudomonas aeruginosa*

bij de OXA-type enzymen die carbapenems kunnen hydrolyseren is dat deze OXA-type enzymen geen breed spectrum cefalosporines kunnen hydrolyseren(3, 27).

De OXA- β -lactamasen kunnen op twee manieren voorkomen: 1 plasmide-gemedieerd en 2 chromosomaal-gemedieerd, de eerste bacterie waarin chromosomaal-gemedieerd OXA- β -lactamase werd aangetoond was *Aeromonas jandei (sobria)* en het zorgde voor resistentie tegen cloxaciline en oxacilline. Dit was het OXA-12 enzym. *Ralstonia pickettii* is van nature resistent tegen penicilline, smal-spectrum cefalosporines, ceftazidime en aztreonam. Uit onderzoek naar deze resistenties in *R. pickettii* is gebleken dat deze bacterie twee chromosomaal-gemedieerd OXA- β -lactamasen had, OXA-22 en OXA-60. OXA-22 zorgde voor de resistentie tegen smal-spectrum antibiotica, OXA-60 zorgde voor de resistentie tegen de monobactams, penicillinen en heeft ook een lage hydrolyse activiteit tegen de carbapenems(27).

1.1.3 CARBAPENEMS

Antibiotica horend tot de klasse van de carbapenems worden tot de β -lactam antibiotica gerekend. Er zijn vier klinisch relevante carbapenem varianten: 1 imipenem, 2 meropenem, 3 ertapenem en 4 doripenem. Het zijn zeer potente antibiotica en ze worden als breed spectrum antibiotica ingezet. Om die reden worden ze in ziekenhuizen gebruikt als laatste redmiddel tegen zeer ernstige infecties en ook juist bij infecties veroorzaakt door multiresistente Gram-negatieve bacteriën(4, 28, 29, 30).

Zoals alle andere β -lactam antibiotica bezitten carbapenems een lactam ring gefuseerd aan een secundaire thiazolidine ring. Wat anders is bij carbapenems in vergelijking met penicilline en cefalosporine is het gebrek aan een zwavel atoom in de thiazolidine ring. De zijketen in deze antibiotica beïnvloedt de antimicrobiële activiteit, maar zorgt ook vaak voor instabiliteit (29, 30). Carbapenems binden aan penicillin-binding-proteïns(PBPs), dit zorgt voor schade aan de celwand wat meestal leidt tot dood en lysis van de bacterie. (29, 30). Van alle β -lactam antibiotica zijn de carbapenems de beste antibiotica om in te

zetten tegen Gram-negatieve verwekkers. Ze hebben immers geen last van extended spectrum- β -lactamasen (ESBL's) in vergelijking met andere β -lactam antibiotica maar werken ook tegen sommige oxacillinasen(OXA/OXA- β -lactamasen) en AmpC- β -lactamasen (29).

IMIPENEM

Imipenem is het eerste chemisch stabiele carbapenem en stamt af van thienamycine. Imipenem wordt snel afgebroken in het lichaam door dehydropeptidase I(DHP-I)waar het naast inactivatie ook toxisch kan worden. Om deze reden wordt vaak DHP-I remmer cilastatine toegevoegd, in een verhouding van één op één aan imipenem, zodat imipenem minder snel wordt afgebroken en ter voorkoming van de vorming van een toxisch product. Resistentie tegen imipenem kan door 3 verschillende dingen ontstaan: 1 productie van carbapenemases, 2 verandering van PBPs en 3 verminderde expressie van porie eiwitten(29).

MEROPENEM

Meropenem stamt ook af van thienamycine en heeft in tegenstelling tot imipenem een 1- β -methyl substitutie in de zijketen. Deze 1- β -methyl substitutie zorgt voor een verschil in farmacologische werking ten opzichte van imipenem. Meropenem ondervindt geen significante reactie met DHP-I en heeft dus ook geen hulp nodig van cilastatine. Resistentie tegen meropenem kan door 3 verschillende dingen ontstaan: 1 productie van carbapenemases, 2 verandering van PBP en 3 verminderde expressie van porie eiwitten in combinatie met een verhoogde expressie van de MexAB-OprM efflux pomp(29).

ERTAPENEM

Ertapenem is het minst voorgeschreven carbapenem antibioticum, dit komt omdat het zeer verschillende eigenschappen heeft in vergelijking met imipenem en meropenem. Het wordt waarschijnlijk niet zo vaak voorgeschreven vanwege een hoge renale klaring en een hoge eiwitbinding. Resistentie tegen ertapenem kan

Epidemiologie en resistentie mechanismen van carbapenem-resistente *Pseudomonas aeruginosa*

door 3 verschillende dingen ontstaan: 1 productie van carbapenemases, 2 verandering van PBP en 3 verminderde intracellulaire ophoping(29).

DORIPENEM

Het is momenteel het nieuwste antibioticum binnen de carbapenems. Doripenem heeft een aantal voordelen boven de andere 3 antibiotica in deze klasse zoals: het heeft een lage affiniteit om te binden aan eiwitten, het heeft een relatief lage renale klaring en blijft lang stabiel bij kamer temperatuur waardoor doripenem in infuusvorm kan worden toegediend. Resistentie tegen doripenem kan door 3 verschillende mechanismen ontstaan: 1 productie van carbapenemases, 2 verandering van PBP en 3 verminderde expressie van porie eiwitten in combinatie met een verhoogde expressie van de MexAB-OprM efflux pomp.

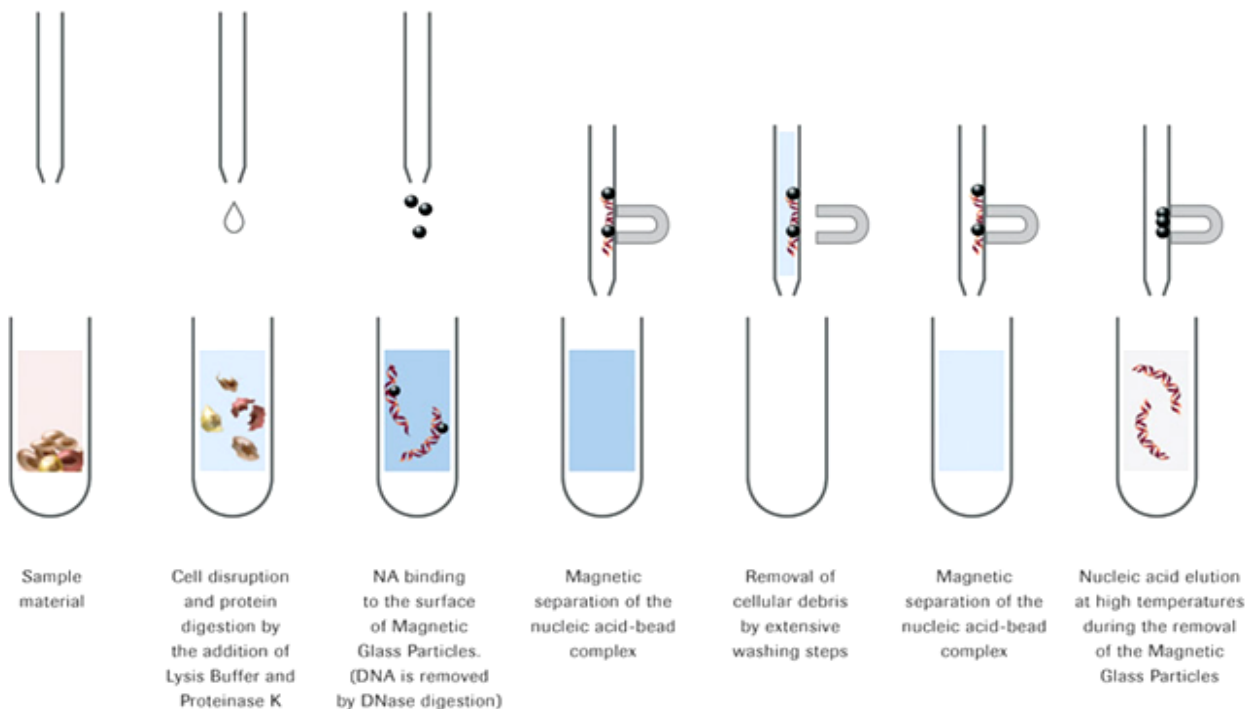
1.2 THEORETISCHE ONDERBOUWING PRAKTIJK ONDERZOEK

Het praktijk onderzoek bestaat uit de volgende onderdelen: de genetische verwantschap wordt onderzocht met behulp van de multiple-locus variable-number tandem-repeat(VNTR) analysis

techniek (MLVA). Bij de bestudering van de doorlaatbaarheid van het buitenmembraan wordt gebruik gemaakt van sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). Hierbij wordt specifiek de aanwezigheid of afwezigheid van het OprD buitenmembraan porie eiwit onderzocht. De detectie van β -lactamasen gebeurt met iso-elektrisch focussen(IEF). Tevens wordt er ook een reverse transcriptie kwantitatieve PCR(RT-qPCR) opgezet om te kijken naar de expressie van het OprD buitenmembraan porie eiwit. In dit gedeelte van het onderzoek worden de belangrijkste technieken beschreven die gebruikt worden in het praktijk gedeelte met uitzondering van de Raman spectroscopie analyse(RA). De RA is alleen hieraan toegevoegd omdat de MLVA resultaten worden vergeleken met RA.

1.2.1 MLVA

Bij deze techniek wordt er gekeken naar het aantal en de grootte van de tandem-repeats in het genoom van een bepaalde bacterie. Het aantal repeats wordt dan vergeleken met de repeats van de andere organismen. De MLVA-techniek werkt als volgt: 1 DNA isoleren uit de bacterie, 2 Het DNA vermeerderen d.m.v. polymerase chain reaction

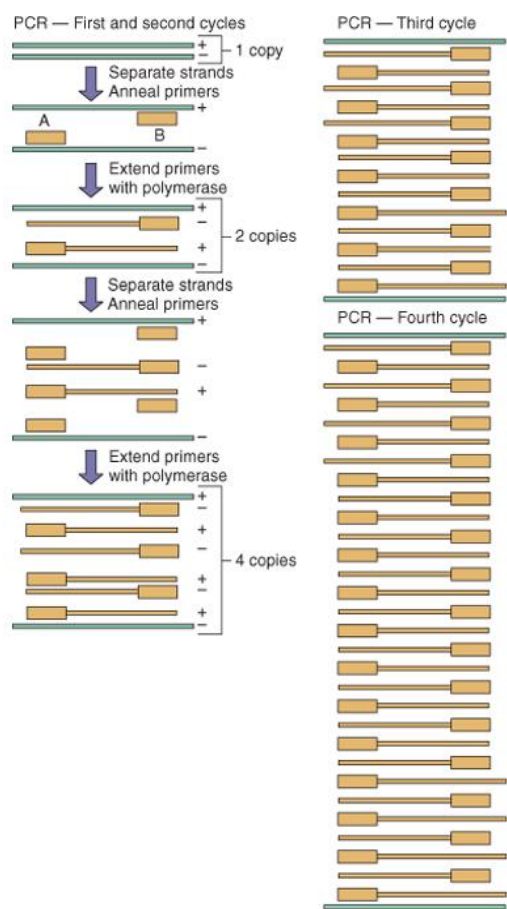


Figuur 1-2-1 De werking van de MagNA Pure LC^(c), cellen worden kapot gemaakt, daarna worden er magnetisch geladen glasdeeltjes aan toegevoegd doe binden aan het DNA. Hierna wordt het DNA losgelaten van de glasdeeltjes wat gebeurt door een magnetisch proces(34).

Epidemiologie en resistentie mechanismen van carbapenem-resistente *Pseudomonas aeruginosa*

(PCR), 3 De grootte van het PCR product zichtbaar maken d.m.v. gel-elektroforese(31, 32, 33). De DNA isolatie wordt uitgevoerd met een MagnaPure LC[®], en werkt doordat DNA bindt aan magnetische glasdeeltjes. (figuur 1.2.1)

Een PCR is een reactie waarbij DNA wordt vermenigvuldigd, een PCR werkt als volgt: 1 denaturatie om de strengen van het target DNA los te krijgen van elkaar, 2 Afkoelen zodat de primers kunnen binden op het target DNA, 3 DNA synthese met behulp van Taq polymerase(35). Deze 3 stappen worden een aantal keren herhaald.(figuur 1.2.2)



Murray et al: Medical Microbiology, 6th Edition.
Copyright © 2009 by Mosby, an imprint of Elsevier, Inc. All rights reserved.
Figuur 1-2-2 Polymerase chain reaction (PCR). This technique is a rapid means of amplifying a known sequence of DNA. A sample is mixed with a heat-stable DNA polymerase, excess deoxyribonucleotide triphosphates, and two DNA oligomers (primers), which complement the ends of the target sequence to be amplified. The mixture is heated to denature the DNA, then cooled to allow binding of the primers to the target DNA and extension of the primers by the polymerase. The cycle is repeated 20 to 40 times. After the first cycle, only the sequence bracketed by the primers is amplified. In the RT-PCR technique, RNA can also be amplified after its conversion to DNA by reverse transcriptase. A and B, DNA oligomers used as primers; + and -, DNA strands (11).

Bij de MLVA techniek worden de verkregen PCR-producten door middel van agarose gel elektroforese gescheiden. Agarose is een polysacharide dat een poriebevattende gel kan vormen. Agarose gel elektroforese werkt als volgt: 1 de agarose gel wordt onder spanning gezet 2 het DNA zal dankzij de negatieve lading en de loading buffer naar de positieve pool bewegen, 3 de afmetingen van de poriën bepalen welke fragmenten van DNA door kunnen bewegen naar de positieve pool en welke worden tegen gehouden, 4 door toevoeging van ethidium bromide word het DNA zichtbaar onder ultraviolet(UV) licht d.m.v. intercalatie(35, 36).

Aan het eind van het elektroforese-proces moet er nog bepaald worden hoe groot het PCR product is. De grootte van het product wordt vergeleken met de bekende producten van de positieve controle stam en kan berekend worden met de volgende formule:

Aantal repeats=(product - primer grote links - primer grote rechts)/grote van een enkel repeat.

MLVA is één van de vele typeringsmethoden. Het voordeel van MLVA is dat er relatief lage kosten mee zijn gemoeid. Een ander voordeel is dat MLVA toegepast kan worden op een groot aantal monsters en de resultaten tussen laboratoria met elkaar vergeleken kunnen worden (31-33).

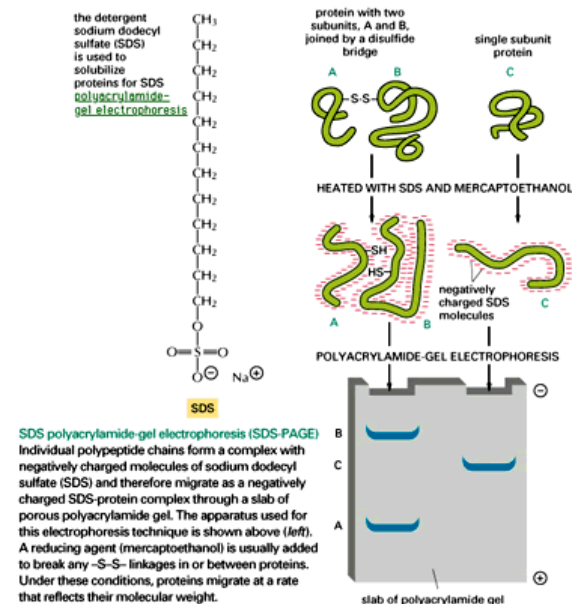
1.2.2 SDS-PAGE

Elektroforese in polyacrylamide gels in anionische sodium-dodecyl sulfaat kan gebruikt worden voor scheiding en identificatie van eiwitten. De identificatie van eiwitten kan worden verkregen aan de hand van de massa van het eiwit(35- 39). De SDS-PAGE werkt als volgt: 1 eiwitten worden opgelost in SDS waarbij alle eiwitten een negatieve lading krijgen, 2 de negatief geladen eiwitten worden op de zelfde manier geëlektroforeerd als bij een agarose gel(35-38). Het verschil tussen een agarose gel en een polyacrylamide gel is dat een polyacrylamide gel specifiek kan scheiden op grootte doordat de poriën veel beter zijn in te stellen met behulp van het polymerisatie proces(35, 36). (figuur 1.2.3)

Epidemiologie en resistentie mechanismen van carbapenem-resistente *Pseudomonas aeruginosa*

De SDS-PAGE techniek wordt in het huidige onderzoek gebruikt om het ontbreken van een bepaald eiwit (46 kDa) bij carbapenem-resistente stammen te onderzoeken.

Om in de in dit onderzoek buitenmembraan eiwitten te verkrijgen is er gebruik gemaakt van de vries/dooi techniek in combinatie met sonificatie en daarna is er gebruik gemaakt van een cell enveloped sarkosyl extraction om outer membrane vesicles(OMV's) te maken. Deze OMV's worden gebruikt in de SDS-PAGE(38, 39, 40).

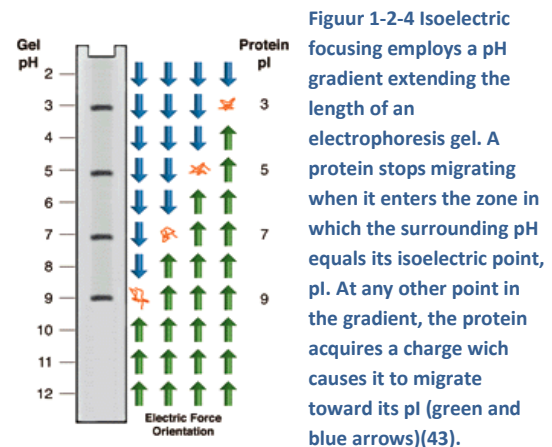


Figuur 1-2-3 Individual polypeptide chains form a complex with negatively charged molecules of sodium dodecyl sulfate(SDS) and therefore migrate as a negatively charged SDS-protein complex through a slab of porous polyacrylamide gel. A reducing agent (mercaptoethanol) is usually added to break any -S-S- linkages in or between proteins. Under these conditions, proteins migrate at a rate that reflects their molecular weight.(41)

1.2.3 IEF

Iso-elektrisch focussen is een techniek waarbij eiwitten worden gescheiden en kunnen worden geïdentificeerd op grond van de lading van het eiwit. Dit kan doordat bij de elektroforese het eiwit zich door de gel beweegt. De gel bevat een pH gradiënt en afhankelijk van de aminozuursamenstelling van het eiwit, is het eiwit bij een bepaalde pH netto neutraal. Deze pH wordt ook wel het iso-elektrisch punt(pI) genoemd, als de pH groter is dan de pI is het eiwit positief geladen, en als de pH kleiner is dan de pI is het eiwit negatief geladen(34, 42). (figuur 1.2.4)

Voor dit onderzoek wordt er met IEF onderzocht of de carbapenem-resistente *P.aeruginosa* stammen hun resistentie te danken hebben aan AmpC- β -lactamase in combinatie met verminderde doorlaatbaarheid.



Voor de meeste bacteriën die AmpC- β -lactamasen produceren geldt dat het isoelektrisch punt boven de 8 ligt(26)s. Bij *Escherichia coli* is er een verschil te zien in de chromosomale-(~9) en plasmide-(~8,1) gemedieerde AmpC- β -lactamase pI's(44, 45). In *P.aeruginosa* komt AmpC altijd chromosomaal voor. De pI van chromosomaal-gemedieerd AmpC in *P.aeruginosa* is ~8,7. (46). Wat er dus aangetoond moet worden met IEF is een bandje bij een pH van 8,7 als het isolaat AmpC positief is. Daarnaast wordt in dit onderzoek ook gekeken naar de aanwezigheid van plasmide gecodeerde beta-lactamasen.

1.2.4 RT-QPCR

Het verschil tussen een reverse transcriptase kwantitatieve polymerase chain reaction en een normale PCR is dat de beginstof uit RNA bestaat in plaats van DNA en dat tijdens de polymerase chain reaction er door middel van fluorescentie de hoeveelheid geproduceerd DNA vastgesteld kan worden.

De RT-qPCR werkt als volgt: het RNA wordt omgezet door reverse transcriptase tot cDNA en met het cDNA wordt met specifieke primers en een probe/kleurstof een normale PCR uitgevoerd. Tijdens de PCR reactie wordt de probe afgebroken of zal een kleurstof aan het DNA binden door het toenemen van de hoeveelheid DNA neemt ook de hoeveelheid licht dan toe. De verhouding tussen licht en hoeveelheid DNA is lineair.

Probes: de meest gebruikt probe is de TaqMan probe, de TaqMan probe is een primer met aan de ene kant een fluorescerend molecuul(Fluor carrier) en aan de andere kant een molecuul dat de fluorescentie opvangt(Quencher). Dit gebeurt door Fluorescence Resonance Energy Transfer(FRET). Als de primer wordt afgebroken door Taq polymerase wordt de afstand tussen de Fluordrager en de Quencher te groot waardoor de Quencher het licht van de Fluordrager niet meer kan opvangen. De voordelen van een probe zijn: de specificiteit en bruikbaarheid bij multiplex(PCR op verschillende onderdelen)

Kleurstof: de kleurstof die het meest wordt gebruikt is SYBR Green, SYBR Green is een kleurstof die bindt aan dubbelstrengs DNA. Zodra het aan het DNA is gebonden wordt er licht uitgezonden. De voordelen van SYBR Green zijn: de prijs en zonder moeilijkheden te gebruiken.

Binnen de RT-qPCR zijn er twee mogelijkheden: een 1-staps RT-qPCR en een 2-staps RT-qPCR. Allebei de mogelijkheden hebben zo hun eigen voor- en nadelen(tabel 1-2-1).

Tabel 1-2-1 De voor- en nadelen van de 1-staps en 2-staps RT-qPCR(47)

Type	1-staps RT-qPCR	2-staps RT-qPCR
Voordelen	Minder werk Geen contaminatie tussen de RT en de qPCR Minder achtergrond straling bij gebruik van SYBR	Hogere efficiëntie vanwege willekeurige primers die gebruikt kunnen worden Mogelijkheid tot bewaren van cDNA voor meerdere doeleinden Flexibeler voor meer optimalisatie
Nadelen	Geen mogelijkheid voor de verwijdering van dUTP's Minder gevoelig dan een 2-staps RT-qPCR	RNase remmers die de PCR kunnen beïnvloeden Hogere achtergrond straling bij gebruik van SYBR

De hoeveelheid DNA waarmee men is begonnen, kan men berekenen. Deze berekening is afhankelijk van de drempelwaarde(Ct). De drempelwaarde is de hoeveelheid licht die nodig is om gedetecteerd te worden. Zoals eerder al is beschreven is er een verband tussen de hoeveelheid licht en de hoeveelheid DNA. Om te berekenen met hoeveel DNA er is begonnen kan de volgende formule gebruikt worden: (hoeveelheid DNA die nodig is om de Ct te halen)/2^{Ct}(47).

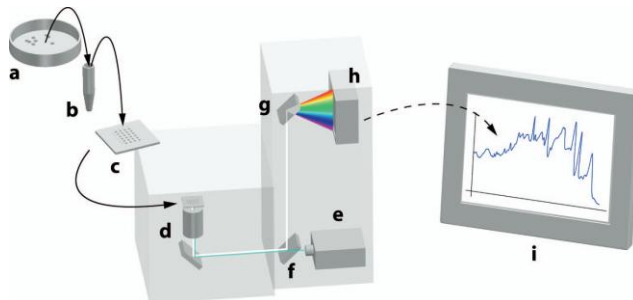
In de RT-qPCR die is ontwikkeld wordt gekeken naar de mRNA expressie van het OprD gen ten opzichte van het rpoD huishoud gen. Om de expressie uit te rekenen kan gebruik worden gemaakt van de formule: 2^{Ct rpoD-Ct OprD}. Hieruit kan dan meteen opgemaakt worden wat de genexpressie is van OprD in verhouding tot die van rpoD.

De primers en de criteria voor een verminderde expressie zijn overgenomen van Quale et al.(48, zie ook bijlage 1).

1.2.5 RA

Raman spectroscopie analyse is een techniek die vele toepassingen kent, waaronder ook typeren van bacteriën. Deze techniek is gebaseerd op het inelastisch strooien van monochromatisch licht door moleculen. De verandering in golflengte is specifiek per molecuul en kan worden weergegeven in een Raman spectrum. Dit kan worden gebruikt om te typeren omdat het een compleet beeld geeft van de moleculaire samenstelling van een monster. Omdat micro-organismen op moleculair niveau van elkaar verschillen kan dit worden weergegeven in een Raman spectrum dat gebruikt kan worden voor epidemiologisch onderzoek(49, 50).(figuur 1-2-6)

Uit onderzoek is ook al gebleken dat RA een goed te gebruiken, snelle en betrouwbare typeringsmethode is. Het typeren van 24 isolaten duurt ongeveer 60 minuten. (50).



Figuur 1-2-6 Overview of Raman procedure and spectrometer. Biomass from a bacterial culture (a) on TSA medium is collected using a 1 µl inoculation loop and suspended in 5 µl of demineralized water (b). After a brief centrifugation step to remove air bubbles, the wet pellet is transferred onto a fused silica slide (c), where it is allowed to dry (a typical slide holds 24 samples). The slide with the dried biomass is placed in the measurement stage (d), where the samples are illuminated with laser light (e). The Raman signal generated is collected along the same optical path and separated from the laser light using an optical filter (f) that only reflects light of a higher wavelength than the laser. The laser light is passed through. The wavelength of the Raman signal is dispersed on an optical grating (g) and collected using a near-infrared-optimized charge-coupled device detector (h). The Raman spectra are gathered, stored, and analyzed on a personal computer (i)(50).

2.0 MATERIAAL EN METHODE

Alle isolaten (n=127) gebruikt in het huidig onderzoek zijn afkomstig van een Nederlandse multi-center studie. Voor start van de analyses werden betrokken isolaten uit de vriezer gehaald en werd eerst een reinkweek gemaakt.

Als controle stammen is gebruik gemaakt van 2 verschillende stammen. De PA01 stam, een stam die genetisch wordt gezien als het nul punt van alle *Pseudomonas aeruginosa*'s. En de ATCC 27853 stam, deze stam is voor de meeste antibiotica gevoelig en wordt in de medische microbiologische diagnostiek gebruikt ter vergelijking van resistentie patronen.

Alle groei media zijn afkomstig van Becton Dickinson and company, Franklin Lakes Verenigde Staten.

Alle chemicaliën zijn afkomstig van Sigma Aldrich Chemie bv., St. Louis Verenigde Staten, tenzij anders is vermeld.

2.1 GENOTYPERING MET BEHULP VAN MLVA

Het protocol wat hier voor als basis heeft gediend is afkomstig uit het artikel van Vu-Thien et al(32). Als een stam, na drie keer testen alsnog niet kon worden getypeerd, is er bij het ontbrekende locus 99 ingevuld.

2.1.1 DNA ISOLATIE

De DNA isolatie is uitgevoerd met het MagNA Pure LC system & software v3.03 met de MagNA Pure DNA isolation kit III (Bacteria, Fungi) van Roche(Basel Zwitserland).

Bacteriën werden gesuspenseerd in 100µl water. Vervolgens werd 130µl Bacteria Lysis Buffer toegevoegd en werd de suspensie goed gemengd. Daarna werd 20µl Proteinase K toegevoegd en wederom gemixt. Na mixen wordt de suspensie 10minuten verwarmd bij 65°C en daarna 10minuten op 95°C. Dit moest uiteindelijk gecentrifugeerd worden en in een Sample Cartridge gestopt worden. Hierna werden de aanwijzingen van de software gevolgd en werd het

DNA geïsoleerd. Na de isolatie werd de DNA concentratie bepaald met de ND-1000 Spectrophotometer(NanoDrop, Wilmington Verenigde Staten) bij een golflengte van 230nm. Hierbij werd eerst 1µl H₂O op het oogje gepipetteerd en daarna Elution Buffer toegevoegd om de blanco in te stellen. Daarna wordt 1µl geëxtraheerd DNA op het oogje gepipetteerd.

2.1.2 POLYMERASE CHAIN REACTION

Er zijn twee PCR mixen gebruikt: voor de eerste 32 isolaten werd de volgende mix gebruikt per PCR reactie: 12,5µl HotStar Taq DNA polymerase Master Mix (Qiagen, Venlo Nederland), 2µl primer L en primer R(primers in tabel 2-1), 5µl Q buffer (QIAGEN) en 3,5µl H₂O. Voor de andere isolaten is de volgende mix gebruikt per PCR reactie: 12,5µl HotStar Taq DNA polymerase Master Mix, 2µl primer F en primer R, 2,5µl Betaine (Sigma Aldrich Chemie bv.) en 6µl H₂O. Aan 25µl mix werd 2µl geïsoleerd DNA toegevoegd en wordt de PCR gestart in een T3000 Thermocycler (Biomtra, Göttingen Duitsland). Het volgende programma werd hierbij gebruikt: 15min. 95°C, 10cycli touchdown(30sec 94 °C, 30sec 65 °C tot 55 °C en 1min 72 °C) en daarna 30 cycli van 30sec 94 °C, 30sec 55 °C, 1min 72 °C en eindigend met 10min 72°C wat werd afgesloten met oneindig 4°C.

2.1.3 AGAROSE GEL ELEKTROFORESE

Er werd gebruik gemaakt van 2 % agarose gelen. Deze gel bestond uit 300ml 0,5x TBE(ThermoFisher Scientific) met 6gr agarose(Sphaero Q Hispanagar, Gorinchem Neederland) en 10µl ethidiumbromide. In totaal kunnen op dergelijke gel 34 PCR-producten worden geladen in combinatie met 100 bp Plus ladder (ThermoFisher Scientific) De PCR-producten werden als volgt voorbereid: 5µl 6x DNA Loading Dye(ThermoFisher Scientific) met 10µl PCR-product. De ladders werden als volgt bereid: 5µl 6x DNA Loading Dye met 9µl H₂O en 1µl 100bp ladder. Vervolgens wordt 15µl van bovenstaande mix in elk van de "slotjes" aangebracht. De gel werd gekoppeld aan een PowerPac Basic(Bio-rad, Hercules Verenigde Staten) voeding waarbij een stroomsterkte is gebruikt van 100mA per gekoppelde gel. Electroforese werd gedurende 60-

Epidemiologie en resistentie mechanismen van carbapenem-resistente *Pseudomonas aeruginosa*

Tabel 2-2-1 Gegevens gebruikte primers en loci

Locus naam	Primer naam	Primer sequentie	Repeat grootte(bp)	Product grootte in PA01(bp, aantal repeats)
ms77	Ms77L Ms77R	GCGTCATGGTCTGCATGTC TATACCCTCTTCGCCAGTC	39	442, 4
ms127	Ms127L Ms127R	CTCGGAGTCTCTGCCAACTC GGCAGGACAGGATCTCGAC	15	210, 8
ms142	Ms142L Ms142R	AGCAGTGCCAGTTGATGTTG GTGGGGCGAAGGAGTGAG	115	890, 7
ms211	Ms211L Ms211R	ACAAGCGCCAGCCGAACCTGT CTTCGAACAGGTGCTGACCGC	101	663, 5
ms213	Ms213L Ms213R	CTGGGCAAGTGTTGGTGGATC TGGCGTACTCCGAGCTGATG	103	640, 5
ms215	Ms215L Ms215R	GACGAAACCCGTCGCGAACA CTGTACAACGCCGAGCCGTA	129	765, 4
ms216	Ms216L Ms216R	ACTACTACGTCGAACACGCCA GATCGAAGACAAGAACCTCG	113	543, 3
ms217	Ms217L Ms217R	TTCTGGCTGTCGCGACTGAT GAACAGCGTCTTTCTCTCGC	109	606, 3
ms223	Ms223L Ms223R	TTGGCAATATGCCGGTTCGC TGAGCTGATCGCTACTGG	106	454, 4

70 minuten uitgevoerd.

Het resultaat van de elektroforese wordt met het blote oog beoordeeld op het voorkomen van het aantal repeats met behulp van tabel 2-1-2.

Daarnaast werd ook nog het onderscheidend vermogen van de MLVA techniek vast gesteld met behulp van de Hunter Gaston Discriminatory Index(HGDI)(51)

2.2 EXPRESSIE VAN HET OPRD PORINE EIWIJ MET BEHULP VAN SDS-PAGE

Het protocol hiervan is gebaseerd op Pereira SG et al.(38), Tam VH et al.(39), op Lynch MJ et al.(40) en op Masuda N et al.(52).

2.2.1 NEGATIEVE CONTROLE

Voor het maken van de negatieve controle is isolaat PA01 gebruikt. Van de PA01 stam werd een overnacht cultuur in lysogeny broth gebruikt. Van deze overnacht cultuur werd 200µl van de suspensie gepipetteerd op Mueller Hinton II agar(MH II agar) platen. Deze platen bevatten een oplopende tweevoudige concentratiereeks van imipenem monohydraat van 0,125– 32µg/ml. Van de mutanten groeiend bij de hoogste concentratie imipenem werd de MIC vastgesteld met behulp van e-test en/of VITEK 2. Vervolgens werd deze selectie herhaald door wederom van de mutanten een overnacht cultuur te maken en weer 200 µl platenop reeksen van MH II agarplaten met imipenem/cilastatine ((500mg/500mg poeder voor oplossing voor infusie) Fresenius Kabi, Bad Homburg Duitsland) ingezet met een concentratie van 0-128µg/ml imipenem. Ter controle van de MICs werd een vitek antibiogram(Biomérieux) ingezet en SDS-PAGE uitgevoerd van de buitenmembraan eiwitten.

2.2.2 ISOLATIE VAN OUTER MEMBRANE VESICLES(OMV'S)

Vanuit een overnacht cultuur in LB werd de dichtheid van de cultuur bepaald met een Starrcol SC-60-S op OD618, daarna werd de suspensie overgegoten in een Falcon buis en 10 minuten bij 4000rpm gecentrifugeerd. Vervolgens wordt het supernatant afgegoten. Het pellet werd daarna gesuspenseerd in trilbuffer(50mM Tris-Cl pH 8,5, EDTA& 1%NP40(Igepal-CA630, Sigma Aldrich Chemie bv.).

Tabel 2-2-2 Grote aantal repeats per locus

VNTR locus	0,5	1	1,5	2	2,5	3	3,5	4	4,5	5	6	7	8	9
ms77			352	364	388	403		442		481	520			
ms127													210	225
ms142	150	201		216	400	430	500	545		660	786	890		
ms211				360		461		562	600	663	764	865	966	
ms213		221	280	331		434		537	585	640	764	865	966	
ms215		378		507	550	636		765		894	1023			
ms216		315		430		543		656						
ms217		497	551	606		715		824		933	1042			
ms223			200	242		348		454		560	666	782		

Epidemiologie en resistentie mechanismen van carbapenem-resistente *Pseudomonas aeruginosa*

Daarna werd er 30µl protease inhibitor(ProteaPrep Protease Inhibitor Cocktail, Protea biosciences, Morgantown Verenigde Staten) aan toegevoegd.

Hierna werden de buizen met geresuspendeerde cellen bij -80 °C in gevoren gedurende 30 minuten of gedurende 5 minuten in vloeibare stikstof. Na het invriezen werden de buizen ontdooid. Deze procedure werd 2x herhaald. Hierna werd de suspensie gesonificeerd met een Soniprep 150(SANYO, Watford Groot Brittannië) totdat de suspensie helder werd. Vervolgens werd aan 1ml helder lysaat 250µl 10% Sarkosyl(N-lauroylsarcosine) toegevoegd en gedurende 30 minuten geïncubeerd en hierna gedurende 30 minuten bij 14.000rpm gecentrifugeerd. Supernatant wordt afgegoten en het pellet werd geresuspendeerd in een Tris-bufler(2mM Tris-HCl pH 7,5) met behulp van sonificatie.

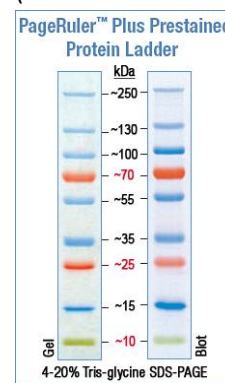
2.2.3 SDS MONSTER VOORBEREIDING

Er werd een loading buffer gemaakt die bestond uit TECEP(ThermoFisher Scientific) met 2x Laemmli monster buffer(Bio-Rad) in een verhouding van 1 op 9. Één volume loading buffer werd toegevoegd aan één volume monster werd verhit bij 95°C gedurende 10 minuten. De monsters worden vervolgens afgekoeld en afgedraaid voordat ze op de gel werden geladen.

2.2.4 SDS-PAGE

Vooraanvang werden eerst de glasplaten schoongemaakt en in het casting frame gezet waarbij werd gecontroleerd of de opstelling niet lekte. Separating gel gemaakt met daarin: 6/7,5ml 40% acryl/bis 37,5:1(Bio-Rad), 5ml separating buffer(1,5M Tris pH 8,8), 8,66/7,16ml aqua dest, 200µl 10%SDS, 125µl 10%APS(Bio-Rad) en 20µl TEMED(Bio-Rad). Dit werd gemengd en tussen de glasplaten gegoten, waarna er nog een laagje aqua dest op het acryl werd gepipetteerd zodat de gel recht werd en luchtbellen er uit zouden verdwijnen. Dit blijft voor minstens 30 minuten bij KT staan om te polymeriseren. Na het polymeriseren werd het water verwijderd en werd er een stacking gel(5%) toe gevoegd, de stacking gel bestond uit dezelfde ingrediënten als de separating gel maar in plaats van separating buffer

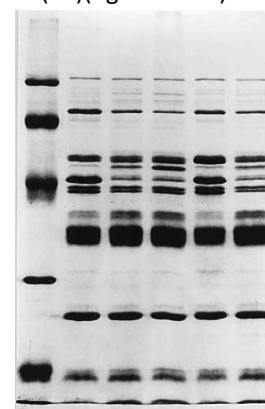
werd er stacking buffer(0,5M Tris pH 6,8) gebruikt. De stacking gel werd bovenop de separating gel gepipetteerd en hierbij wordt tevens een "kam" geplaatst en blijft de gel bij kamertemperatuur staan gedurende 30 minuten ter polymerisatie. De gel werd daarna geplaatst in de clamping frame en die werd geplaatst in de electrode assembly. Dit werd uiteindelijk geplaatst in de elektroforese tank waarna de kam uit de gel werd gehaald. Hierna werden de "slotjes" in de gel gewassen met elektroforese buffer(14,4 gram glycine, 3 gram Tris, 1 gram SDS per een liter aqua dest). Hierna werd er 10 µl monster in de uitsparing gepipetteerd en ook 2µl ladder (ThermoFisher Scientific(figuur 2-2-1)).



Figuur 2-2-1 PageRuler plus prestained protein ladder

De gel werd er gedurende minimaal anderhalf uur geëlektroforeerd bij 22 mA.

Hierna werd de gel in een bakje gedaan met een klein laagje Instant Blue staining solution (Expedeon, Harston GB). De gel werd minstens 1 uur geïncubeerd op een schudplateau waarna het instant blue werd afgegoten en werd de gel vervolgens gespoeld met kraanwater. Hierna werd er een foto gemaakt van de gel en geanalyseerd op de aanwezigheid van een 46 kDa bandje. Hierbij werden de verkregen bandenpatronen vergeleken met de resultaten uit het artikel van Masude et al.(51)(figuur 2-2-2).



Figuur 2-2-2 Bandenpatroon met waarbij in de ladder (links) het 3^e bandje van boven een bandje van 45kDa te zien is(49).

2.3 SCHEIDEN VAN BETA-LACTAMASEN MET BEHULP VAN IEF

2.3.1 ISOLATIE VAN B-LACTAMASEN

Als eerste wordt de dichtheid van een overnacht cultuur in Todd Hewitt (TH) broth bepaald met een Starrcol SC-60-S op OD660. Van deze suspensie werd een bepaald volume in een Falconbuis overgebracht afhankelijk van de OD. En 10 minuten bij 4000rpm gecentrifugeerd. Het supernatant wordt afgegoten en het pellet geresuspendeerd in 1ml 25% sucrose, 10mM Tris pH7,5 door voorzichtig op en neer te pipetteren. Hieraan werd 10µl lysozym (20mg/ml, Protea biosciences) en 2ml 1,5mM EDTA pH7,5 toegevoegd. Dit werd voorzichtig met de hand gemengd door de buis rond te draaien, hierna werd het voor minstens 55 minuten op ijs gezet. Na 55 minuten werd er 15µl protease inhibitor (Protea biosciences) toegevoegd en werd de suspensie verdeeld over 3 epjes. Aan de 3 epjes werden per epje ±18 glasparsels van 3mm toegevoegd waarna de epjes werden geschud middels de Fastprep-24 (MP, Republiek van Singapore) gedurende 15s met een snelheid van 6m/s. De vloeistof werd hierna overgepipetteerd in schone epjes.

2.3.2 IEF

Bij het iso-elektrisch focussen werd het PhastSystem Separation and Control unit (GE Healthcare Life sciences, Waukesha Verenigde Staten) ingesteld op 4°C, daarna werd er 60µl water aangebracht op de plaats waar de PhastGel 3-9 (GE Healthcare Life sciences) kwam te liggen. De gel werd zonder luchtbellen aangebracht. Het overtollige water werd verwijderd met een tissue. Daarna werd de methode voor de PhastGel 3-9 gestart zodat de juiste pH's in de gel werden gevormd en werden de monsters bereid.

De monsters werden bereid door een laagje parafilm over de Sample-well stamp (GE Healthcare Life sciences) te drukken waarop 8µl monster per well op werd gepipetteerd, daarna werd de PhastGel sample applicator (6/4) (GE Healthcare Life sciences) op de uitsparing aangebracht. Door capillaire werking wordt het monster op de

PhastGel sample applicator overgebracht. Het Phast system werd hierbij op pauze gezet en werd vervolgens de PhastGel sample applicator in het midden van de sample applicator arm geplaatst waarna de run werd hervat. Bij het verstrijken van 275 voltuur werd het systeem gestopt. Hierna werd de gel overgoten met Nitrocefin 0,5mg/ml (Oxoid, Hampshire Groot Brittannië) opgelost in 1,9ml fosfaatbuffer (pH7)(Oxoid) en 0,1ml dimethylsulfoxide (Oxoid) gedurende 15 minuten. Het nitrocefin wordt vervolgens afgespoeld met kraan water. Op de plaatsen waar zich de β-lactamase bevindt, kleurt de gel rood aan. Resultaat wordt gefotografeerd en geanalyseerd.

2.4 OPRD EXPRESSIE BEPALING MET BEHULP VAN RT-QPCR

Dit onderdeel is zo ingedeeld dat er in 2.4.1 gekeken wordt naar de werking van de primers en de optimale annealingstemperatuur van de primers, daarna wordt er beschreven wat er allemaal is gedaan om de qPCR zelf te optimaliseren. Dat onderdeel bestaat uit de methode van hoe het RNA wordt verwerkt tot gegevens over de genexpressie.

2.4.1 RT-QPCR OPTIMALISATIE

ISOLATEN

Uit de collectie werden willekeurig isolaten gekozen ter controle van de ontwikkelde PCR en ter optimalisatie. Daarnaast is voor de optimalisatie van de qPCR gebruik gemaakt van ATCC 27853 RNA in een concentratie van 50ng/µl.

PCR

De PCR werd uitgevoerd met de volgende mix: 5µl 10xPCR buffer (ThermoFisher Scientific) 0,5µl 10mM dNTP mix (ThermoFisher Scientific) 0,5µl primer F, 0,5µl primer R, 0,8µl Taq polymerase (ThermoFisher Scientific) en 6,5µl H₂O. Hieraan werd 5µl DNA aan toegevoegd. Het programma had de volgende basis: 5 minuten 95°C, 1 minuut 95°C, 45s de te testen annealingstemperatuur °C, 1 minuut 72°C, 10 minuut 72°C en ∞ 4°C, met 30 cycli.

Epidemiologie en resistentie mechanismen van carbapenem-resistente *Pseudomonas aeruginosa*

De PCR werd uitgevoerd in een GeneAmp PCR Systems 9700(Applied Biosystems, Foster City Verenigde Staten).

OPRD PRIMERS

Primer F: CTACGGCTACGGCGAGGAT, smelt annealingtemperatuur: 55,4°C

Primer R: GACCGGACTGGACCACGTACT, smelt temperatuur: 58,3°C

Product: 71bp

RPOD PRIMERS

Primer F: GGGCTGTCTCGAATACGTTGA, smelt annealingtemperatuur: 54,4°C

Primer R: ACCTGCCGGAGGATATTTC, smelt annealingtemperatuur: 53,8°C

Product: 90bp

ELEKTROFORESE

Na de PCR werd er 10µl PCR product op een 2% agarose gel(200ml 0,5 TBE met 4 gram agarose(Sphaero Hispanagar)gebracht met 5µl 6x Loading Dye waarin 7,5µl Ethidiumbromide zat. Daarnaast werden ook aan weerszijden 5µl 50bp DNA Ladder ready-to-use(GeneRuler, ThermoFisher Scientific) toegevoegd om de grootte van de gevormde banden te controleren.

2.4.2 RNA ISOLATIE

Het RNA werd geïsoleerd met de RNeasy Mini Kit(Qiagen), waarvan uit het handboek de methode voor bacteriën is opgevolgd.

Bacteriën werden geoogst middels centrifugatie bij 5000g voor 5 minuten bij 4 C. Het supernatant werd verwijderd en het pellet werd opgelost in TE buffer(10mM TrisCl 1mM EDTA pH 8,0) met 400µg/ml lysozym(Isogen, De Meern Nederland). Hierna is er RLT buffer toegevoegd en 96% ethanol. Suspensie werd op een kolom gebracht en gecentrifugeerd gedurende 15 seconden bij 8000g. Dit werd een keer herhaald met RW1 buffer en daarna nog twee keer met RPE buffer. Hierna werd de verzamelbuis onder de kolom vervangen. Om het RNA van de kolom te verwijderen werd er 50µl

RNase vrij water op de kolom gedaan en gecentrifugeerd. Hierna werd de concentratie RNA gemeten met de ND-1000 Spectrophotometer(NanoDrop).

2.4.3 RNA ZUIVERING

De RNA zuivering bestond uit twee onderdelen: het verwijderen van DNA met de Turbo DNA-free Kit(Ambion, Carlsbad Verenigde Staten) en het wassen met de RNeasy MiniElute Cleanup Kit(Qiagen). Bij beide kitjes is het protocol gevolgd zoals is aangegeven door de fabrikant. Aan het eind van de zuivering is ook met de ND-1000 Spectrophotometer(NanoDrop) de concentratie RNA gemeten.

VERWIJDERING VAN DNA

Aan 50µl RNA werd 5µl TURBO DNase toegevoegd, dit wordt vervolgens 30 min geïncubeerd. TURBO DNase wordt bereid door 1 µl TURBO DNase toe te voegen aan 10x DNase buffer. Na incubatie werd 5,6µl DNase inactiverend reagens toegevoegd. Dit werd 2 minuten geïncubeerd en werd tijdens de incubatie drie keer gemengd. Hierna werd er anderhalve minuut gecentrifugeerd bij 10.000g en werd het supernatant met RNA in een schoon epje over gepipetteerd.

WASSEN VAN RNA

Het RNA werd vervolgens met (38,4µl) RNase vrij water aangevuld tot een volume van 100µl. Hieraan werd 350µl RLT buffer(Qiagen) en 250µl 100% ethanol toegevoegd en dit geheel werd gemixt en overgebracht op een RNeasy MiniElute spin kolom die geplaatst was in een 2ml verzamelbuis. Dit werd op dezelfde wijze gecentrifugeerd als bij de RNA isolatie. De verzamelbuis werd hierna vervangen en er werd RPE buffer aan de kolom toegevoegd die weer werd gecentrifugeerd. Hierna werd de verzamelbuis geleegd en werd er 80% ethanol op de kolom gepipetteerd waarna er 2 minuten gecentrifugeerd werd bij 8000g. De verzamelbuis werd weer vervangen en er werd vervolgens 5 minuten gecentrifugeerd bij de maximale snelheid(15.000g) met de klep van de kolom open,

Epidemiologie en resistentie mechanismen van carbapenem-resistente *Pseudomonas aeruginosa*

de verzamelbuis werd weggegooid en de kolom werd in een 1,5ml epje geplaatst.

Hierna werd 14µl RNase vrij water direct in het midden van de kolom gepipetteerd en gedurende 1 minuut gecentrifugeerd bij 15.000g.

Na afloop van de qPCR werden de resultaten verwerkt in 7500 Fast System SDS software v.1.3.1 software waarmee de genexpressie werd berekend

2.4.4 REVERSE TRANSCRIPTIE REACTIE

Voor de reverse transcriptie reactie werd er gebruik gemaakt van de Reverse Transcriptase Core kit(Eurogentec, Seraing België). Het protocol is conform de Technical Data Sheet van Eurogentec Reverse Transcriptase Core kit toegepast.

De reverse transcriptase reactie mix(RT reactie mix) bestond uit de volgende componenten van Eurogentec: 10x reaction buffer, 25mM MgCl₂, 2,5mM dNTP, Random nonamer of Oligo d(T)₁₅ VN, RNase Inhibitor, Euroscript reverse transcriptase en RNase free water. Hiervan werd 9µl gemengd met 1µl monster en dit werd voordat het in de Veriti 96 well Thermal Cycler(Applied Biosystems)ging nog voor 15 seconden gecentrifugeerd bij 14000 rpm. Het programma dat werd gebruikt was: 10 minuten bij 25°C, 30 minuten bij 48°C, 5 minuten bij 95°C en oneindig bij 4°C.

2.4.5 KWANTITATIEVE PCR

Voor de kwantitatieve PCR werd gebruik gemaakt van de MESA FAST qPCR MasterMix Plus for SYBR Assay Low ROX kit(Eurogentec). , Het protocol is conform de Technical Data Sheet van Eurogentec MESA FAST qPCR MasterMix Plus for SYBR Assay Low ROX kit toegepast.

De reactie mix bestond uit de volgende componenten: 2x reaction buffer, de primers OprD of rpoD van Quale et al.(48), RNase vrij water en magnesiumchloride van 50mM uit de kit. Hiervan werd 22,5µl gemengd met 2,5µl monster en werd vervolgens gedurende 15s gecentrifugeerd. Hierna werd het in de 7500 Fast Real Time PCR System(Applied Biosystems) geplaatst, waarna met de 7500 Fast System SDS software v.1.3.1(Applied Biosystems) het volgende programma werd ingesteld op 40 cycli: 5 minuten 95°C, 3s 95°C, 30s 58°C, 25s 72°C en daarna werd er een smeltcurve gemaakt.

3.0 RESULTATEN

De beschrijving van de gebruikte stammen zijn versleuteld weergegeven dit ter voorkoming van herleiding van de isolaten naar de betrokken instellingen.

3.1 GENOTYPERING MET BEHULP VAN MLVA

Van 127 isolaten werd het genotype bepaald aan de hand van negen loci. Als positieve controle werd gebruik gemaakt van PA01. Als negatieve controle werd alleen de mix zonder toevoegingen gebruikt. Daarnaast werden ter controle of de MLVA goed werd afgelezen, eerst zes MBL positieve stammen getypeerd met bekend MLVA patroon. Tevens werd een selectie van 24 isolaten vergeleken met resultaten verkregen met de Raman techniek.

Voor een overzicht van alle MLVA resultaten kunt u terecht in bijlage 2. Daarin staan alle foto's die gebruikt zijn om de loci te bepalen en ook een tabel met daarin bij elke stam wat het aantal repeats zijn voor elk locus.

3.1.1 CONTROLE AFLEZEN MLVA

De beoordeling van de grootte van de amplificatieproducten gebeurt met het blote oog en kan dan ook per experimentator verschillen. Om deze subjectiviteit enigszins te ondervangen werden eerst de MLVA types vergeleken met een panel van zes isolaten met bekend MLVA type (tabel 3-1-1).

Tabel 3-1-1 Validatie van MLVA met behulp van zestal controle stammen. De blauw gedrukte loci komen niet overeen met de eerder vastgestelde loci. De tabel is zo ingedeeld dat u links in de eerste kolom de stam ziet u die er gebruikt, rechts daarvan staan per locus het gevonden aantal repeats(links) ten opzichte van het eerder vastgestelde aantal repeats(rechts). In de laatste kolom is ook nog te zien in hoeverre het MLVA type overeen komt. Dit is ingedeeld op dezelfde manier als het aantal repeats per locus.

Stam	ms77	Ms127	ms142	ms211	ms213	ms215	ms216	ms217	ms223	Type
CW 27	4:4	9:9	2:2	2:2	5:5	2:2	1:1	2:2	2:2	68:68
CW 34	2,5:2,5	8:8	4:4	3:4	4,5:4,5	2:99	2:2	2:2	2:2	255:382
CW 59	2,5:2,5	8:8	4:4	3:3	4,5:4,5	2:2	2:2	2:2	2:2	255:255
CW 78	2,5:2,5	8:8	4:4	3:3	4,5:4,5	2:99	2:2	2:2	2:2	255:364
CW 201	2,5:2,5	8:8	4:4	3:3	4,5:4	2:99	2:2	2:2	2:2	255:404
CW 135	2,5:2,5	8:8	4:4	3:3	4,5:4,5	2:99	2:2	2:2	2:2	255:364

Hier onder staan de foto's van de eerste run van de controle stammen



Foto 3-1-1 Links: De gel is ingedeeld in vier kwanten bestaande uit 8 slots. Boven zijn de banden te zien van ms77 en ms127, onder zijn de banden te zien van ms142 en ms211.

Foto 3-1-2 Rechts: De gel is ingedeeld in vier kwanten bestaande uit 8 slots. Boven zijn de banden te zien van ms213 en ms215, onder zijn de banden te zien van ms216 en ms217.

Foto 3-1-3 links onder: Hierop zijn de banden van locus ms223 te zien. De stammen zijn als volgt op de gel geplaatst: CW27, CW34, CW59, CW78, CW135, CW201.

3.1.2 TYPERING VERGELIJKING

In tabel 3-1-2 zijn de resultaten van de MLVA bepaling weergegeven en tevens de resultaten verkregen met de Raman techniek. Raman is een nieuwe techniek die mogelijk ook toegepast kan worden voor typering. Door de met MLVA gevonden types te vergelijken met de Raman spectroscopie gevonden types kan onderzocht worden hoe goed de typeringstechnieken onderscheid kunnen maken tussen stammen.

Tabel 3-1-2 De stammen met resultaat van beide typeringstechnieken met in de onderste rij de Hunter-Gaston discriminatory index

Stam	MLVA type	Raman spectroscopie type
RA 1	449	14
RA 2	450	18
RA 3	450	3
RA 4	449	11
RA 5	521	9
RA 6	526	17
RA 7	519	5
RA 8	449	1
RA 9	516	6
RA 10	520	16
RA 11	524	3
RA 12	525	3
RA 13	517	13
RA 14	518	10
RA 15	430	15
RA 16	522	15
RA 17	421	15
RA 18	485	15
RA 19	424	15
RA 20	523	12
RA 21	451	10
RA 22	425	4
RA 23	429	6
RA 24	255	15
HGDI	0,9855	0,9529

3.1.3 GENOTYPEN CARBAPENEM-RESISTENTE PSEUDOMONAS AERUGINOSA

Van de 127 carbapenem-resistente *Pseudomonas aeruginosa* isolaten is het MLVA type vast gesteld. De HGDI van de uitgevoerde MLVA is 0,9961254843. De resultaten van MLVA typering zijn op de volgende pagina in de vorm van een minimum spanning tree weergegeven (figuur 3-1-1).

3.2 EXPRESSIE VAN HET OPRD PORINE EIWIJ MET BEHULP VAN SDS-PAGE

SDS-PAGE is een bewerkelijke techniek dus in het huidige onderzoek is voornamelijk geprobeerd om de SDS-PAGE te optimaliseren ter detectie van het OprD eiwit. Er zijn daardoor niet veel stammen getest op de aan- of afwezigheid van het OprD porie eiwit. De positieve controle in dit experiment was de ATCC27853 stam en er is geprobeerd een negatieve controle te maken vanuit een PA01 stam.

3.2.1 NEGATIEVE CONTROLE

Om te bepalen of een stam geen OprD tot expressie brengt met behulp van SDS-PAGE werd er besloten om een OprD negatieve mutant te maken die als negatieve controle kan fungeren.

Van de overnacht cultuur afgeënt op platen met een oplopende reeks van imipenem werden twee kolonies groeiend op platen met 16 µg/ml gecontroleerd middels E-test. De MICs van deze mutanten bleek 6 µg/ml. Deze twee isolaten werden vervolgens na overnacht incubatie wederom uitgeplaat op een imipenem reeks bevattend hogere concentraties van imipenem. Nu bleken er mutanten te groeien bij 32µg/ml. Van twee kolonies groeiend bij 16µg/ml en bij 32µg/ml is een reinkweek gemaakt en hiervan werd een Vitek antibiogram(Biomérieux) ingezet.

Epidemiologie en resistentie mechanismen van carbapenem-resistente *Pseudomonas aeruginosa*

De MIC's die hieruit kwamen zijn:

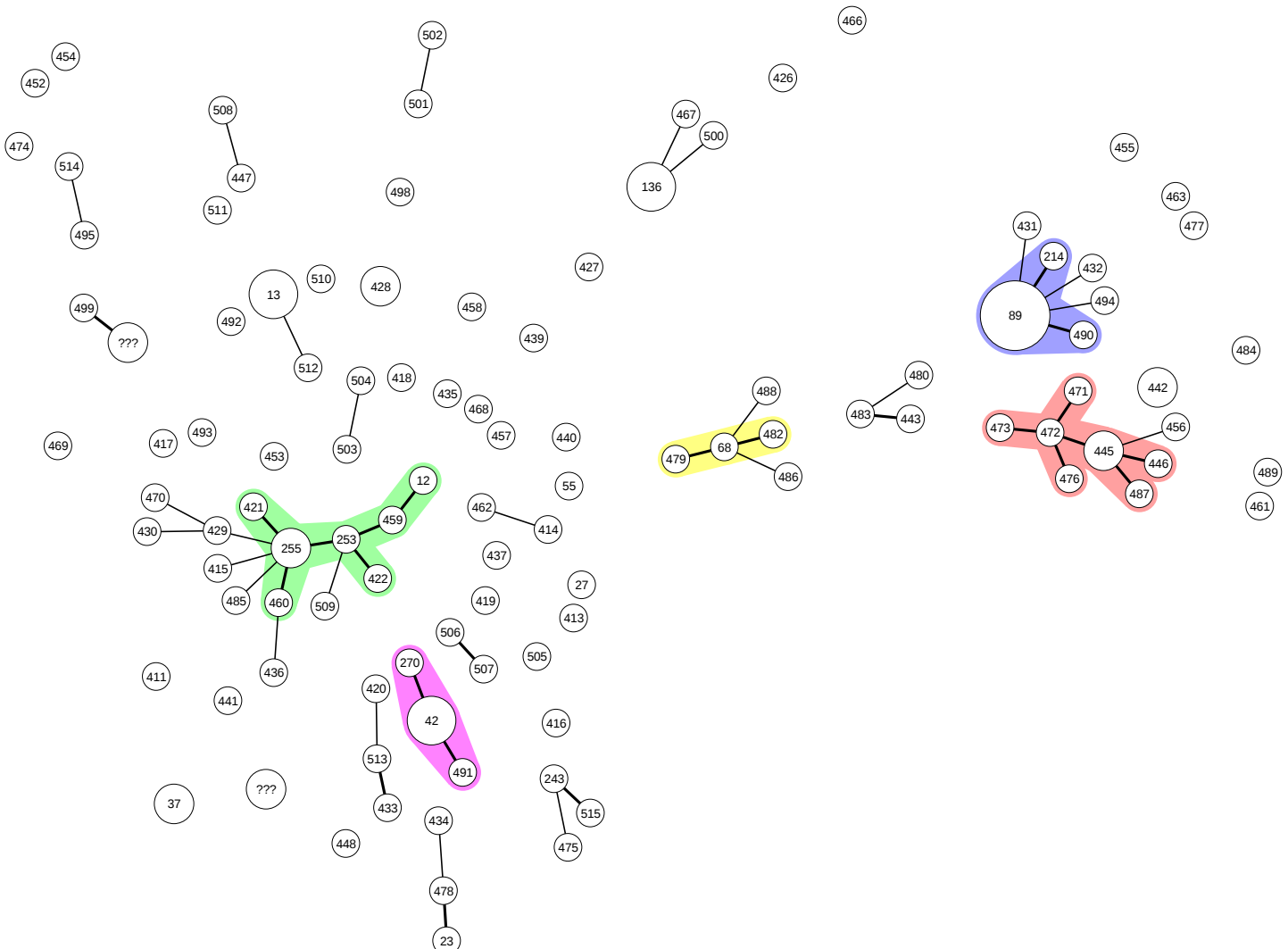
Stammen	Stam 1 bij 16	Stam 1 bij 32	Stam 2 bij 16	Stam 2 bij 32	PA01 onbehandeld
Imipenem	8	8	8	8	8
Meropenem	2	2	2	2	2
Ceftazidime	<=1	<=1	<=1	2	2

Omdat stam 2 bij 32µg/ml imipenem groeide werd deze mutant weer op een nieuwe platenreeks van imipenem gezet. Op deze nieuwe reeks groeiden de mutanten wederom tot maximaal 32µg/ml. Na deze reeks is van deze mutant weer een Vitek antibiogram(Biomérieux) bepaald:

Stammen	Stam 1	Stam 2	Stam 2	PA01	ATCC
	bij 16	bij 16	bij 32	onbehandeld	27853
Imipenem	>=16	>=16	>=16	8	2
Meropenem		2	2	2	0,5
Ceftazidime	2	2	2	<=1	<=1

Bij het laatste Vitek antibiogram werd het volgende resultaat gevonden bij de AES FINDINGS onder kopje Phenotype: ACQ PASE+ R CARBAPENEMS (IMPERMEABILITY), RESISTANT CARBAPENEMS.(IMPERMEABILITY).

Op grond van de gemeten MICs en het commentaar van het advanced MICs expert systeem is desbetreffend isolaat gebruikt ter optimalisatie van de SDS-PAGE techniek. Hierbij is te zien op foto's 3-2-1 tot en met 3-2-3 dat ze echter allemaal nog het OprD eiwit tot expressie brengen. Met andere woorden de verhoogde MICs voor de carbapenems zijn niet het gevolg van reductie van de permeabiliteit van het buitenmembraan.



Figuur 3-1-1: Minimum spanning tree van de 127 carbapenem-resistente *P.aeruginosa*, er zijn in totaal 109 typen gevonden. Een dikke streep tussen twee typen betekent dat er verschil is op 1 locus, een dunne streep tussen twee typen betekent dat er verschil is op 2 loci.

Epidemiologie en resistentie mechanismen van carbapenem-resistente *Pseudomonas aeruginosa*

De foto's van de verschillende SDS-PAGE gels waarmee geprobeerd is om een OprD negatieve mutant aan te tonen staan in de kolom hiernaast.

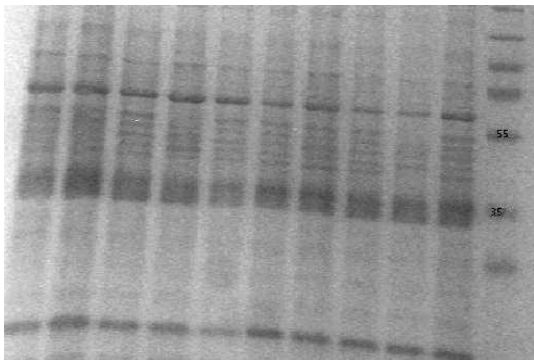


Foto 3-2-1: rond de 46kDa moet er een bandje ontbreken voor een OprD negatief resultaat. Een test met 10µl monster op een 12% gel bij 35mA. De gel is qua stammen in gedeeld als volgt 1-16, 2-16, 2-32, PA01, ATCC 27853 en dit wordt dan herhaald.

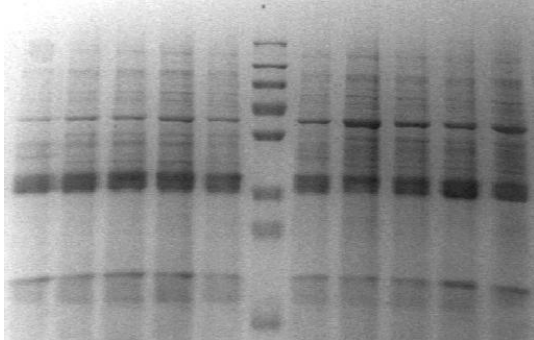


Foto 3-2-2 rond de 46kDa moet er een bandje ontbreken voor een OprD negatief resultaat. Een test met 10µl monster op een 12% gel bij 22mA. De gel is qua stammen in gedeeld als volgt 1-16, 2-16, 2-32, PA01, ATCC 27853, ladder en daarna weer het zelfde rijtje(zonder ladder).

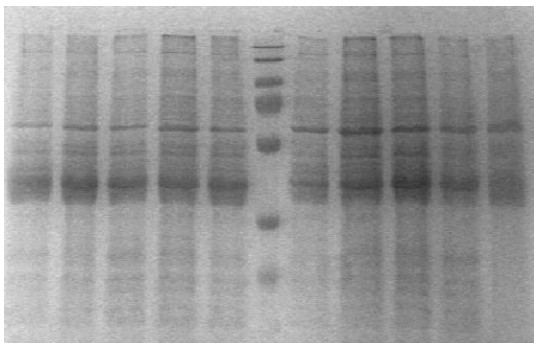


Foto 3-2-3 rond de 46kDa moet er een bandje ontbreken voor een OprD negatief resultaat. Een test met 10µl monster op een 15% gel bij 22mA. De indeling van deze gel is hetzelfde als bij gel 2.

3.2.2 OPTIMALISATIE VAN DE SDS-PAGE

Voor de optimalisatie van de SDS-PAGE zijn er twee soorten polyacrylamide gellen gemaakt, een 12% gel en een 15% gel. De foto's van de gellen staan in 3.2.1 waarbij er verschil te zien is in de twee 12% gels(1&2) en de 15% gel(3) in het scheidend vermogen van de gels. In de hoge concentratie acryl gellen worden de bandjes weliswaar scherper maar oplossend vermogen is nog te laag. Vervolgens zijn we de hoeveelheid opgebracht eiwit gaan titreren.

Naast het variëren van het percentage acrylamide is er ook gekeken naar de optimale hoeveelheid monster. In foto's 4 en 5 zijn hier van de resultaten te zien.

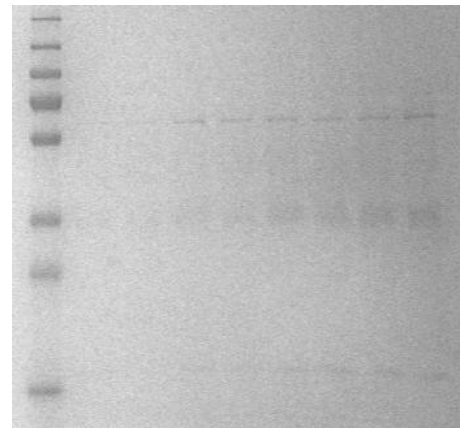


Foto 3-2-4: de gel is ingedeeld van links naar rechts: Ladder, 1µl, 2µl, 3µl, 4µl. Alle hoeveelheden zijn in duplo op de gel geplaatst.

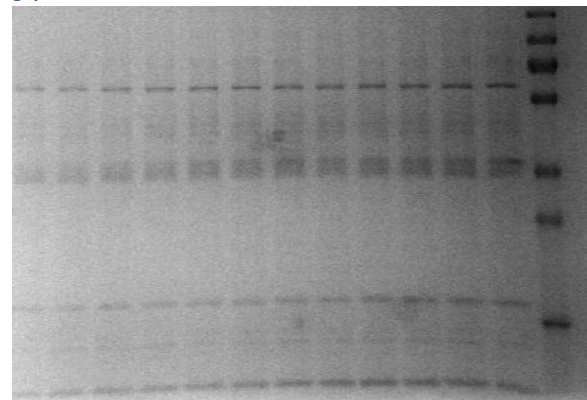


Foto 3-2-5: de gel is ingedeeld van links naar rechts: 5µl, 6µl, 7µl, 8µl, 9µl, 10µl, Ladder. Alle hoeveelheden zijn in duplo op de gel geplaatst.

Epidemiologie en resistentie mechanismen van carbapenem-resistente *Pseudomonas aeruginosa*

Om een completer beeld te maken van de benodigde hoeveelheid monster is er ook nog een reeks gemaakt met 5, 7, 10, 12 en 15µl ATCC 27853 en de zogenaamde "OprD negatieve mutant".

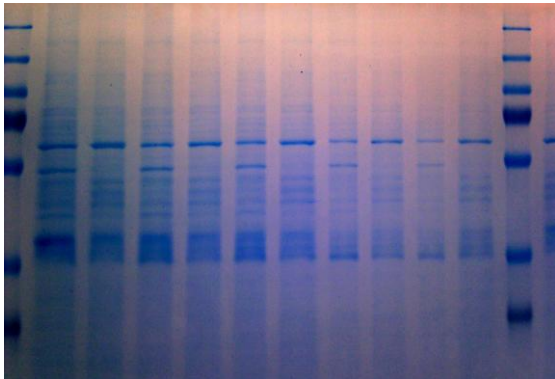


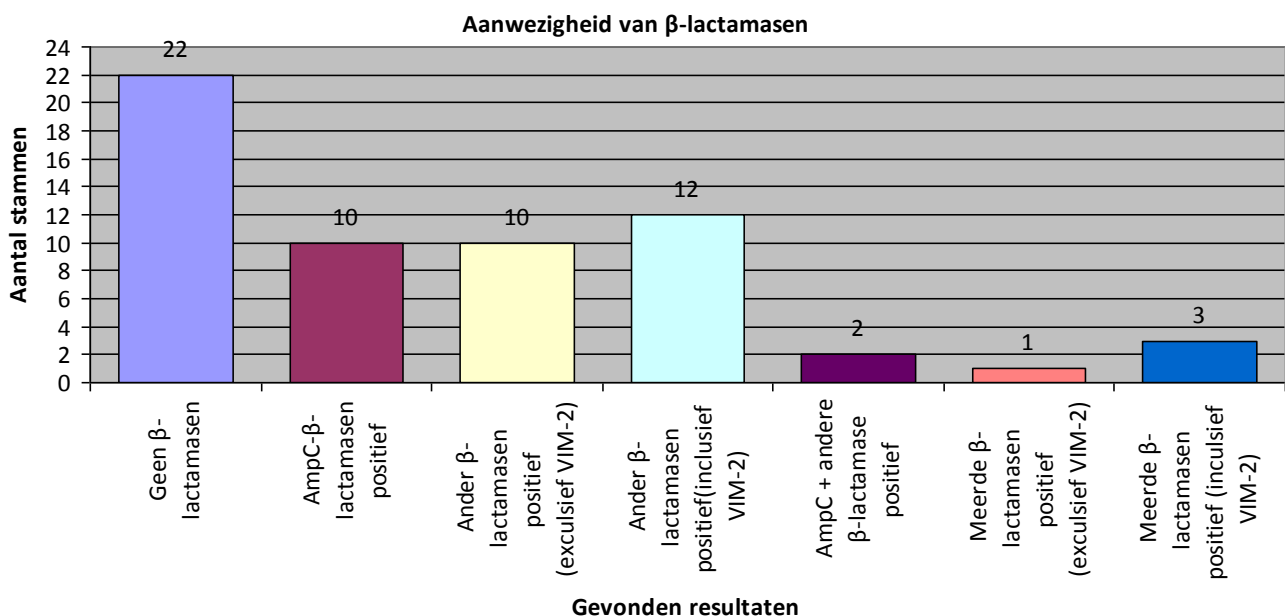
Foto 3-2-6: op deze gel is niet een duplo ATCC 27853 getest maar een mutant en een ATCC 27853, het is zo ingedeeld van links naar rechts met altijd eerst de mutant en daarna de ATCC 27853: Ladder, 15µl, 12µl, 10µl, 7µl, 5µl, Ladder en een maal 20µl ATCC 27853

3.3 SCHEIDEN VAN -BETALACTAMASEN MET BEHULP VAN IEF

Behalve naar de buitenmembraan eiwitten zijn we middels IEF gaan kijken naar de variatie in aanwezige β -lactamase enzymen. Hierbij hebben we een steekproef genomen bij 47 isolaten met behulp van IEF. Hierbij zijn voornamelijk isolaten getest met hoge MICs voor ceftazidime. Immers hier verwachten we aanwezigheid van chromosomale β -lactamases. In dit experiment werden telkens twee positieve controles meegenomen, een TEM-1 positieve stam(pl 5,6(54)) en een SHV-1 positieve stam(pl 7,4(54)).

Er zijn 47 stammen getest, hiervan waren de meest gekozen aan de hand van de MIC tegen ceftazidime. Hierbij zaten ook een viertal VIM-2 positieve stammen die werden getest ter controle van de aanwezigheid van meerdere β -lactamases. Deze VIM-2 β -lactamases zijn niet gevonden met behulp van IEF vanwege EDTA gebruik bij de enzymextractie.

De resultaten van de IEF staan in tabel 3-3-1 en in staafdiagram 3-3-1. In bijlage 3 staan de foto's van alle gelen.



Epidemiologie en resistentie mechanismen van carbapenem-resistente *Pseudomonas aeruginosa*

Tabel 3-3-1 Gevonden resultaten binnen de 47 geteste stammen. De tweede en derde rij zijn de gevonden resultaten, dit zijn het totaal aantal gevonden AmpC- β -lactamase en andere β -lactamase. De resultaten van de drie rijen daaronder gaan over combinaties die gevonden zijn in stammen maar de β -lactamase (met uitzondering van VIM-2) komen uit het totaal aantal gevonden β -lactamase (de tweede en derde rij).

Criteria	Aantal stammen positief
AmpC- β -lactamase	12
Andere β -lactamase	15
Combinatie van AmpC- β -lactamase en andere β -lactamase	2
Combinatie van 2 β -lactamase die niet AmpC- β -lactamase zijn	1
Aanwezigheid van β -lactamase bij VIM-2 positieve stammen	2

3.4 OPRD EXPRESSIE BEPALING MET BEHULP VAN RT-QPCR

Een verminderde expressie van OprD kan zorgen voor resistentie tegen carbapenems. Omdat verminderde expressie moeilijk te bepalen bleek met behulp van SDS-PAGE techniek is er besloten om een RT-qPCR op te zetten van het OprD-gen. Echter voordat we de isolaten zijn gaan testen middels RT-qPCR zijn we eerst de PCR gaan optimaliseren. Met als gevolg dat er dus weinig aandacht zal worden besteed aan het aantonen van een verminderde expressie van het OprD RNA ten opzichte van het rpoD RNA.

3.4.1 OPTIMALISATIE

Om te bepalen of het PCR programma en de primers werkten moest de PCR worden geoptimaliseerd. Hierbij is er gekeken doormiddel van PCR en gelelektroforese wat de meest optimale annealing temperatuur was. Hierbij werden de volgende annealingtemperaturen getest: 50 °C, 52 °C, 54 °C, 56 °C, 58 °C & 60 °C

Verder is er hierbij ook gekeken naar de hechttingsplaatsen van de primers en de grootte van het product.

Naast de temperatuur optimalisatie werd ook de optimale primer concentratie en de optimale concentratie magnesiumchloride bepaald. De experimenten voor de optimalisatie zijn uitgevoerd in duplo met 50ng/ μ l ATCC 27853 RNA.

De stock concentratie van de primer was 50 μ M en de concentratie die de fabrikant van het gebruikte kitje aanraadde was 100 tot 300nM. In de mix van het kitje had de primer een concentratie van 5 μ M. De volgende primer concentraties werden getest: 5 μ M, 4 μ M, 3 μ M, 2 μ M, 1 μ M & 0,5 μ M.

Hierna werd de hoeveelheid MgCl₂ nog geoptimaliseerd. In de mix van het gebruikte kitje was de concentratie magnesiumchloride 4mM, de concentratie magnesiumchloride is verhoogd vanuit een 50mM stock die de fabrikant bij het kitje leverde.

Voor de bepaling van de optimale magnesiumconcentratie zijn twee concentraties primers gebruikt omdat het werd aangeraden door de fabrikant van de kit om pas de magnesium concentratie te gaan optimaliseren als de primer concentratie al geoptimaliseerd was. De geteste concentraties magnesiumchloride waren: 4mM, 4,5mM, 5mM, 5,5mM & 6mM.

Epidemiologie en resistentie mechanismen van carbapenem-resistente *Pseudomonas aeruginosa*

TEMPERATUUR OPTIMUM EN PRIMER WERKING

De optimale temperatuur en primer concentraties werden bepaald met behulp van gel elektroforese. Er zijn vijf foto's van de gellen.

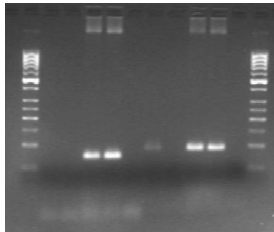


Foto 3-4-1: 4 stammen
getest op 50°C links
OprD en rechts rpoD

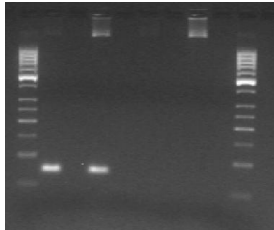


Foto 3-4-2: 3 stammen
getest op 52°C links
OprD en rechts rpoD

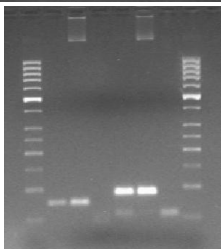


Foto 3-4-3: 2 stammen
getest op 54°C links
OprD en rechts rpoD

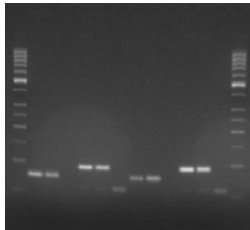


Foto 3-4-4: 2 stammen
getest op 56°C en 58°C
links, 56°C met links
OprD en rechts rpoD.
Rechts 58°C met links
OprD en rechts rpoD.

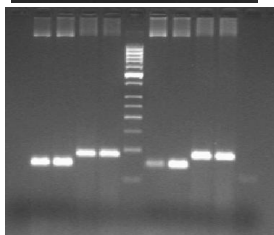


Foto 3-4-5: 2 stammen
getest op 58°C en 60°C
links, 58°C met links
OprD en rechts rpoD.
Rechts 60°C met links
OprD en rechts rpoD.

magnesium(4mM). Deze percentages worden in tabel 3-4-1 en tabel 3-4-2 weergegeven. Naast deze twee tabellen wordt in bijlage 4 alle data weergegeven van waaruit de percentages zijn berekend van tabel 3-4-1 en tabel 3-4-2

PRIMER EN MAGNESIUM OPTIMUM CONCENTRATIES

Voor de resultaten die hier staan is gekeken naar de smelttemperatuur(T_m), de afgeleide(f'), de drempelwaarde en de hoogte van de amplificatie. Hiervan is de gemiddelde waarde van berekend m.b.v. Microsoft Excel 2003, van de gemiddelden is een percentage berekend in verhouding tot de standaard concentratie primer(5 μ M) of

Tabel 3-4-1 percentage in verhouding tot de standaard primer concentratie van 5 μ M, dit houdt in dat de percentages bij 5 μ M primer allemaal 100% zijn.

Primer	Concentratie (μ M)	T_m	f'	Ct	Amplificatie plot	Gemiddeld percentage
OprD	4	99,6%	107,2%	94,2%	102,3%	100,9%
	3	99,8%	105,8%	93,6%	103,1%	100,6%
	2	100,2%	105,1%	91,9%	104,7%	100,5%
	1	101,0%	103,7%	90,2%	105,5%	100,1%
	0,5	97,6%	105,7%	97,3%	103,4%	101,0%
rpoD	4	99,3%	114,1%	93,1%	107,0%	103,4%
	3	99,3%	106,8%	93,0%	107,0%	101,5%
	2	99,6%	113,5%	88,6%	112,3%	103,5%
	1	100,3%	113,9%	84,6%	118,0%	104,2%
	0,5	101,8%	74,8%	103,6%	81,2%	90,3%

Tabel 3-4-2 percentage in verhouding tot de standaard magnesium concentratie van 4mM, dit houdt in dat de percentages bij 4mM magnesium allemaal 100% zijn.

Primer	Magnesium concentratie (mM)	T_m	f'	Ct	Amplificatie plot	Gemiddeld percentage
OprD	4,5	99,5%	92,6%	100,9%	99,0%	98,0%
	5	99,9%	84,1%	107,0%	93,4%	96,1%
	5,5	100,6%	72,9%	113,4%	87,7%	93,7%
	6	101,2%	68,5%	114,9%	86,7%	92,8%
rpoD	4,5	100,05	91,3%	105,5%	94,6%	97,9%
	5	100,9%	81,2%	111,5%	90,0%	95,9%
	5,5	100,8%	84,3%	103,5%	96,4%	96,3%
	6	101,2%	82,5%	105,6%	94,5%	96,0%

4.0 DISCUSSIE EN CONCLUSIE

Resistentie tegen antibiotica is een wereldwijd probleem. Ook in Nederland kunnen we ons niet onttrekken aan toenemende resistentie. De toename van resistentie zien we voornamelijk in de ziekenhuizen en voornamelijk in afdelingen waar veel antibiotica gebruikt worden, zoals intensive care units. Dit vertaalt zich in een toename van multi-resistente organismen die van nature al vrij ongevoelig zijn voor antibiotica zoals *Pseudomonas aeruginosa* en *Acinetobacter baumannii*. Deze resistentie treedt voornamelijk op tegen antibiotica die veel gebruikt worden zoals de carbapenem antibiotica. Carbapenem antibiotica horen tot de breed-spectrum antibiotica en worden vaak als laatste middel ingezet in de behandeling. Met andere woorden resistentie tegen dit soort antibiotica leidt dan ook tot organismen die in feite niet meer goed te behandelen zijn met antibiotica. In het huidige onderzoek willen we dan ook de resistentie mechanismen onderzoeken die resulteren in carbapenem resistentie en we willen onderzoeken of deze multi-resistente organismen verschillend zijn of aan elkaar verwant zijn.

De MLVA-techniek is gebruikt om de klonale verwantschap te onderzoeken, SDS-PAGE en RT-qPCR zijn geoptimaliseerd om vervolgens deze technieken te gebruiken om te kijken naar de expressie van het OprD porie eiwit. IEF is gebruikt om te kijken naar de aanwezigheid van AmpC- β -lactamasen maar ook om te kijken naar de aanwezigheid van andere β -lactamasen.

Om te de nauwkeurigheid van de uitvoering van de MLVA te onderzoeken en hoe goed de MLVA werkt in vergelijking tot een andere typeringsmethode zijn er een tweetal experimenten uitgevoerd. Een experiment bestond uit het opnieuw typeren van 6 eerder getypeerde *P.aeruginosa* stammen om in feite de reproduceerbaarheid van de MLVA techniek te bestuderen. Bij het controleren van hoe nauwkeurig de MLVA is uitgevoerd of afgelezen zijn in totaal zes verschillen gevonden, vier van deze verschillen zijn in ms215 gevonden. Dit komt doordat bij de eerdere typering van de zes stammen er bij ms215 geen resultaat was gevonden.

Een mogelijke reden waarom er bij de eerdere typering van deze stammen geen resultaat was gevonden bij ms215 kwam misschien door niet goed werkende primers. Naast de verschillen in ms215 is er bij de CW34 stam een verschil gevonden in ms211 en in de CW201 stam een verschil in ms213. Bij de CW34 stam kan het verschil in ms211 komen door de hoeveelheid bijproducten, op foto 3-1-1 is in het vierde kwadrant bij het tweede bandje te zien dat het bandje rond de 461 basenparen ligt. Het probleem hierbij is dat veel bijproducten zijn ontstaan die een waas hebben gevormd. Door die waas is het moeilijk te zeggen of er nog een bandje van 101 basenparen hoger ligt. Bij de CW201 stam is er een verschil van 48 basenparen. Uit foto 3-1-2 in het eerste kwadrant het zesde laantje is te zien dat het product meer naar de 585bp ligt dan naar de 537bp. Aangezien er vier banden op een rechte lijn liggen waarbij de andere drie stammen wel overeen komen met 585bp lijkt het logisch dat het ms213 product van CW201 ook 585bp groot is en dus overeen komt met vier en een halve repeat. Een tweede experiment bestond uit het typeren van 24 stammen en die te vergelijken met typeringsresultaten met een nieuwe typeringsmethode namelijk met Raman spectroscopie. Uit de resultaten van tabel 3-2-1 is er te zien dat er bij het typeren redelijk veel verschillen zijn tussen de MLVA en de RA. Uit de Hunter Gaston discriminatory index kan ook afgeleid worden dat de MLVA 3,26% meer onderscheid maakt dan de RA. Zo zijn er typen die volgens de MLVA gelijk zijn aan elkaar maar volgens de RA niet en andersom. Dit kan verklaard worden doordat er met MLVA gekeken wordt naar het genotype en dan specifiek tandem repeats, terwijl er met RA gekeken wordt naar de moleculaire samenstelling. Verschillen tussen MLVA en RA kunnen mogelijk verkeerdt worden door verschillen in expressie van eiwitten in genetisch identieke stammen

Epidemiologie en resistentie mechanismen van carbapenem-resistente *Pseudomonas aeruginosa*

De primaire vraagstelling van het huidige onderzoek bestaat uit het onderzoeken van de onderlinge verwantschap met behulp van MLVA. Hiervoor zijn 127 stammen met MLVA getest. Uit de typeringsresultaten bleken 109 verschillende typen te zijn gekomen. De conclusie is dan ook dat er nauwelijks sprake is van klonale verwantschap tussen deze 127 stammen.

Het andere onderdeel van de stage bestond uit het optimaliseren van technieken die gebruikt kunnen worden voor het detecteren van resistentiemechanismen in *Pseudomonas aeruginosa*. Resistentie voor carbapenems bij *P. aeruginosa* is vaak het gevolg van het verlies van het zogenaamde OprD porine eiwit uit het buitenmembraan. De techniek die gebruikt wordt bij het analyseren van buitenmembraan eiwitten is de SDS-PAGE techniek. Bij het bestuderen van de afwezigheid van porine eiwitten is het belangrijk om te beschikken over controle-isolaten die in het bezit zijn van alle porinen en uiteraard een controle die het OprD is verloren. Daar we geen beschikking hadden over een negatieve controle hebben we getracht een dergelijke mutant in vitro te selecteren.

Echter eerst werd de techniek van SDS-PAGE geoptimaliseerd door verschillende concentraties van een gel te gebruiken en door het titreren van de hoeveelheid eiwit. Uit de foto's van 3-2-1 tot en met 3-2-3 moet er geconcludeerd worden dat de SDS-PAGE geen duidelijk antwoord geeft op de vraag of een stam het OprD porine eiwit produceert of niet. Er is getest met verschillende percentages polyacrylamide om het oplossend vermogen te vergroten. Hier uit is gebleken dat bij een percentage 15% polyacrylamide in verhouding tot 12% polyacrylamide het zelfs moeilijker werd om een antwoord te geven op deze vraag omdat het gebied waar OprD in moet zitten dichter op elkaar wordt gedrukt. Hier uit is geconcludeerd dat het gebruik van een 12% polyacrylamide gel aan te bevelen valt.

Naast het optimaliseren van het percentage polyacrylamide is er ook gekeken naar de optimale hoeveelheid monster dat toegevoegd moest worden aan de gel. Door het gebruikte protocol voor de isolatie zouden alle monsters een gelijke rekenkundige optische dichtheid moeten hebben van 20. Dit zou moeten betekenen dat voor alle

monsters een gelijkwaardig patroon zouden moeten hebben met een bepaalde hoeveelheid monster dat op de gel geplaatst wordt. In de eerste reeks(foto's 3-2-4& 3-2-5) werd een hoeveelheid monster van 1µl tot en met 10µl opgebracht. Het resultaat van de eerste reeks was niet goed genoeg en er moest dus gekeken worden of een groter volume(meer eiwit) meer duidelijkheid gaf. Voor de tweede reeks(foto 3-2-6) zijn er 6 volumina getest: 5µl, 7µl, 10µl, 12µl, 15µl en 20µl. De 5, 7 en 10µl waren al eerder gezien in de eerste reeks en bleken wederom geen bruikbaar resultaat op te leveren. De 12 en 15µl gaven wel een bruikbaar resultaat, alleen werd het bij de 15µl al minder duidelijk te worden door te dikke banden die ook nog in elkaar begonnen over te lopen. Er is besloten dat tussen de 15µl en de 12µl de optimale hoeveelheid monster ligt.

Zoals te zien is op de foto's 3-2-1 tot en met 3-2-3 is het niet gelukt om een OprD negatieve mutant te maken. Op zich is dit vreemd immers in het antibiogram verkregen middels Vitek wordt wel ongevoeligheid voor imipenem aangetoond en er werd zelfs gesproken over resistentie door impermeabiliteit.

Een andere mogelijke verklaring is te zien op foto 3-2-6, daarop is te zien dat alle mutanten een bandje hebben rond de 54kDa wat de PAO1 stam niet heeft en de ATCC 27853 veel minder duidelijk. Dit houdt waarschijnlijk in dat alle mutanten een verhoogde expressie hebben van de MexCD-OprJ efflux pomp. Overexpressie van de OprJ efflux pomp kan leiden tot carbapenem resistentie in combinatie met een actieve MexAB-OprM efflux pomp(Masuda et al. 52).

Het doel van het IEF was voornamelijk om te kijken naar de productie van AmpC-β-lactamase en naar de productie van andere β-lactamase. In 47 stammen zijn in totaal 25 β-lactamase gevonden, hiervan waren er 12 AmpC-β-lactamase en 15 niet identificeerbare β-lactamase. Er was wel een groot nadeel van de gebruikte techniek om de enzymen te isoleren en dat is het gebruik van EDTA om de reactie van het lysozym beter te maken.

Het gebruik van EDTA zorgde ervoor dat tijdens het aankleuren met nitrocefin er geen MBL's konden worden aangetoond omdat de meeste zinkionen

Epidemiologie en resistentie mechanismen van carbapenem-resistente *Pseudomonas aeruginosa*

zijn weg gevangen. Bij stam 16 en 18 zijn β -lactamasen gevonden (bijlage 3) en er is gecontroleerd of het misschien niet VIM-2 enzymen zijn maar de pI van VIM-2 is 5,3(55). Het β -lactamase bandje moet dan boven TEM-1 liggen om in aanmerking voor VIM-2 te komen. Daar de techniek van SDS-PAGE de nodige problemen opleverde is er besloten om het meten van de expressie van het OprD eiwit met behulp van een kwantitatieve RT-PCR te proberen. Voordat we gebruik konden maken van deze PCR zijn eerst de omstandigheden geoptimaliseerd. De beste annealingtemperatuur is bepaald aan de hand van foto 3-4-1 tot en met 3-4-5, uit deze foto's is geconcludeerd dat de beste annealingtemperatuur 58°C is voor de primers van Quale et al.(48). Deze temperatuur is ook gekozen vanwege de vooraf berekende annealingtemperatuur voor de OprD reverse primer dit als optimum gaf. Op deze foto's is ook te zien dat de primers werken op het DNA van *P.aeruginosa* en dat ze de juiste product grootte geven van de targets.

De beste concentratie OprD primer is $0,5\mu\text{M}$, dit is zo gekozen omdat de drempel waarde hiervan net iets beter is dan de andere geteste concentraties in verhouding tot de standaard primer concentratie van $5\mu\text{M}$. Het nadeel bij de concentratie van $0,5\mu\text{M}$ is wel dat het niet de hoogste amplificatie plot heeft en dat de smelttemperatuur van het product zeer hoog ligt in verhouding tot de smelttemperatuur bij de standaard concentratie. De beste concentratie rpoD primer is $1\mu\text{M}$, deze concentratie is gekozen voornamelijk vanwege de lage smelttemperatuur, de hoge afgeleide en de hoge amplificatie plot. Een nadeel bij deze concentratie is echter wel dat het een zeer hoge drempelwaarde heeft in vergelijking met de standaard concentratie primer.

De optimale concentratie magnesiumchloride is 4mM , dit is de concentratie die al standaard in de reactiebuffer zit. Dit is zo gekozen omdat alle andere concentraties in de procentuele verhouding onder de 100% zaten en omdat 4mM magnesiumchloride ook al wel hoog is voor in een qPCR. Deze concentratie heeft wel als nadeel dat die minder gevoelig is maar geeft in contrast wel minder schommelingen in de amplificatie plot en drempelwaarde tijdens het meervoudig testen hetzelfde monster. Voor de detectie maakt het

ook minder uit omdat het per monster wordt vergeleken met het rpoD huishoud gen.

Dankzij de uitgevoerde MLVA kan er gezegd worden dat carbapenem-resistente *Pseudomonas aeruginosa* zonder metallo- β -lactamase nauwelijks klonale verwantschappen bevatten. Uit eerder onderzoek is namelijk gebleken dat carbapenem-resistente *P.aeruginosa* die hun resistentie te danken hebben aan metallo- β -lactamasen voornamelijk maar in een bepaalde genotypen voorkomen (Van der Bij et al. 2).

In het huidige onderzoek is gebruik gemaakt van carbapenem-resistente stammen die niet in het bezit waren van een MBL. Hieruit kan worden geconcludeerd dat carbapenem-resistente *P.aeruginosa* stammen zonder MBL's niet klonaal worden verspreid maar juist ontstaan door antibiotische stress. Dit in tegenstelling tot de MBL - positieve *P.aeruginosa* stammen die wel klonaal worden verspreid.

Uit de uitgevoerde IEF kan geconcludeerd worden dat uit de 47 geteste stammen 25 stammen β -lactamasen produceren en dat van deze 25 β -lactamasen producerende stammen er 12 stammen waren die AmpC- β -lactamasen produceerden. Van de andere β -lactamasen is niet te zeggen welke β -lactamasen het zijn zonder een specifiek iso-elektrisch punt.

**AANWIJZINGEN VOOR EEN VERVOLG
ONDERZOEK**

Er zijn een aantal aanwijzingen voor een vervolg onderzoek.

Bij een grote collectie stammen is het niet handig om gebruik te maken van MLVA omdat het veel tijd kost en er is ondervonden dat het aantal repeats niet altijd klopt bij sommige loci.

Voor het maken van de negatieve controle bij de SDS-PAGE is het beter om naast imipenem ook salicylzuur te gebruiken omdat salicylzuur zorgt voor een verhoogde expressie van de MexT regulator.

Het gebruik van een ladder (PhastGel IEF 3-9 Broad pI calibration kit, GE Healthcare) bij de IEF zodat de β -lactamases die niet geïdentificeerd konden worden in dit onderzoek misschien hiermee wel geïdentificeerd kunnen worden.

Bij de enzymextractie voor de IEF toch een ander protocol te hanteren of bij het kleuren van de IEF zink toe te voegen zodat MBL's ook geïdentificeerd kunnen worden.

BRONNEN

- 1: Pitout JD et al. Detection of *Pseudomonas aeruginosa* Producing Metallo- β -Lactamases in a Large Centralized Laboratory. J Clin Microbiol 2005;43: 3129-3135
- 2: Van der Bij AK et al. First Outbreak of VIM-2 metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* in The Netherlands: microbiology, epidemiology and clinical outcomes. Int J Antimicro Agents 2011;37: 513-515
- 3: Walsh TR Emerging carbapenemases: a global perspective. Int J Antimicro Agents 2010;36S3: S8-S14
- 4: al Naiemi N et al. Emergence of metallo- β -lactamases in the Netherlands. J Med Microbiol 2009;58: 1398-9
- 5: Kerr KG, Snelling AM. *Pseudomonas aeruginosa*: a formidable and ever-present adversary. J Hos Inf 2009;73: 338-344
- 6: Park YS et al. Acquisition of extensive drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* among hospitalized patients: risk factors and resistance mechanisms to carbapenems. J Hos Inf 2011;79: 54-58
- 7: Mansour W et al. Metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Tunisia. Diagn Microbiol & Inf Dis 2009;64: 458-461
- 8: Shu JC et al. Interplay between mutational and horizontally acquired resistance mechanisms and its association with carbapenem resistance among extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* (XDR-PA). Int J Antimicro Agents 2012;39: 217-222
- 9: European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net) Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2010: 59-70
- 10: Tam VH et al. Prevalence, mechanisms, and risk factors of carbapenem resistance in bloodstream isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. Diagn Microbiol & Inf Dis 2007;58: 309-314
- 11: Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA *Medical Microbiology* 6^e. United States Mosby inc. & Elsevier inc. 2009 ISBN: 9780323054706
- 12: Hauser AR *Pseudomonas aeruginosa*: So many virulence factors, so little time. Crit Care Med 2011;39: 2163-4
- 13: Breidenstein EBM, de la Fuente-Núñez C, Hancock REW *Pseudomonas aeruginosa*: all roads lead to resistance. Trends Microbiol 2011;16: 416-426
- 14: Li H et al. Structure and function of OprD protein in *Pseudomonas aeruginosa*: From antibiotic resistance to novel therapies. Int J Med Microbiol 2012 jan-5 Epub
- 15: Livermore DM Of *Pseudomonas*, porins, pumps and carbapenems. J Antimicro Chemother 2001;47: 247-250
- 16: Wang J et al. Molecular epidemiology and mechanisms of carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Chinese hospitals. Int J Antimicro Agents 2010;35: 486-491
- 17: El Amin N et al. Carbapenem resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa*: alterations of porin OprD and efflux proteins do not fully explain resistance patterns observed in clinical isolates. APMIS 2005;113: 157-166
- 18: Kumar A, Schweizer HP Evidence of MexT-Independent Overexpression of MexEF-OprN Multidrug Efflux Pump of *Pseudomonas aeruginosa* in Presence of Metabolic Stress. PLoS ONE 2011;6:e26520
- 19: Okamoto K, Gotoh N, Nishino T Extrusion of Penem Antibiotics by Multicomponent Efflux Systems MexAB-OprM, MexCD-OprJ, and MexXY-OprM of *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicro Agents Chemother 2002;46: 2696-2699
- 20: Orsi GB, Falcone M, Venditti M Surveillance and management of multidrug-resistant microorganisms. Expert Rev Infect Ther 2011;9: 653-679
- 21: Giske et al. Redefining extended-spectrum β -lactamases: balancing science and clinical need. J Antimicro Chemother 2009;63: 1-4
- 22: Bush K et al. Comment on Redefining extended-spectrum β -lactamases: balancing science and clinical need. J Antimicro Chemother 2009;64: 212-216
- 23: Jacoby GA, Munoz-Price LS The New β -Lactamases. N Engl J Med 2005;352: 380-391
- 24: Cornaglia G et al. Metallo- β -lactamases as emerging resistance determinants in Gram-negative pathogens: open issues. Int J Antimicro

Epidemiologie en resistentie mechanismen van carbapenem-resistente *Pseudomonas aeruginosa*

Agents 2007;29: 380-388

25: Cornaglia G, Giamarellou H, Rossolini GM Metallo- β -lactamases: a last frontier for β -lactams? Lancet Infect Dis 2011;11: 381–393

26: Jacoby GA AmpC β -Lactamases. Clin Microbiol Rev 2009;22: 161-152

27: Poirel L, Naas T, Nordmann P Diversity, Epidemiology, and Genetics of Class D β -Lactamases. Antimicro Agents Chemother 2010;54: 24-38

28: Van der Bij AK et al. The laboratory diagnosis of *Pseudomonas aeruginosa* that produce metallo- β -lactamases in a dutch tertiary care center. Scan J Inf Dis 2011;43: 596-602

29: Nicolau DP Carbapenems: a potent class of antibiotics. Expert Opin Pharmacother 2008;9: 23-37

30: Knapp KM, English BK Carbapenems. Sem Pedia Inf Dis 2001;12: 175-155

31: van Mansfeld R et al. The Population Genetics of *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from Different Patient Populations Exhibits High-Level Host Specificity. PLoS ONE 2010;5: e13482

32: Vu-Thien H et al. Multiple-Locus Variable-Number Tandem-Repeat analysis for Longitudinal Survey of Sources of *Pseudomonas aeruginosa* Infection in Cystic fibrosis Patients. J Clin Microbiol 2007; 45: 3175-83

33: Onteniente L et al. Evaluation of the Polymorphisms Associated with Tandem Repeats for *Pseudomonas aeruginosa* Strain Typing. J Clin Microbiol 2003; 41: 4991-97

34: https://www.roche-applied-science.com/sis/automated/magna_lc/index.jsp?id=mlcct_010201 Bezocht 20-03-12 12:02

35: Brown TA, *Genomes 3*. Garland science 2007 ISBN: 0 8153 4139 5

36: Udo R, Leene HR *Het Chemisch practicum een laboratoriumhandboek*. Nederland ThiemeMeulenhoff 2008 ISBN: 978 90 06 92100 7

37: Shapiro AL, Vinuela E, Maizel JV MOLECULAR WEIGHT ESTIMATION OF POLYPEPTIDE CHAINS BY ELECTROPHORESIS IN SDS-POLYACRYLAMIDE GELS. Biochem Biophys Res Com 1967;28: 815-820

38: Pereira SG et al. *Pseudomonas aeruginosa* in a hospital facility: diversity, susceptibility and imipenem resistance mutation. Letters Appl Microbiol 2011;53: 515-524

39: Tam VH et al. Comparison of β -lactams in counter-selecting resistance of *Pseudomonas aeruginosa*. Diag Microbiol Inf Dis 2005;52: 145-151

40: Lynch MJ, Drusano GL & Mobley HLT Emergence of Resistance to imipenem in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicro Agents Chemother 1987;31: 1592-96

41: http://www.imb-jena.de/~rake/Bioinformatics_WEB/proteins_purification.html Bezocht 23-03-13 12:38

42: Vesterberg O ISOELECTRIC FOCUSING OF PROTEINS IN POLYACRYLAMIDE GELS. Biochim Biophys Acta 1972;257: 11-16

43: http://www.nationaldiagnostics.com/article_info.php/articles_id/65 Bezocht 29-03-12 10:32

44: Jørgensen RL et al. Prevalence and molecular characterization of clinical isolates of *Escherichia coli* expressing an AmpC phenotype. J Antimicro Chemother 2010;65: 460-464

45: Wang Q et al. Characterization of a Novel AmpC-Type Plasmid-Mediated β -Lactamase from an *Escherichia coli* Strain Isolated in China. Curr Microbiol 2008;57: 558-563

46: Tam VH et al. Prevalence of AmpC over-expression in bloodstream isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. Clin Microbiol Infect 2007;13: 423-428

47: Vandesompele J. qPCR guide. Eurogentec, <http://www.eurogentec.com/uploads/FileBrowse/Brochures/Real-Time%20qPCR/qPCR-booklet.pdf> Bezocht 23-4-12 16:00

48: Quale J et al. Interplay of Efflux System, *ampC*, and *oprD* Expression in Carbapenem Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Isolates. Antimicro Agents Chemother 2006;50: 1633-41

49: Willemse-Erix D et al. Rapid Typing of Extended-Spectrum β -lactamase- and Carbapenemase-Producing *Escherichia coli* and *Klebsiella*

Epidemiologie en resistentie mechanismen van carbapenem-resistente *Pseudomonas aeruginosa*

pneumoniae Isolates by Use of SpectraCell RA. J Clin Microbiol 2012;50: 1370-75

50: Willemse–Erix D et al. Optical fingerprinting in bacterial Epidemiology: Raman Spectroscopy as a Real-time Typing Method. J Clin Microbiol 2009;47: 652-659

51: Hunter PR, Gaston MA. Numerical Index of the Discriminatory Ability of Typing Systems: an Application of Simpson's Index of Diversity. J Clin Microbiol 1988;26: 2465-66

52: Masuda N, Sakagawa E& Ohya S Outer Membrane Proteins Responsible for Multiple Drug Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicro Agents Chemother 1995;39: 645-649

53: http://www.ecdc.europa.eu/en/activities/surveillance/ears-net/database/pages/map_reports.aspx Bezocht op 25-6-12 15:21

54: Messai Y et al. **Prevalence of β -lactams resistance among *Escherichia coli* clinical isolates from a hospital in Algiers.** Rev Esp Quimioterap 2006;19: 144-151

55: Yeong SH et al. Characterization of a new integron containing VIM-2, a metallo- β -lactamase gene cassette, in a clinical isolate of *Enterobacter cloacae*. J Antimicro Chemother 2003;51: 397-400



BIJLAGEN

BIJLAGE 1, PRIMER GEGEVENS VAN DE RT-QPCR

OPRD PRIMERS

OprD gen

Locus: PA0958

Lengte: 1332 basenparen

Primer F: CTACGGCTACGGCGAGGAT

Smelt temperatuur: 55,4°C

Primer R: GACCGGACTGGACCACGTACT

Smelt temperatuur: 58,3°C

Product: 71 basenparen

Sequentie:

ATGAAAGTGATGAAGTGGAGCGCCATTGCACTGGCGGTTTCCGCAGGTAGCACTCAGTTCGCCGTGGCCGACGCATTTCGTACGCGATCA
GGCCGAAGCGAAGGGGTTTCATCGAAGACAGCAGCCTCGACCTGCTGCTCCGCAACTACTATTTCAACCGTGACGGCAAGAGCGGCAGC
GGGGACCGCGTCGACTGGACCAAGGCTTCCTACCACTATGAATCCGGCTTCACCAAGGCACTGTGGGCTTCGGCGTCGATGCCTTC
GGCTACCTGGGCCTGAAGCTCGACGGCACCTCCGACAAGACCGGCACCGGCAACCTGCCGGTGATGAACGACGGCAAGCCGCGCGATG
ACTACAGCCGCGCCGGCGGCCGTGAAGGTGCGCATCTCCAAGACCATGCTGAAGTGGGGCGAGATGCAACCGACCGCCCCGGTCTT
CGCCGCTGGCGGCAGCCGCTGTTCCCGCAGACCGCGACCGGCTTCAGCTGCAGAGCAGCGAATTCGAAGGGCTCGACCTCGAGGCA
GGCCACTTCACCGAGGGCAAGGAGCCGACCACCGTCAAATCGCTGGCGAACTCTATGCCACCTACGCAGGCGAGACCGCCAAGAGCG
CCGATTTTCATTGGGGGCGCTACGCAATCACCGATAACCTCAGCGCTCCCTGTACGGCGCCGAACCTCGAAGACATCTATCGCCAGTATT
ACCTGAACAGCAACTACACCATCCCACTGGCATCCGACCAATCGCTGGGCTTCGATTTCACATCTACCGCACAAACGATGAAGGCAAGG
CCAAGGCCGGCGACATCAGCAACACCACTTGGTCCCTGGCGGCAGCCTACACTCTGGATGCGCACACTTTCACCTTGGCCTACCAGAAGG
TCCATGGCGATCAGCGTTTGATTATATCGGCTTCGGCCGCAACGGCTCTGGCGCAGGTGGCGACTCGATTTTCCTCGCCAACCTCTGTCCA
GTACTCCGACTTCAACGGCCCTGGCGAGAAATCCTGGCAGGCTCGCTACGACCTGAACCTAGCCTCCTATGGCGTTCGCGCCTGACTTT
CATGGTCCGCTATATCAATGGCAAGGACATCGATGGCACAAGATGTCTGACAACAACGTCGGCTATAAGAACTACGGCTACGGCGAGG
ATGGCAAGCACCAAGCAACCACTCGAAGCCAAGTACGTGGTCCAGTCCGGTCGGCCAAGGACCTGTCGTTCCGCATCCGCCAGGCC
TGGCACCGTGCCAACGCCGACCAAGGGCGAAGGCGACCAAGAGATTCGCTGATCGTCGACTATCCGCTGTCGATCCTGTAA

RPOD PRIMERS

rpoD gen

Locus: PA0576

Lengte: 1854 basenparen

Primer F: GGGCTGTCTCGAATACGTTGA

Smelt temperatuur: 54,4°C

Primer R: ACCTGCCGGAGGATATTTC

Smelt temperatuur: 53,8°C

Product: 90 basenparen

Sequentie:

ATGTCCGAAAAAGCGCAACAGCAATCTCGTCTGAAAGAGTTGATCGCCCGAGGCCGTGAGCAGGGATACCTGACTTACGCGGAGGTCA
ACGACCACCTGCCGGAGGATATTTCGATCCGGAACAGGTGGAAGACATCATCCGCATGATCAACGACATGGGGAACAACGTATTTCGAG
ACAGCCCGGATGCGGATGCCCTGTTGCTGGCCGAGGCCGATACCGACGAAGCCGACGCGAAGAAGCCGACGCGGCCCTGGCCGCG
GTGGAAAGCGACATCGGTGCGACACCGACCCGGTGCATGTACATGCGTGAAATGGGTACCGTGGAAGTGTGACCCGCGAAGGCG
AGATCGAAATCGCAAGCGCATCGAGGAAGGCATCCGCGAAGTGATGAGCGCCATCGCCAGTTCCCGGGCACGTTGGACAGCATCCT
GGCCGACTACAATCGCATCGTCCGGAAGGCGGTGCGCTCTCCGACGTCTCAGCGGCTATATCGATCCCGATGACGGCAGCCTGCCCG
CCGAAGAGGTGGAGCCGGTCAACCTGAAGGACGATTCCGCCGACTCGAAAGAGAAGGACGACGAGGAAGAAGAAAGCGACGACAGC
AGCGACAGCGACGACGAAGGCGACGCGGTCCGGATCCGGAAGAAGCCGCTGCGTTTCACCGCGGTCTCCGAGCAGCTCGACAAGG
CCAAGAAGGCCCTGAAGAAGCACGGTGCAGGCGAGCAAGCAGGCCACCGCGAACTACCGGCCTGGCCGAGCTGTTTCATGCCGATCAA
GCTGGTGCCCAAGCAGTTTCGACGCCCTGGTGCAGCGCGTGCCTCCGCTGGAAGGCGTGCAGCGCCAGGAACGCGCCATCATGCAGC
TCTGCGTGCGTGACGCGCGCATGCCGCGTCCGACTTCTGCGCCTGTTCCCGAACACGAGACCGACGAGAAGTGGGTGACAGCGTC
CTGAAGAGCAAGCCGAAGTACGCCGAGGCCATCGAGCGCCTGCGCGACGACATCCTGCGCAACCAGCAGAAGCTGGCGGCCCTGGAAA
GCGAGGTGAGCTGACCGTGCAGGATCAAGGAAATCAACCGCGCATGTCGATCGGCGAAGCCAAGGCTCGCCGGCGGAAGAAGG
AAATGGTTCGAGGCCAACCTGCGCCTGGTGATTTCATCGCCAAGAAGTACACCAACCGCGGCCCTGCAATTCTCGACCTGATCCAGGAA
GGCAACATCGGCCTGATGAAGGCGGTGGACAAGTTTCAATACCGTGCAGGCTACAAGTTCTCCACCTACGCCACCTGGTGGATTTCGCCA
GGCGATACCCGTTTCGATCGCCGACCAGGCACGACCATCCGCATCCCGGTGCACATGATCGAGACGATCAACAAGCTCAACCGCATCTC
CCGCCAGATGCTCCAGGAAATGGGTGCGAGCCACCCGGAAGAGTTGGCGAGCGCATGGACATGCCTGAGGACAAGATCCGCAAG
GTACTGAAGATCGCCAAAGAGCCGATCTCCATGGAAACCCGATCGGTGACGACGAAGATTCGACCTGGGCGATTTCATCGAGGACTC
CACCATGCAGTCGCCGATCGAGATGGCGACCAGCGAGAGCCTCAAGGAATCCACCCGGAAGTCTCGCCGGCCTCACTGCCCGGAA
GCCAAGGTGCTGCGCATGCGCTTCGGCATCGACATGAACACCGACCACCCCTCGAGGAAGTCGGCAAGCAGTTTCGATGTGACCCGCGA
GCGGATCCGCCAGATCGAAGCCAAGGCGCTGCGCAAGCTGCGCCATCCGTCGGAAGCGAGCACCTTCGCTCCTTCGACGAGTGA

BIJLAGE 2, MLVA DATA

TABEL B 2-1: MLVA FOTO OVERZICHT EERSTE RUN& DE FOTO'S

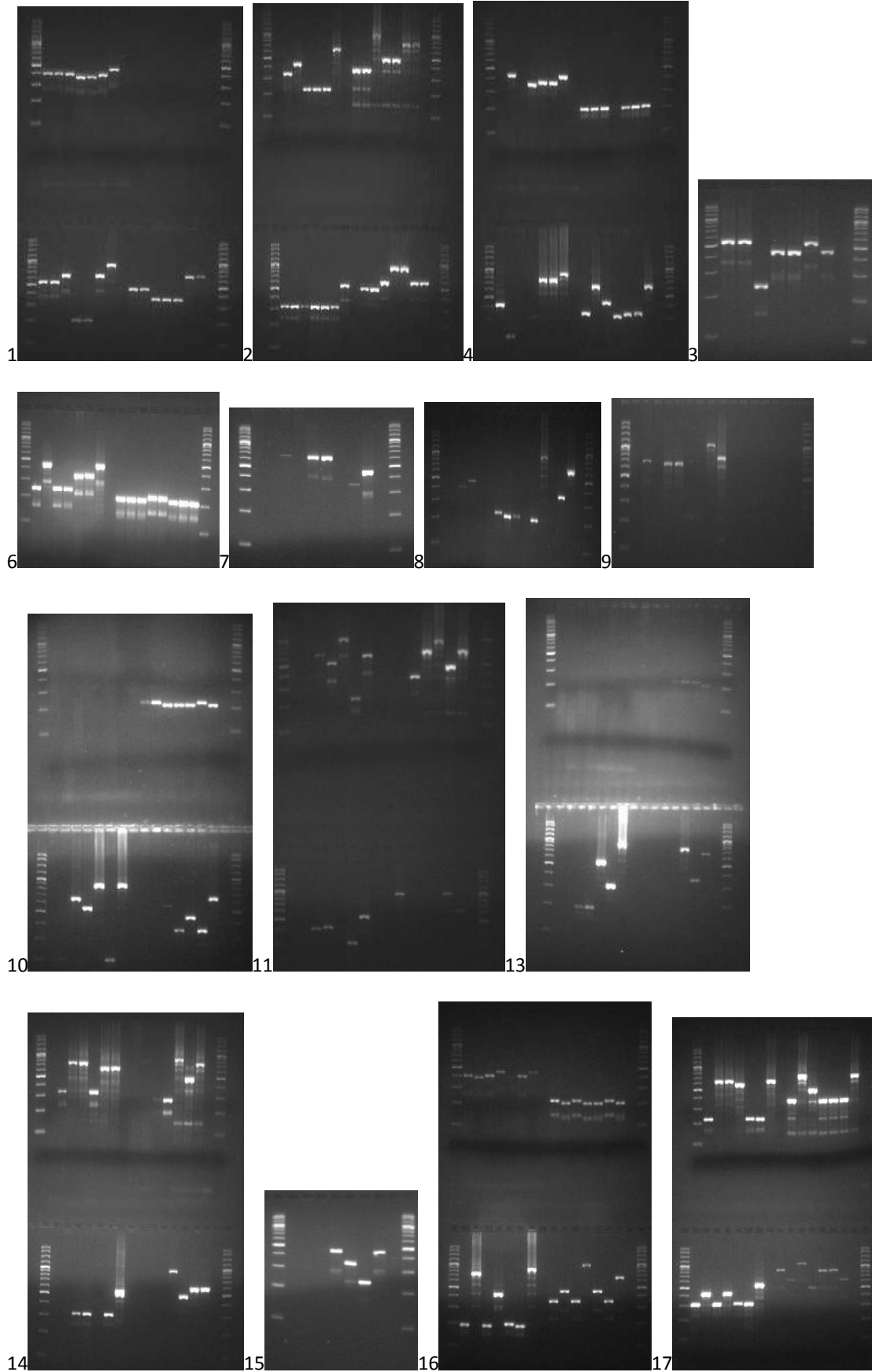
Foto	Isolaat	Locus	Foto	Isolaat	Locus
1	1, 2, 4, 6, 8, 26	77, 127,142, 211	48	132, 136, 140, 141, 143, 146	223
2	1, 2, 4, 6, 8, 26	213, 215, 216, 217	49	153, 154, 171	77, 127, 142, 211, 213, 215
3	1, 2, 4, 6, 8, 26	223	50	153, 154, 171	216, 217, 223
4	28, 35, 38, 44, 54, 55	77, 127,142, 211	51	22, 104, 109, 113, 123, 125	77, 127, 142, 211
5	28, 35, 38, 44, 54, 55	213, 215, 216, 217	52	22, 104, 109, 113, 123, 125	213, 215, 216, 217
6	28, 35, 38, 44, 54, 55, 1, 2, 4, 6, 8, 26	223(28t/m55), 127(1t/m26)	53	22, 104, 109, 113, 123, 125	223
7	28, 35, 38, 44, 66	217, 223	54	129, 134, 137, 142, 149, 156	77, 127, 142, 211
8	28, 38, 66, 44	77, 127, 142, 211	55	129, 134, 137, 142, 149, 156	213, 215, 216, 217
9	28, 35, 44, 66	213, 215, 216	56	129, 134, 137, 142, 149, 156	223
10	72, 87, 90, 93, 117, 151	77, 127,142, 211	57	161, 164, 166, 167, 168, 169	77, 127, 142, 211
11	72, 87, 90, 93, 117, 151	213, 215, 216, 217	58	161, 164, 166, 167, 168, 169	213, 215, 216, 217
12	72, 87, 90, 93, 117, 151	223	59	161, 164, 166, 167, 168, 169	223
13	159, 162, 197, 199, 202, 205	77, 127, 142, 211	60	130	77, 127, 142, 211, 213, 215, 216, 217, 223
14	159, 162, 197, 199, 202, 205	213, 215, 216, 217	61	172, 174, 176, 178, 180, 181	77, 127, 142, 211
15	159, 162, 197, 199, 202, 205	223	62	172, 174, 176, 178, 180, 181	213, 215, 216, 217
16	210, 211, 216, 219, 227, 232	77, 127, 142, 211	63	172, 174, 176, 178, 180, 181	223
17	210, 211, 216, 219, 227, 232	213, 215, 216, 217	64	E23, E24	77, 127, 142, 211, 213, 215, 216, 217
18	210, 211, 216, 219, 227, 232	223	65	E23, E24	223
19	239, 5, 7, 9, 10, 12	77, 127, 142, 211	66	186, 187, 208, 233, 256, 257, E01t/m E08	77, 127
20	239, 5, 7, 9, 10, 12	213, 215, 216, 217	67	186, 187, 208, 233, 256, 257, E01t/m E08	142, 211
21	239, 5, 7, 9, 10, 12	223	68	186, 187, 208, 233, 256, 257, E01t/m E08	213, 215
22	13, 14, 17, 19, 20, 21	77, 127, 142, 211	69	186, 187, 208, 233, 256, 257, E01t/m E08	216, 217
23	13, 14, 17, 19, 20, 21	213, 215, 216, 217	70	186, 187, 208, 233, 256, 257, E01t/m E08	223
24	13, 14, 17, 19, 20, 21	223	71	E09 t/m E22	77
25	24, 29, 46, 80, 82, 95	77, 127, 142, 211	72	E09 t/m E22	127, 142
26	24, 29, 46, 80, 82, 95	213, 215, 216, 217	73	E09 t/m E22	211, 213
27	24, 29, 46, 80, 82, 95	223	74	E09 t/m E22	215, 216
28	97, 139, 147, 150, 152, 165	77, 127, 142, 211	75	E09 t/m E22	217, 223
29	97, 139, 147, 150, 152, 165	213, 215, 216, 217			
30	97, 139, 147, 150, 152, 165	223			
31	170, 173, 175, 177, 179, 185	77, 127, 142, 211			
32	170, 173, 175, 177, 179, 185	213, 215, 216, 217			
33	170, 173, 175, 177, 179, 185	223			
34	191, 193, 200, 3, 15, 25	77, 127, 142, 211			
35	191, 193, 200, 3, 15, 25	213, 215, 216, 217			
36	191, 193, 200, 3, 15, 25	223			
37	31, 37, 62, 64, 66, 69	77, 127, 142, 211			
38	31, 37, 62, 64, 66, 69	213, 215, 216, 217			
39	31, 37, 62, 64, 66, 69	223			
40	73, 79, 84, 86, 88, 89	77, 127, 142, 211			
41	73, 79, 84, 86, 88, 89	213, 215, 216, 217			
42	73, 79, 84, 86, 88, 89	223			
43	91, 105, 114, 119, 126, 128	77, 127, 142, 211			
44	91, 105, 114, 119, 126, 128	213, 215, 216, 217			
45	91, 105, 114, 119, 126, 128	223			
46	132, 136, 140, 141, 143, 146	77, 127, 142, 211			
47	132, 136, 140, 141, 143, 146	213, 215, 216, 217			

De gels in het rood hebben geen resultaat opgeleverd en staan dus ook niet als foto er bij.

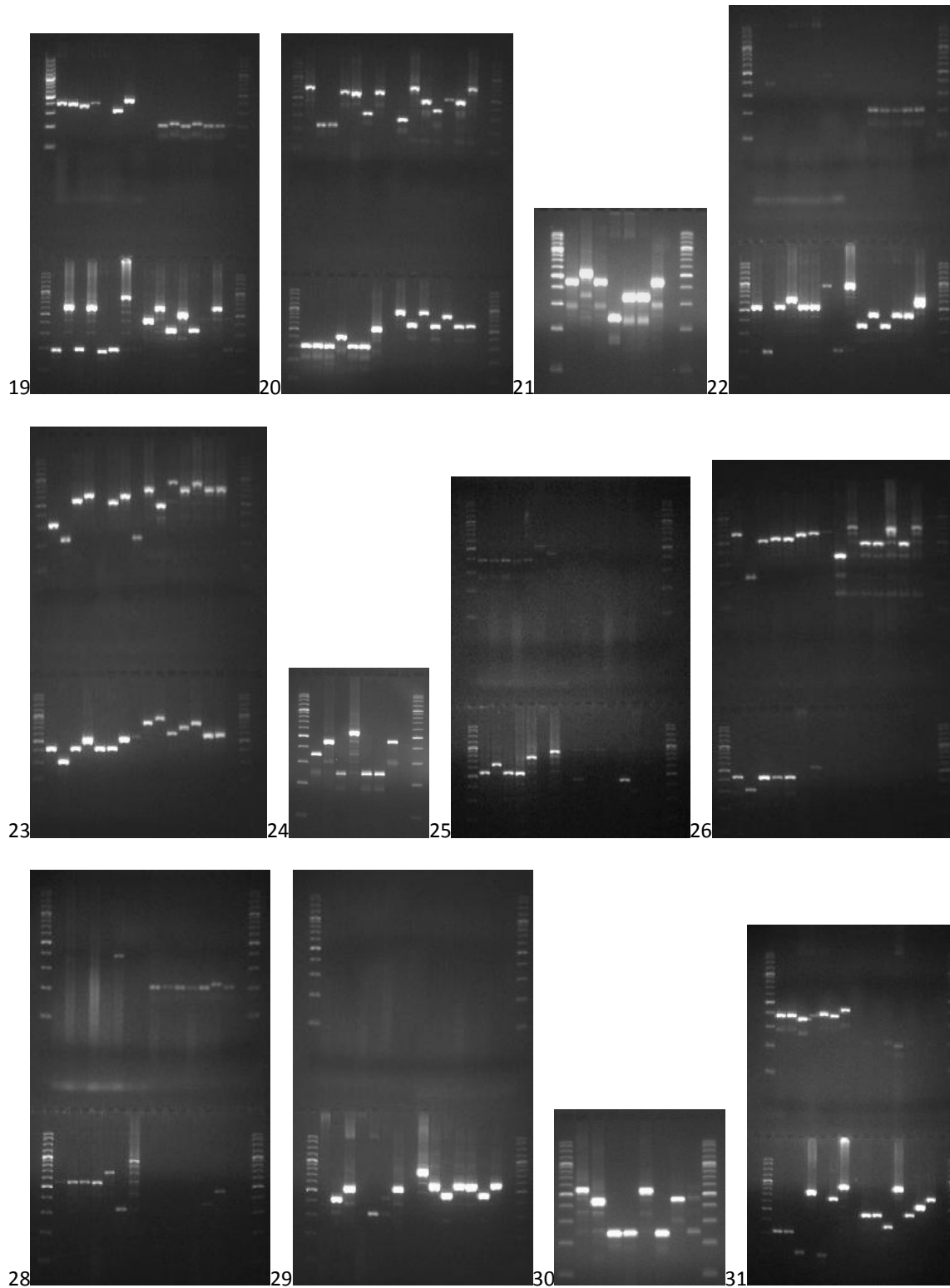
De gels in het blauw zijn ingedeeld in 4 kwarten van 8 bandjes.

De gels in het groen zijn ingedeeld in het eerste locus boven en het tweede locus onder.

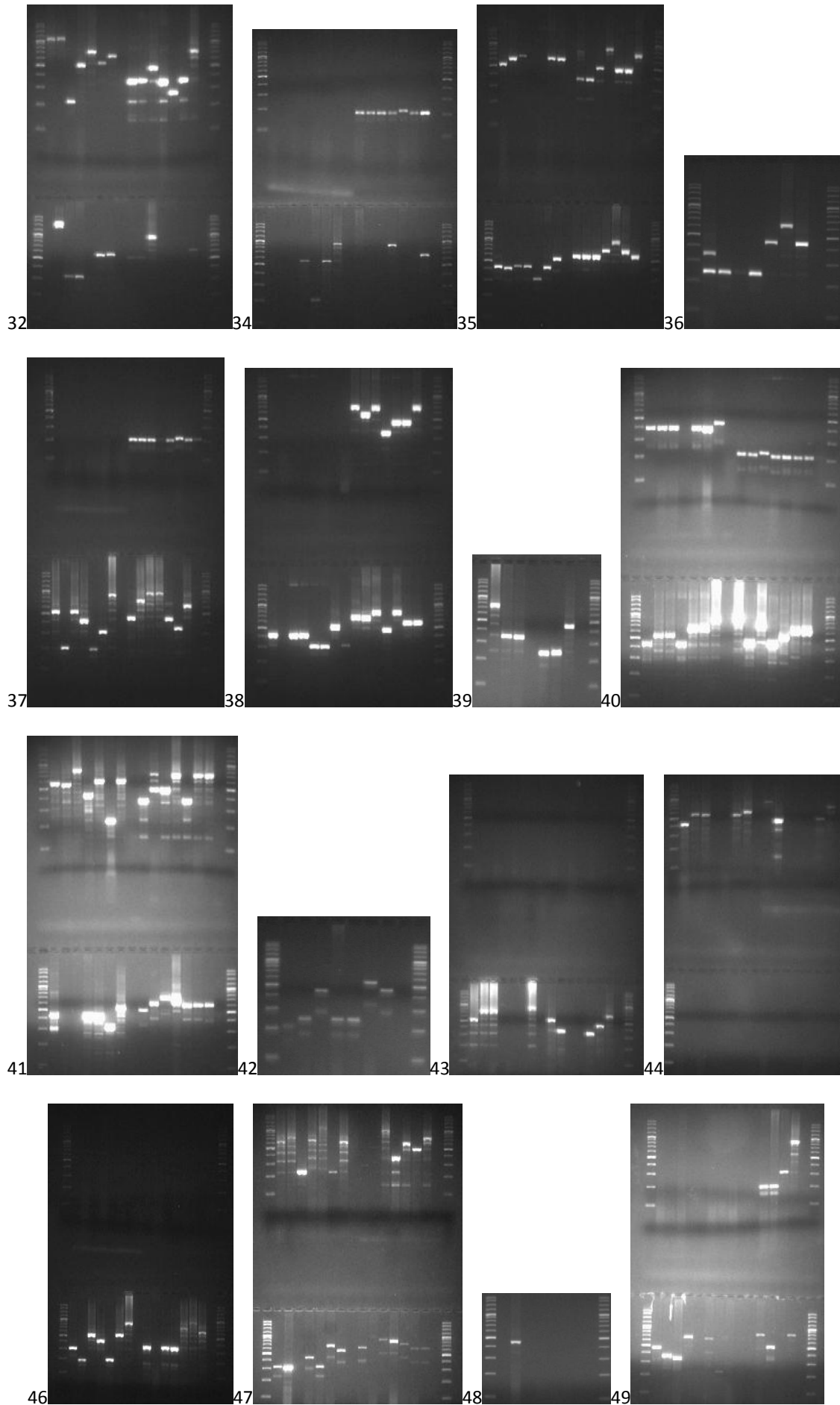
Epidemiologie en resistentie mechanismen van carbapenem-resistente *Pseudomonas aeruginosa*



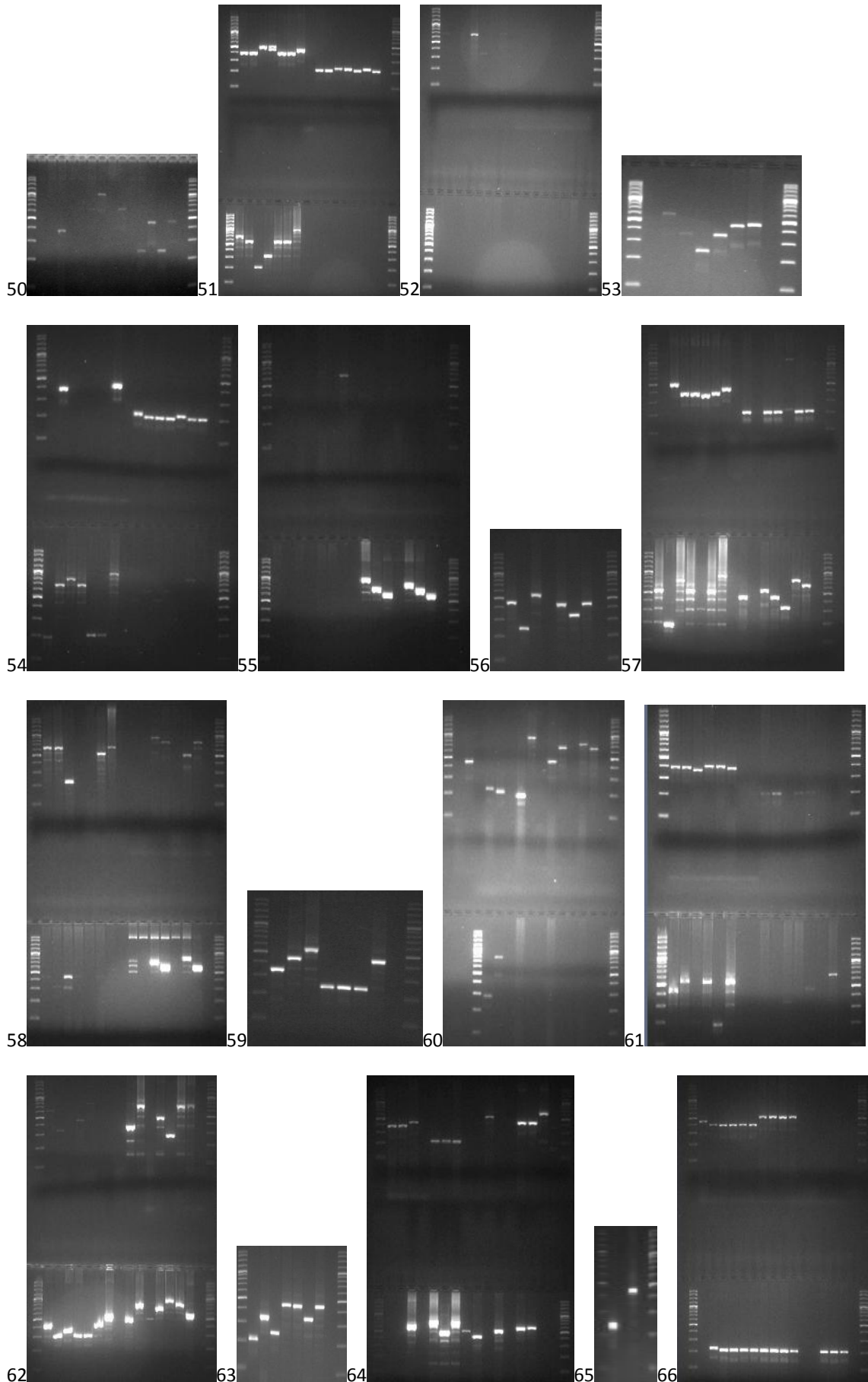
Epidemiologie en resistentie mechanismen van carbapenem-resistente *Pseudomonas aeruginosa*



Epidemiologie en resistentie mechanismen van carbapenem-resistente *Pseudomonas aeruginosa*



Epidemiologie en resistentie mechanismen van carbapenem-resistente *Pseudomonas aeruginosa*

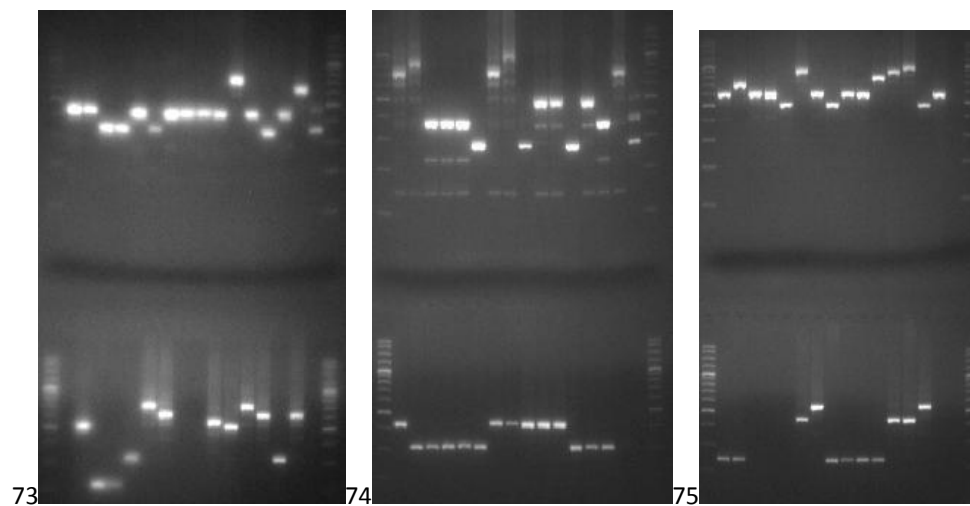
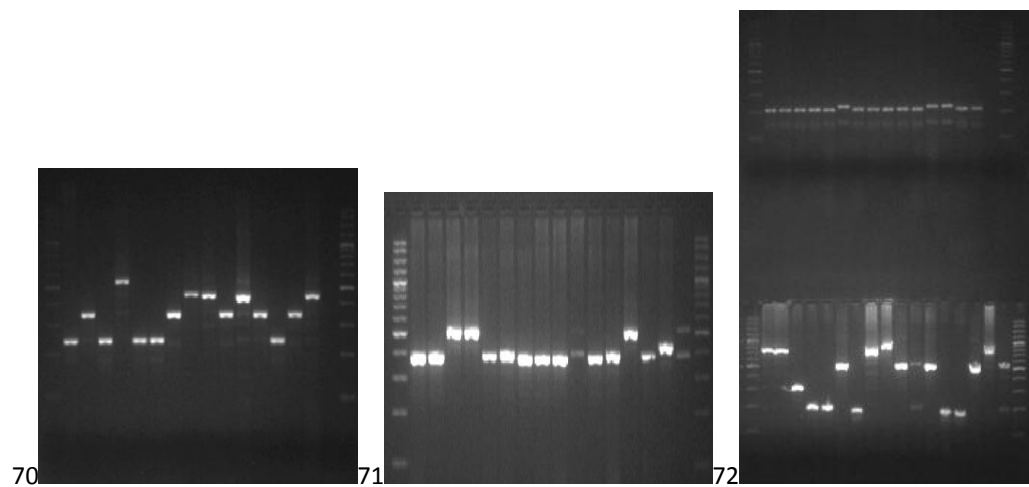
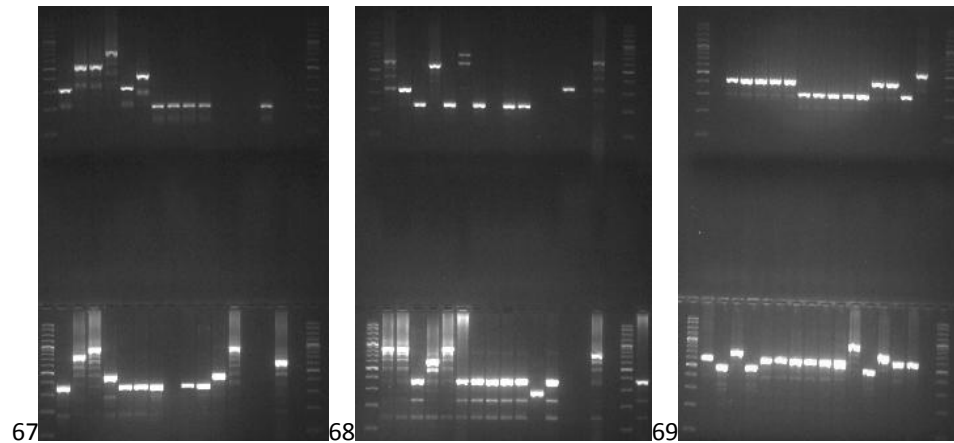


Door: Thomas van der Schalk

49

Begeleiders: Dr. Wil Goessens(Erasmus MC), Dr. Hans Nottet(HU)

Epidemiologie en resistentie mechanismen van carbapenem-resistente *Pseudomonas aeruginosa*



TABEL B 2-2: MLVA FOTO OVERZICHT VAN OVERGEDANE TESTS& DE FOTO'S

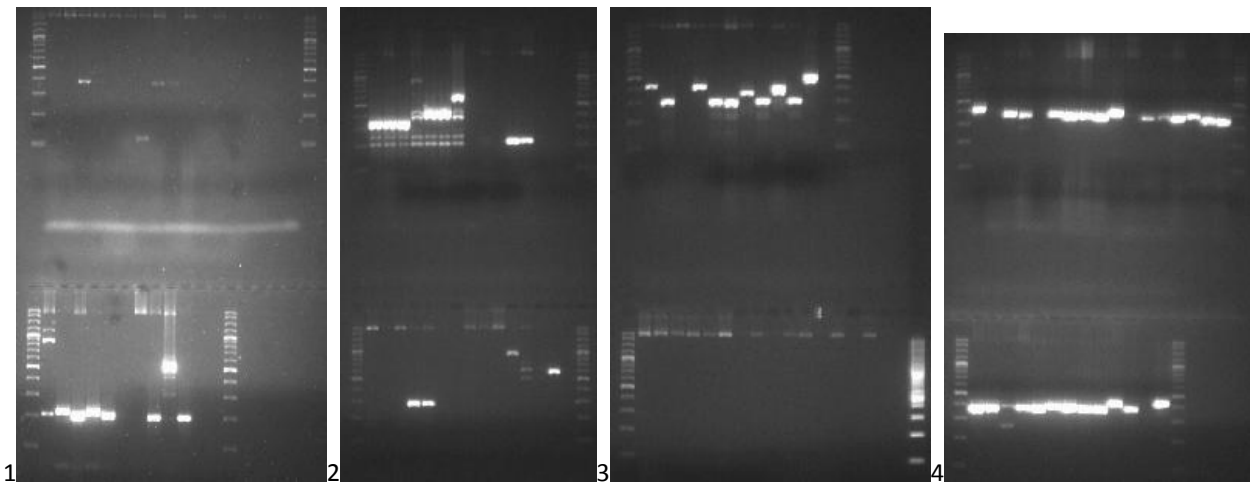
Isolaten met een kleur behoren zijn getest op het locus met die kleur, als een isolaat getest is op alle loci dan is de naam zwart.

De foto's die in het rood zijn aangegeven hebben geen resultaat opgeleverd

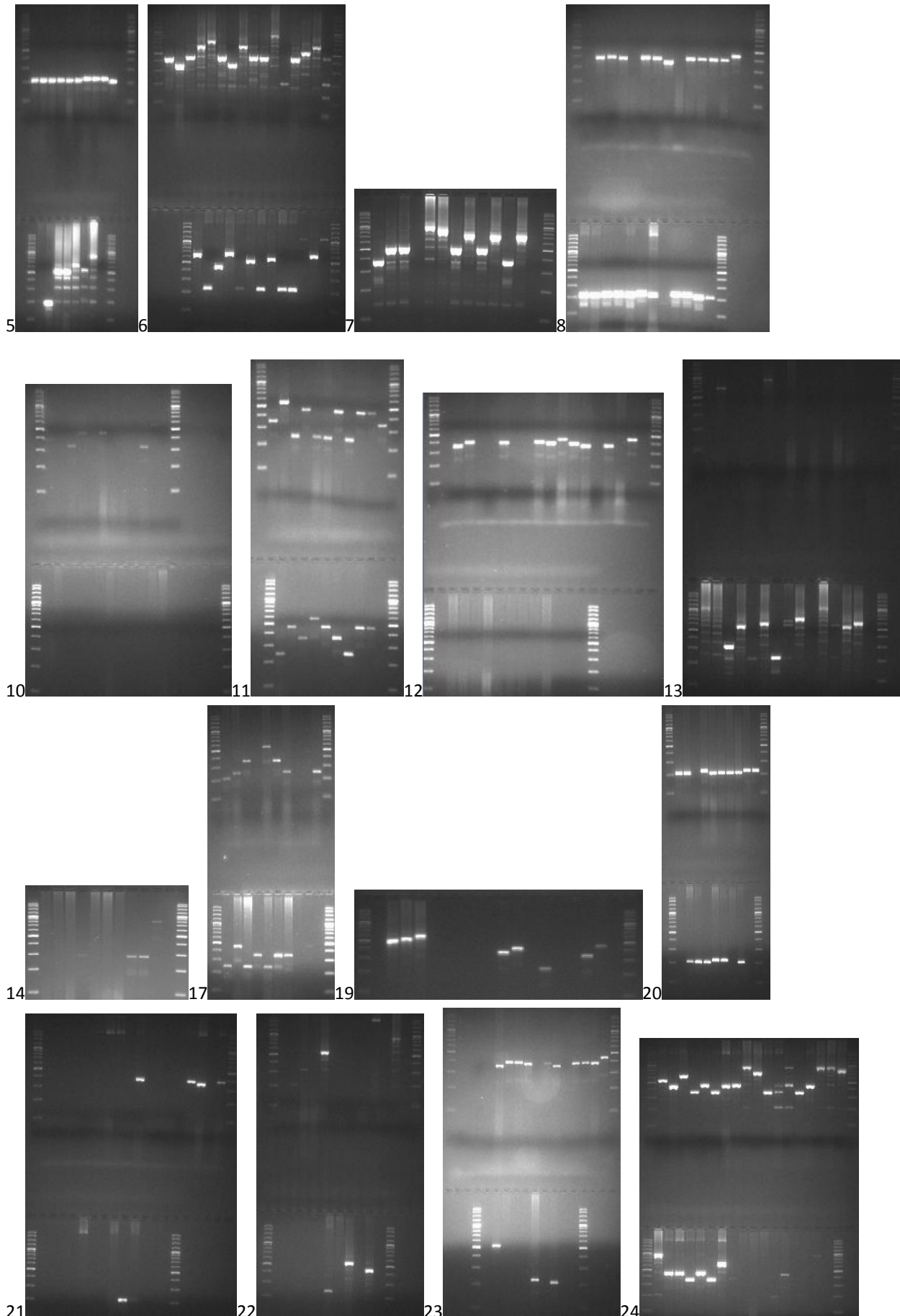
Foto	Isolaat	Locus
1	28, 38, 72, 87, 90, 93, 117, 151, 159, 162, 197, 199, 202, 205, 227, 44	77, 127, 142
2	72, 87, 159, 162, 197, 199, 1, 44, 28, 35	211, 213, 215, 217
3	28, 35, 44, 63, 72, 87, 117, 159, 162, 202, 90, 93, 151, 210, 211, 216, 219, 227, 232	216, 223
4	3, 10, 13, 15, 17, 19, 20, 21, 25, 28, 38, 87, 90, 97, 117, 139, 147, 150, 152, 162, 191, 193, 197, 199, 200, 202, 205, 227	77
5	13, 24, 29, 46, 80, 82, 95, 170, 173, 38, 130, 191, 193, 200	127, 142
6	12, 15, 25, 29, 46, 80, 95, 139, 147, 150, 162, 165, 191, 193, 3, 20, 28, 44, 152, 159	211, 213
7	28, 72, 87, 97, 139, 147, 150, 152, 159, 162, 165	215
8	10, 17, 31, 37, 38, 62, 64, 69, 80, 91, 105, 114, 99, 119, 126, 128, 179, 239	77, 127
9	38, 126, 128, 97, 114, 165, 200	142, 211
10	44, 63, 95, 97, 117, 150, 165, 170, 173, 179, 24, 28, 29, 35, 46, 80, 82, 87, 90, 177, 185, 197	216, 217
11	24, 29, 46, 72, 80, 82, 87, 90, 151, 159, 162, 191, 197, 210, 211, 216, 219, 227, 239	223
12	69, 93, 99, 119, 126, 128, 130, 132, 136, 140, 141, 143, 146, 153, 154, 171, 185	77, 127
13	38, 99, 119, 126, 128, 97, 114, 136, 165, 200, 31, 37, 62, 64, 66, 69, 99	142, 211, 213
14	97, 99, 114, 119, 126, 132, 171, 179, 239	215
15	37, 44, 63, 79, 84, 91, 99, 105, 114, 117, 119, 126, 128, 130, 140, 153, 154, 165, 171, 173, 202	216
16	24, 28, 29, 35, 44, 46, 80, 82, 87, 90, 91, 93, 95, 99, 105, 114, 117, 119, 126, 128, 130, 136, 171, 177, 179, 185, 197	217
17	64, 91, 93, 95, 99, 105, 114, 117, 119, 126, 128, 130, 132, 140, 141, 143, 146, 239	223
18	128, 132, 136, 140, 141, 143, 146, 153, 154, 171, 126	127, 213
19	1, 167, CW34, 10, 38, 69, CW135, 22, 95, 117, 232	213, 77, 223
20	128, 131, 132, 136, 141, 143, 146, 153, 154, 164, 171, 176, 181, 185, 186, E05, E06	127
21	10, 38, 69, 119, 126, 129, 130, 131, 132, 137, 140, 149, 153, 156, 161, 171, CW34, CW135, E05, E06, E07, E08, E18	77, 127
22	38, 119, 126, 128, 131, 176, E05, E06, E07, E18, E23, 95, 117, 142, E11, E12, E13, E24	142, 223
23	10, 38, 69, 119, 126, 129, 130, 131, 132, 142, 149, 153, 156, 161, CW135, E06, E07, E08, E18, 171	77, 127
24	22, 97, 99, 104, 109, 113, 114, 119, 123, 125, 131, 136, 149, 164, 165, 172, 174, 178, 181, 200, CW59, E2, E7, E8, 38, 128, 176, E5, E6, E18	211, 142

Epidemiologie en resistentie mechanismen van carbapenem-resistente *Pseudomonas aeruginosa*

25	1, 99, 104, 109, 125, 126, 129, 131, 134, 137, 142, 149, 156, 168, 172, 176, 181, E2, E5, E6, E8, E9, E12, E16, E24	213
26	22, 97, 99, 104, 109, 113, 123, 125, 126, 129, 131, 132, 134, 137, 142, 149, 156, 161, 164, 168, 171, 176, 180, E5, E7, E8, E14, E20, CW59	215
27	22, 37, 44, 63, 79, 84, 90, 99, 104, 105, 109, 113, 114, 117, 119, 123, 125, 126, 128, 130, 131, 140, 134, 137, 142, 149, 153, 154	216
28	156, 165, 168, 170, 171, 173, 176, 186, 202, E24	216
29	95, 117, 119, 131, 142, E12, E24	223
30	22, 24, 28, 29, 37, 44, 46, 80, 82, 87, 90, 91, 93, 95, 99, 104, 105, 109, 113, 114, 117, 119, 123, 125, 126, 128, 130, 131, 136, 142, 164, 168, 171, 177, 179, 185	217
31	197, 171, CW27, CW35, CW59, CW78, CW135, CW201	217, 127, 215
32	10, 38, 69, 119, 132, 153, E07, E18, 128, 176	77, 142
33	38, 128, 176, E07, E18, 125, 168, E02, E05, E06, E08, E24, 114, 129, 156, 161, 171, 180, E20	142, 213, 215
34	24, 44, 63, 91, 104, 109, 113, 117, 123, 125, 126, 128, 129, 137, 140, 142, 153, 154, 165, 168, 170, 171, 173, 176, 202	216
35	29, 35, 44, 95, 117, 119, 126, 168, 171, 179, 185, 197	217
36	E05, 129, 171, 180, E08, E20, 119, E12	213, 215, 223
37	44, 63, 91, 104, 109, 113, 117, 126, 128, 153, 165, 168, 170, 171, 173, 176, 202, 29, 35, 95, 179, 119, 185, 197	216, 217



Epidemiologie en resistentie mechanismen van carbapenem-resistente *Pseudomonas aeruginosa*

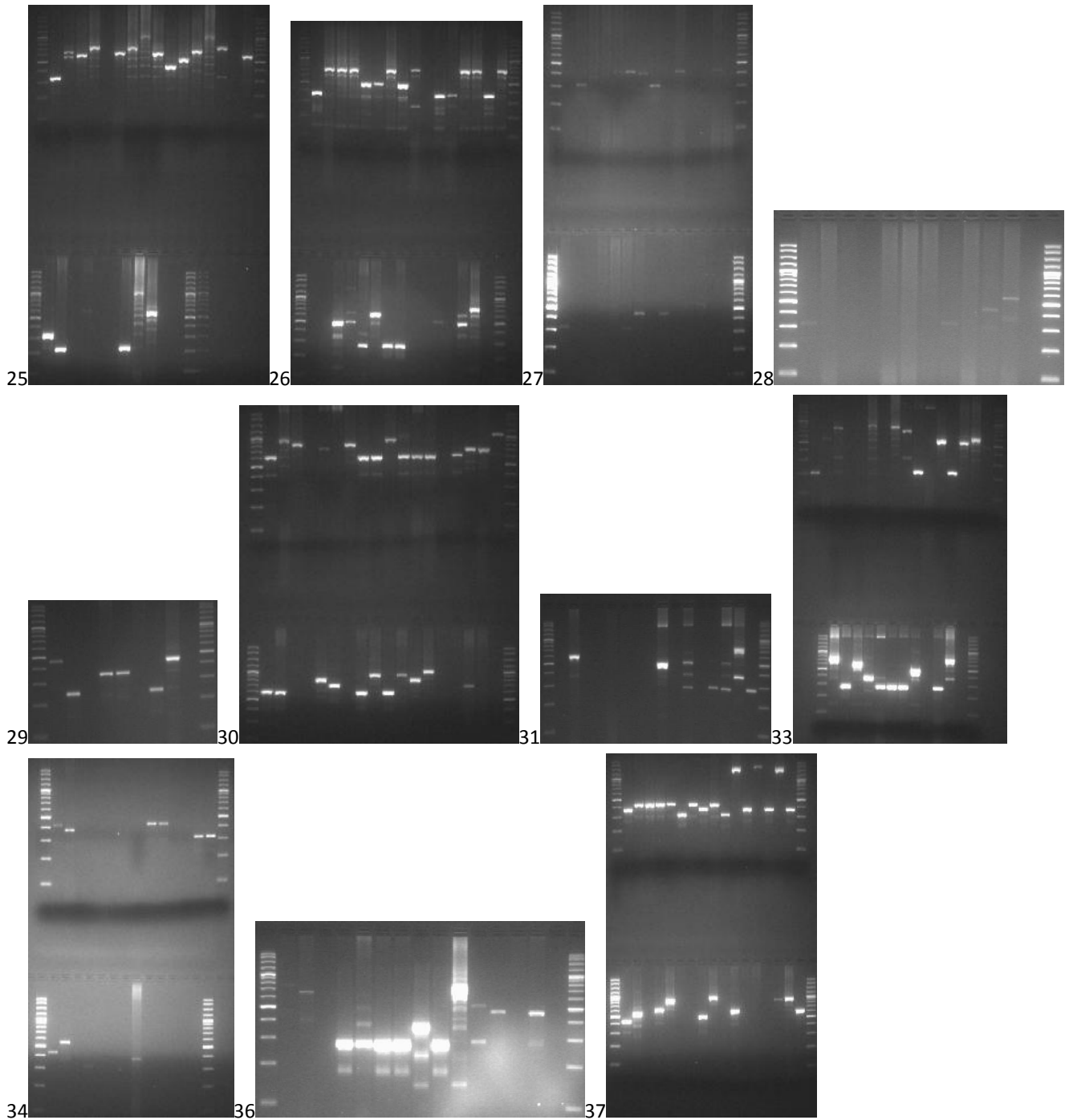


Door: Thomas van der Schalk

53

Begeleiders: Dr. Wil Goessens(Erasmus MC), Dr. Hans Nottet(HU)

Epidemiologie en resistentie mechanismen van carbapenem-resistente *Pseudomonas aeruginosa*



TABEL B 2-3: RUWE DATA MLVA

Stammen	Concentratie (ng/μl)	ms77	ms127	ms142	ms211	ms213	ms215	ms216	ms217	ms223	Type
1	97,82& 356,21	3	8	4	3	2	1	1	1	5	37
2	147,56	3	8	4	3	2	1	1	1	5	37
3	146,35	4	8	4	7	5	5	2	3	2	27
4	118,45	3	8	5	2	3	6	1	2	2	439
5	181,19	3	8	5	5	1	4	1	2	5	136
6	172,80	2,5	9	1	2	1	2	1	5	4	89
7	865,08	2,5	9	1	2	1	2	1	5	4	89
8	228,80	2,5	9	1	2	1	2	1	5	4	89
9	840,14	3	8	5	4	5	1	2	2	2	42
10	745,12& 331,05	99	9	0,5	2	5	2,5	1	4	3	484
12	1058,69	1,5	8	1	3	2	2	1	2	3	411
13	736,77	3	8	4	8	2	4	2	4	3	13
14	943,88	3	8	1	2	1	2	1	5	4	432
15	1254,19	2,5	9	1	2	1	2	1	5	4	89
17	55,52	2,5	8	4	3	4,5	5	2	2	2	421
19	651,17	2,5	8	5	2	5	4	3	3	5	426
20	927,33	2	8	4	4	3	5	2	4	2	414
21	800,39	2	8	4	3	4,5	4	2	2	2	415
22	100,68	3	8	5	4	5	1	2	2	2	42
24	629,45& 252,63	2,5	8	4	3	5	1	2	5	3	506
25	712,46	2	8	4	3	5	2	2	3	6	416
26	105,22	3	8	5	5	1	4	1	2	5	136
28	242,85& 312,39	4	8	3	2	5	1	2	4	2	23
29	1018,78& 231,42	2,5	8	5	5	1	4	1	3	5	500
31	55,37	3	8	4	3	9	4	2	3	7	435
35	201,12& 327,71	4	8	1	5	5	2	1	4	4	477
37	432,13& 231,15	2,5	8	1	6	9	3	1	3	3	243
38	321,33& 150,66	99	8	1	3	4,5	2	2	2	2	485
44	331,77& 267,75	2,5	8	2	2	1	3	99	99	2	514
46	355,33&181,86	2,5	8	4	6	4	2	2	4	2	509
54	426,29	2,5	8	6	2	5	1	1	2	3	428
55	258,79	2,5	8	6	2	5	1	1	2	3	428
62	719,42	3	8	4	8	2	4	2	4	3	13
63	106,07& 601,21	3	9	1	3	5	6	2	2	3	461
64	317,39	2,5	8	3	8	4	1	2	1	1,5	420
66	343,50	2	8	0,5	3	1	2	1	4	2	413
69	507,25& 359,32	99	9	2	2	4,5	2	1	2	2	486
72	143,96	2,5	9	1	2	1	2	1	5	4	89
73	3,83	3	8	3	8	4,5	1	2	1,5	1,5	433
79	305,22& 285,40	3	8	4	3	4	2	2	2	2	459
80	1313,81& 543,20	2,5	8	4	3	4,5	2	2	2	2	255
82	485,13& 222,85	2,5	8	6	3	4,5	4	2	2	2	429
84	561,67& 273,59	3	9	4	6	7	2	2	3	4	464
86	877,32	3	8	3	3	3	4	2	4	2	457
87	315,34& 472,97	1,5	9	1	2	1	2	1	5	4	490
88	379,20	3	8	5	4	5	1	2	2	2	42
89	1032,24	3	8	5	5	1	4	1	2	5	136
90	142,77& 616,84	1,5	8	5	4	5	1	2	2	2	491
91	1258,09& 597,10	3	8	4	4	3	5	2	2	2	462

Epidemiologie en resistentie mechanismen van carbapenem-resistente *Pseudomonas aeruginosa*

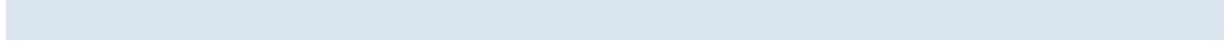
93	127,91& 238,96	2,5	8	4	2	4	4	2	2	3	503
95	634,96& 2,88	6	9	1	2	5	2	1	99	4	480
97	729,25& 408,10	1,5	8	4	3	1	4	2	4	5	492
99	297,98& 206,94	3	9	5	5	5	4	1	2	5	467
104	51,28	3	8	4	2	4,5	4	2	3	5	458
105	13,06&559,05	3	9	6	2	4,5	2	2	3	3	469
109	3,35	6	9	1	3	6	2	2	6	3	481
113	152,99	6	9	2	2	5	2	1	2	2	482
114	515,61& 447,13	3	9	6	3	4,5	4	2	2	2	470
117	142,87& 264,38	2,5	8	7	3	9	5	2	1	2	493
119	6,13& 200,34	99	9	1	3	6	1	1	5	4	487
123	142,31	3	8	4	8	2	4	2	4	3	13
125	231,63	3	9	4	6	7	2	2	3	4	464
126	378,66& 380,83	2	8	2	2	5	4	99	99	2	452
128	79,37& 872,64	3	8	4	3	4,5	2	2	2	2	460
129	369,68	3	9	0,5	3	6	99	1	5	4	471
130	599,61& 601,37	3	9	0,5	3	6	1	1	5	4	472
131	219,66	2,5	8	4	2	9	1	2	2	3	504
132	789,62& 613,81	99	9	2	2	5	1	1	2	2	488
134	56,49	3	8	5	4,5	5	4	2	3	5	466
136	1057,58& 687,39	3	9	0,5	3	6	2	1	5	4	473
137	539,77	3	8	6	3	3	4	1	2	2	468
139	624,13	2	8	4	5	4	6	2	2	4	453
140	58,75& 0,12	2,5	8	4	2	1	6	2	5	3	505
141	710,85	4	8	3	2	6	1	2	4	2	478
142	136,54	2,5	8	5	4,5	4	1	3	4	3	501
143	394,65	3	8	0,5	6	9	3	1	3	3	475
146	438,26	2,5	8	4	8	1	2	4	2	3	510
147	699,36	2	8	4	3	1	5	3	1	2	417
149	654,73	2	9	1	8	9	4	3	4	4	455
150	1175,10	2,5	8	4	3	4,5	2	2	2	2	255
151	260,55	2,5	9	1	2	1	2	1	5	4	89
152	629,26	2,5	8	5	2	1	4	1	2	2	427
153	595,57& 5,95	99	8	1	3	5	4	1	2	4	489
154	407,57& 0,53	2,5	9	1	2	1	2	1	5,5	2	494
156	467,71	2,5	8	1	6	6	3	1	3	3	515
159	139,63	2,5	9	4	2	1	2	1	6	4	431
161	430,50	2,5	8	4	3	5	1	2	3	3	507
162	322,16	2,5	8	1	7	2	4	2	2	3	418
164	378,84	6	9	0,5	2	5	2	1	6	4	483
165	600,39& 735,00	2,5	9	3	3	9	1	99	1	2	499
166	358,74	3	8	6	4	1	5	2	3	5	440
167	383,22	3	8	4	3	4	4	2	2	2	12
168	310,96	2,5	9	2	2	6	3	99	99	2	495
169	426,62	3	8	4	6	4,5	2	2	4	2	436
170	983,77& 0,68	2,5	9	2	3	9	1	99	1	2	496
171	594,29& 762,85	3	99	2	2	4,5	1	99	99	2	474
172	418,84	2,5	8	3	8	4,5	1	2	1,5	1,5	513
173	13,04& 427,99	2,5	9	2	3	9	1	99	1	2	496
174	753,50	2,5	8	4	8	2	4	1	4	2	511
175	644,80	2	9	1	2	1	2	1	5	4	214
176	404,87	2	8	6	2	2	3	99	1	2	454

Epidemiologie en resistentie mechanismen van carbapenem-resistente *Pseudomonas aeruginosa*

177	1339,44& 315,38	2,5	8	6	7	4	1	1	4	3	498
178	519,47	3	8	4	7	3	2	1	3	4	463
179	602,65& 315,38	3	9	0,5	3	6	1	1	99	4	476
180	340,74	3	8	1	3	6	99	1	5	4	456
181	727,68	2,5	8	4	8	1	4	2	4	3	512
185	11,51& 0,99	2,5	8	5	4	4	1	3	5	3	502
186	306,96	4	9	2	2	5	5	1	2	2	479
187	81,89	3	9	4	5	2	5	2	1	3	447
191	983,54	2,5	8	4	3	4	1	2	2	2	422
193	304,92	2,5	8	5	4	5	1	2	2	2	270
197	79,33& 764,34	3	9	1	3	6	1	1	5	4	445
199	112,46	3	9	1	3	6	1	1	5	4	445
200	624,28& 436,65	2,5	8	4	3	4	2	2	2	2	253
202	92,86& 430,78	2,5	9	4	6	2	5	2	1	3	508
205	121,69	4	9	2	2	5	2	1	2	2	68
208	414,50	3	8	4	7	1	1	2	3	2	437
210	111,96	3	9	0,5	2	1	1	1	4	3	442
211	93,84	2,5	8	6	3	5	4	2	2	5	430
216	46,50	3	9	0,5	2	5	2	1	6	4	443
219	56,76	4	8	3	8	4,5	1	2	1	3	448
227	71,22	2,5	8	1	3	1	1	1	4	2	419
232	80,76	3	9	0,5	2	1	1	1	4	3	442
233	125,01	3	8	6	3	4,5	3	2	1	5	441
239	170,26	3	9	1	3	5	1	1	5	4	446
256	70,55	3	8	2	2	1	5	2	2	2	55
257	473,66	3	8	3	2	6	1	2	2	2	434
Controle aflezen											
(CW) 135	459,15	2,5	8	4	3	4,5	2	2	2	2	255
(CW) 201	429,13	2,5	8	4	3	4,5	2	2	2	2	255
(CW) 27	243,29	4	9	2	2	5	2	1	2	2	68
(CW) 34	406,73	2,5	8	4	3	4,5	2	2	2	2	255
(CW) 59	426,22	2,5	8	4	3	4,5	2	2	2	2	255
(CW) 78	466,73	2,5	8	4	3	4,5	2	2	2	2	255
Vergelijking met Raman spectroscopie											
RA1	281,83	6	8	1	2	1	1	1	2	3	449
RA2	167,49	6	8	1	2	1	1	1	2	4	450
RA3	161,35	6	8	1	2	1	1	1	2	4	450
RA4	201,57	6	8	1	2	1	1	1	2	3	449
RA5	218,70	2,5	9	1	3	6	99	1	5	4	521
RA6	257,22	4	8	3	7	4,5	1	2	1	3	526
RA7	85,62	99	8	99	3	2	2	2	3	2	519
RA8	113,64	6	8	1	2	1	1	1	2	3	449
RA9	474,23	3	8	6	3	1	4	2	2	2	516
RA10	211,28	3	8	2	3	4	5	1	3	2	520
RA11	301,28	6	8	1	2	1	1	1	2	2	524
RA12	235,66	6	8	1	2	9	1	1	2	99	525
RA13	427,34	2,5	8	4	3	2	1	1	1	5	517
RA14	251,81	3	9	0,5	2	6	2	1	5	4	518
RA15(211)	195,44	2,5	8	6	3	5	4	2	2	5	430
RA16	363,18	2,5	8	7	3	4,5	6	2	1	2	522
RA17(17)	1231,44	2,5	8	4	3	4,5	5	2	2	2	421
RA18(38)	222,39	99	8	1	3	4,5	2	2	2	2	485

Epidemiologie en resistentie mechanismen van carbapenem-resistente *Pseudomonas aeruginosa*

RA19	347,63	2,5	8	4	6	4	2	2	3	2	424
RA20	436,51	2,5	9	0,5	3	6	99	1	4	4	523
RA21	438,61	6	9	0,5	2	5	2	1	5	4	451
RA22	220,52	2,5	8	4	3	2	2	1	1	5	425
RA23(82)	535,24	2,5	8	6	3	4,5	4	2	2	2	429
RA24	211,96	2,5	8	4	3	4,5	2	2	2	2	255

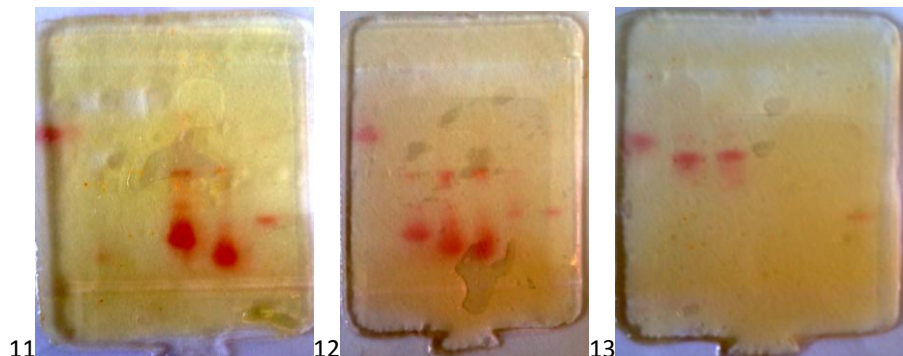
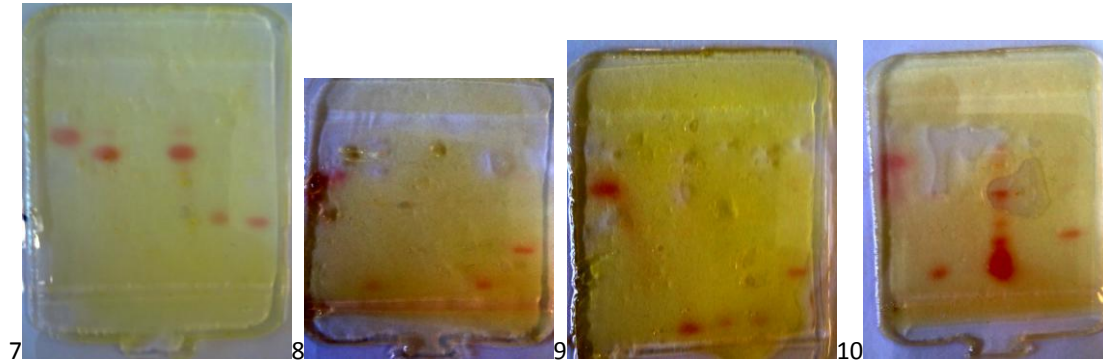
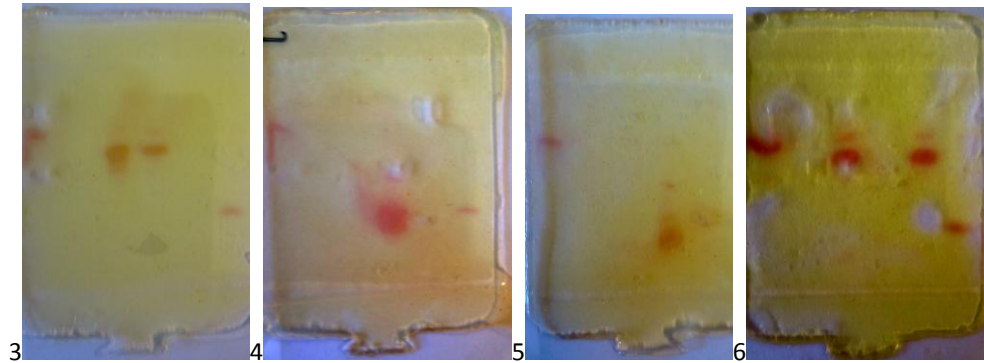
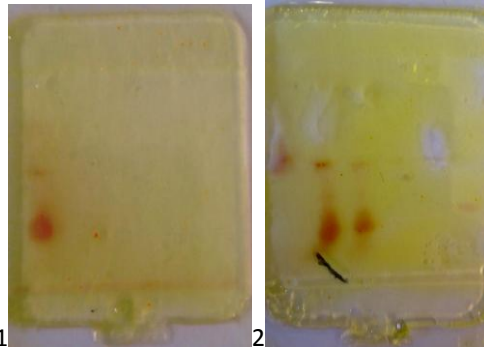


BIJLAGE 3, IEF RESULTATEN: FOTO'S EN TABEL

Foto	Stammen
1	1, 97, 147, ATCC 27853
2	1, 2, 4, 6
3	8, 150, 158, 159
4	165, 170, 203, S1
5	S2, S3, 1
6	14, 17, 21, 23
7	34, 35, 36, 38
8	26, 27, 28, 29
9	44, 46, 54, 55
10	3, 9, 10, 12
11	13, 31, 37, 62
12	64, 80, 88, 119
13	16, 18, 27, 30

Op alle foto's met uitzondering van foto 1 is er van links naar rechts: TEM-1, de stammen behorend bij de foto & SHV-1 op de gel geplaatst.

Voor alle foto's geldt dat bovenaan de gel is de pH 3 en onderaan de gel is de pH 9.



Epidemiologie en resistentie mechanismen van carbapenem-resistente *Pseudomonas aeruginosa*

In deze tabel staan voor alle geteste stammen wat er is aangetroffen op de IEF gel

Stammen	Eigenschappen	AmpC- β -lactamase	Andere β -lactamase
1	Waarschijnlijk AmpC positief	+	+
2	Waarschijnlijk AmpC positief	+	+
3		+	-
4		-	-
6		-	-
8		-	-
9		-	-
10		+	-
12		-	-
13		-	-
14		-	-
16	VIM-2 positief	-	+
17		-	+
18	VIM-2 positief	-	+
21		-	-
23		-	+
26	Waarschijnlijk AmpC positief	+	-
27	VIM-2 positief	-	-
28		-	-
29	Waarschijnlijk AmpC positief	+	-
30	VIM-2 positief	-	-
31		-	-
34		-	+
35		-	-
36		-	+
37	Waarschijnlijk AmpC positief	-	+
38	Waarschijnlijk ESBL positief	-	+
44		-	-
46	Waarschijnlijk AmpC positief	+	-
54		+	-
55		+	-
62		+	-
64	Waarschijnlijk AmpC positief	-	+
80	Waarschijnlijk AmpC& ESBL positief	+	-
88	Waarschijnlijk AmpC positief	+	-
97		-	-
119	Waarschijnlijk AmpC positief	-	+
147		-	-
150		-	+
158		-	+
159		-	-
165		-	-
170		-	-
203		-	2x +
S1		-	-
S2		-	-
S3		-	-

BIJLAGE 4, RUWE DATA VAN DE RT-QPCR OPTIMALISATIE

De resultaten uit tabel 1 zijn gebruikt om de percentages uit te rekenen van tabel 3-4-1, en de resultaten van tabel 2 en 3 zijn gebruikt om de percentages uit te rekenen van tabel 3-4-2.

Tabel 1 Optimalisatie resultaten van de OprD en rpoD primers voor de qPCR, met uitzondering van de standaarddeviatie en de te testen concentraties zijn alle waarden die in deze tabel staan een gemiddelde van de test resultaten.

Primer	[Primer]	Tm (°C)	Standaarddeviatie	f'	Standaarddeviatie	Ct	Standaarddeviatie
OprD	5μM	82,65	0,212	0,352	0,008	6,17	0,028
rpoD	5μM	80	0	0,411	0,031	5,73	0,523
OprD	4μM	82,95	0,212	0,378	0,011	6,55	0,113
rpoD	4μM	80,6	0	0,469	0,027	6,16	0,092
OprD	3μM	82,8	0	0,373	0,011	6,59	0,198
rpoD	3μM	80,6	0	0,439	0,024	6,16	0,244
OprD	2μM	82,5	0	0,37	0,021	6,72	0,247
rpoD	2μM	80,3	0	0,467	0,019	6,47	0,233
OprD	1μM	81,8	0	0,365	0	6,84	0,085
rpoD	1μM	79,8	0,283	0,468	0,003	6,76	0,085
OprD	0,5μM	79,45	0,212	0,295	0,007	7,12	0,057
rpoD	0,5μM	75,9	0	0,346	0,041	7,4	0,495

Tabel 2 Optimalisatie resultaten van de concentratie magnesiumchloride getest met 4 verschillende concentraties primers. Met uitzondering van de standaarddeviatie en de te testen concentraties zijn alle waarden die in deze tabel staan een gemiddelde van de test resultaten. De getallen in het rood bij OprD [3μM] met 5mM MgCl₂, rpoD [2μM] met 4,5mM en 5mM zijn niet gelukt in de reeks en voor deze monsters is er tabel 3-4-3

Primer	[Primer]	[MgCl ₂]	Tm(°C)	Standaarddeviatie	f'	Standaarddeviatie	Ct	Standaarddeviatie
OprD	4μM	4mM	81,8	0,849	0,318	0,02	5,94	0,064
OprD		4,5mM	82,25	0,636	0,308	0,005	6,07	0,156
OprD		5mM	82,25	0,636	0,296	0,025	5,8	0,841
OprD		5,5mM	81,5	0,424	0,255	0,002	5,56	0,148
OprD		6mM	81,15	0,495	0,235	0,009	5,4	0,106
OprD	3μM	4mM	82,55	0,212	0,348	0,003	6,29	0,24
OprD		4,5mM	82,85	0,212	0,309	0,001	6,04	0,269
OprD		5mM	99	99	99	99	99	99
OprD		5,5mM	81,8	0,424	0,23	0,022	5,23	0,134
OprD		6mM	81,3	0,707	0,222	0,016	5,25	0,163
rpoD	3μM	4mM	80,5	0	0,446	0,002	6,3	0,007
rpoD		4,5mM	81	0,283	0,418	0,018	5,89	0,396
rpoD		5mM	80,8	0	0,413	0,018	6,08	0,163
rpoD		5,5mM	80,5	0	0,364	0,027	6	0,106
rpoD		6mM	80,05	0,212	0,331	0,051	5,66	0,417
rpoD	2μM	4mM	80,65	0,212	0,477	0,014	6,77	0,099
rpoD		4,5mM	99	99	99	99	99	99
rpoD		5mM	99	99	99	99	99	99
rpoD		5,5mM	79,45	0,212	0,415	0,007	6,64	0,021
rpoD		6mM	79,15	0,212	0,433	0,009	6,74	0,191

Tabel 3 optimalisatie resultaten van concentratie magnesiumchloride die niet in de reeks zijn gelukt. Met uitzondering van de standaarddeviatie en de te testen concentraties zijn alle waarden die in deze tabel staan een gemiddelde van de test resultaten.

Primer	[MgCl ₂]	Tm(°C)	Standaarddeviatie	f'	Standaarddeviatie	Ct	Standaarddeviatie
OprD [3μM]	4mM	80,95	0,212	0,383	0	7,35	0,113
OprD [3μM]	5mM	80,65	0,212	0,293	0,013	6,62	0,311
rpoD [2μM]	4mM	78,85	0,212	0,469	0,016	6,87	0,184
rpoD [2μM]	4,5mM	78,4	0,424	0,417	0,024	6,6	0,233
rpoD [2μM]	5mM	77,1	0,424	0,328	0,009	5,75	0,042