

Molecular detection to improve surveillance of multi-resistant bacteria

Citation for published version (APA):

Nijhuis, R. H. T. (2015). *Molecular detection to improve surveillance of multi-resistant bacteria*. Maastricht University.

Document status and date:

Published: 01/01/2015

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

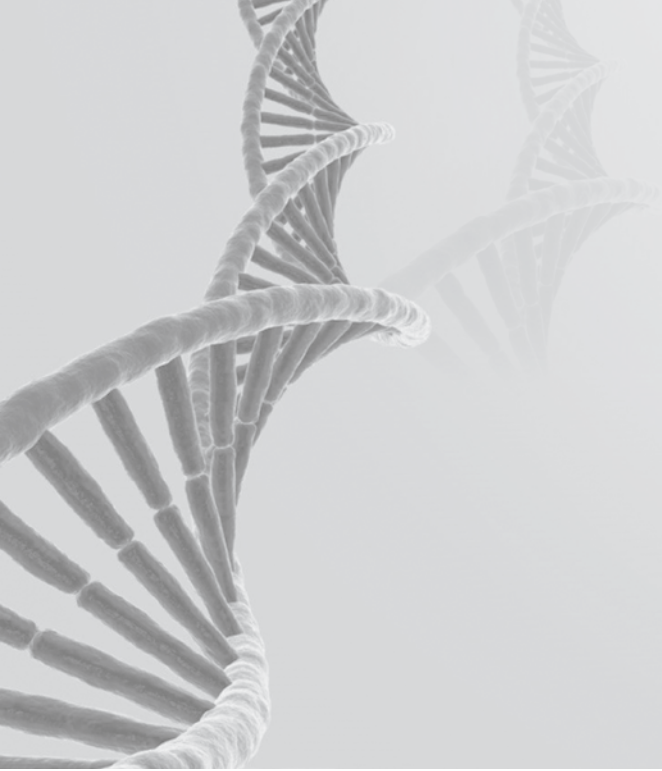
providing details and we will investigate your claim.



SUMMARY

Antimicrobial resistance is emerging worldwide and considered one of the major threats in healthcare. This increasing resistance has major consequences, not only for the correct treatment of the individual patient, but also for hospitals where it is continuously challenging infection control and hygiene procedures. Finally, worldwide dissemination of antimicrobial resistance is seen and can now rapidly emerge everywhere in the world. Although guidelines have been developed in order to identify carriers of highly resistant microorganisms (HRMOs) as rapid as possible, the recommended method of laboratory detection of HRMOs is mostly time-consuming. Moreover, since the laboratory detection mostly consists of phenotypic methods, performance of these methods can be insufficient. The aim of this thesis was to improve laboratory detection of HRMOs by introducing molecular assays able to detect all kind of resistance genes, and show the clinical importance of these molecular assays for the rapid and reliable detection of resistance genes. **Chapter 1** gives an overview on the mechanisms of resistance, epidemiology and current methods to detect the most prevalent and clinically important HRMOs; methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) and carbapenemase producing *Enterobacteriaceae* (CPE). **Chapter 2** describes the evaluation of a ligation-mediated real-time PCR assay that is able to detect the most prevalent genes mediating ESBL. The performance of the molecular assay was compared with the performance of the combination disc test (CDT), a phenotypic method that is recommended to be used for the confirmation of ESBLs by the NVMM guideline on the laboratory detection of HRMOs. Therefore, 172 prospective putative ESBL-positive *Enterobacteriaceae* isolates from clinical specimens based on Vitek2 results were included in this study. Positive ESBL results were obtained in 100 and 95 isolates using CDT and the real-time PCR assay, respectively. Seven discrepancies were identified, of which six isolates were detected CDT positive, real-time PCR negative. The remaining discrepant isolate was detected CDT negative, real-time PCR positive. Discrepancy testing included both the Check-MDR CT103 microarray and PCR and sequencing and confirmed the results obtained using the real-time PCR assay. It was concluded that the performance of the ligation-mediated real-time PCR assay was superior over the recommended phenotypic method. Moreover, the molecular assay provides an important reduction in turnaround time (~4.5 h versus overnight incubation using CDT) for ESBL confirmation. **Chapter 3** focuses on the distribution of ESBL genes in our region. Using the Check-ESBL assay, a microarray based system able to detect TEM, SHV or CTX-M genes and at the same time specifies the CTX-M group, we were able to generate an overview on the ESBL genes present in our region. In 247 isolates, a total of 274 ESBL genes were identified, of which CTX-M1 group was detected predominantly, followed by CTX-M9 group, SHV, TEM and CTX-M2 group. Furthermore, when four different patient categories were distinguished, we were able to determine differences in the identified ESBL genes per patient category. Here, it was shown that CTX-M9 group ESBLs were significantly more prevalent in ICU patients, whereas SHV ESBLs were more common in hospitalized patients than in outpatients. **Chapter 4** presents the results of our MRSA screening approach over a 2-year period. This MRSA screening approach consists of overnight selective broth enrichment, followed by real-time PCR assays targeting *mecA*, *mecC*

and the *S. aureus*-specific SA442-gene, with subsequent confirmation using a staphylococcal cassette chromosome *mec* element (SCC*mec*)-*orfX*-based real-time PCR assay (GeneOhm MRSA assay) and culture. The performance of the real-time PCR assays was evaluated using a set of 104 assorted MRSA isolates and showed high sensitivity and specificity. During the 2-year study-period, 13,387 samples were analyzed for the presence of MRSA. Based on the results of the real-time PCR assays only, 95.2% of the samples could be reported as negative within 24 h after arrival at the laboratory. Eventually, after detection performed using the molecular assays and subsequent culture, 2.6% of all samples was reported as MRSA positive. This molecular screening approach proved to be an accurate method for obtaining reliable negative results within 24 h after arrival at the laboratory and contributes to improvement of infection control programs, especially in areas with a low MRSA prevalence. **Chapter 5** describes the clinical application of a likewise approach for the detection of CPE. Using two different broths, followed by detection using a commercially available ligation-mediated real-time PCR assay (Check-MDR Carba assay), we were able to determine the presence of the most prevalent carbapenemase genes (KPC, VIM, NDM, IMP, OXA-48) in rectal swab samples. Over a 14-month period, 454 individual patients were screened using this method. In samples obtained from 6 patients (1.3%), a CPE could be detected using the real-time PCR assay, all of which could be confirmed using culture. Of these six patients, that all had been hospitalized in countries known for a high prevalence of CPE producers, four patients carried an OXA-48 producer, while in the two remaining patients a KPC-producer was identified. Since early identification and isolation of carriers are key components of an effective infection control strategy in hospitals, this method may be a major improvement in the challenge to reduce the spread of CPE. **Chapter 6** describes the evaluation of a new real-time PCR assay (Check-Direct CPE assay) that has been developed for the detection of carbapenemase genes KPC, VIM, NDM, OXA-48 directly from DNA isolated from rectal swabs. Using 83 non-duplicate isolates, the assay demonstrated 100% sensitivity and sensitivity. To determine the performance of the assay directly from DNA isolated from rectal swabs, we spiked rectal swabs with serial dilutions of 19 different carbapenemase producers. Limits of detection of the real-time PCR assay was determined and compared with a selective medium (ChromID Carba), that is recommended by the NVMM guideline to screen for the presence of CPE. Besides OXA-48 producers with low MICs for carbapenem antibiotics, that are poorly detected by this selective medium, the limits of detection of the real-time PCR assay were comparable to the limits of detection obtained with the ChromID Carba. Results can be obtained within 3h using the Check-Direct CPE assay, in comparison with overnight incubation followed by subsequent confirmation using selective media. Therefore, we concluded that the real-time PCR assay looks promising as a CPE screening method and can be an important improvement in infection control programs. In the final **chapter 7**, the results of the preceding chapters are discussed and future perspectives on molecular detection of antimicrobial resistance are given.



SAMENVATTING

Wereldwijd is er een toename te zien in antimicrobiële resistentie, welke wordt gezien als één van de grootste dreigingen van de gezondheidszorg. Deze toenemende resistentie heeft grote gevolgen, niet alleen voor de correcte therapie voor de individuele patiënt, maar ook voor ziekenhuizen waar resistentie een uitdaging is voor hygiëne en infectiepreventie maatregelen. Tenslotte is wereldwijde verspreiding van antimicrobiële resistentie nu al een feit, en is het reëel om te veronderstellen dat de resistentie overal ter wereld verder toe gaat nemen. Om dragers van bijzonder resistente micro-organismen (BRMOs) zo snel mogelijk te kunnen identificeren, zijn er specifieke richtlijnen opgesteld. Zo is er een richtlijn welke aanbevelingen doet omtrent laboratorium diagnostiek voor het aantonen van de BRMOs. De hierin aanbevolen detectiemethoden zijn voornamelijk phenotypische methoden, welke niet alleen een lange turn-around-time hebben, maar ook niet in staat zijn om alles correct te detecteren. Het doel van het onderzoek beschreven in dit proefschrift is om de detectie van BRMOs te verbeteren, waarbij moleculaire technieken belangrijk zijn voor snelle en betrouwbare detectie van resistentiegenen. **Hoofdstuk 1** geeft een overzicht van de resistentiemechanismen, epidemiologie en huidige detectie methoden van de meest voorkomende en klinisch relevante BRMOs; meticilline resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA), extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) en carbapenemase producerende Enterobacteriaceae (CPE). **Hoofdstuk 2** beschrijft vervolgens de evaluatie van een ligatie-afhankelijke real-time PCR assay, welke de meest voorkomende ESBL genen (TEM, SHV en CTX-M) kan detecteren. Voor deze evaluatie zijn de resultaten van de moleculaire assay vergeleken met de resultaten van de combination disc test (CDT), een phenotypische methode welke door de NVMM richtlijn (laboratorium diagnostiek van BRMOs) wordt aanbevolen voor de confirmatie van ESBLs. Voor deze vergelijking zijn 172 klinische Enterobacteriaceae isolaten getest, welke op basis van Vitek2 resultaten verdacht waren voor ESBL. Honderd isolaten waren ESBL positief volgens de CDT en 95 ESBL positief volgens de real-time PCR assay. Er werden zeven discrepante resultaten waargenomen, waarvan zes isolaten positief waren met de CDT, maar negatief met de real-time PCR assay. Het resterende isolaat was CDT negatief, terwijl het positief was met de real-time PCR assay. Discrepancie analyse werd uitgevoerd met de Check-MDR CT103 micro-array en PCR met sequencing, waarbij de resultaten van de real-time PCR allemaal werden bevestigd. Naar aanleiding van dit onderzoek was de conclusie dat de werking van de ligatie-afhankelijke real-time PCR assay superieur is ten opzichte van de aanbevolen phenotypische methode. Daarnaast zorgt het gebruik van de moleculaire methode ook voor een belangrijke reductie in de turn-around-time (~4,5 uur versus overnacht incubatie bij de CDT) voor ESBL confirmatie. In **hoofdstuk 3** ligt de focus op de distributie van ESBL genen in onze regio. In deze studie wordt gebruik gemaakt van de Check-ESBL assay, een micro-array welke niet alleen TEM, SHV en CTX-M genen kan identificeren, maar tegelijkertijd ook de CTX-M-groep kan specificeren. Met behulp van deze micro-array werd een overzicht verkregen van de ESBL genen die in de regio voorkomen. In de 247 geteste isolaten zijn in totaal 274 ESBL genen aangetoond, waarbij CTX-M1 het vaakst werd geïdentificeerd, gevolgd door CTX-M9, SHV, TEM en CTX-M2. Tevens zijn de in de studie

geïnccludeerde patiënten onderverdeeld in vier verschillende categorieën, zodat mogelijke verschillen in het voorkomen van ESBL genen konden worden aangetoond. Hieruit bleek dat de CTX-M9 ESBL significant meer werd gevonden in IC-patiënten, dan in alle andere patiënten. Daarnaast werd duidelijk dat SHV ESBL over het algemeen meer te vinden is bij patiënten welke opgenomen zijn in het ziekenhuis, dan bij patiënten welke niet in het ziekenhuis liggen. **Hoofdstuk 4** beschrijft de resultaten van een moleculaire screeningsmethode voor de detectie van MRSA, gedurende een periode van 2 jaar. De methode bestaat uit een overnacht verrijking in een bouillon, waarna real-time PCR assays worden uitgevoerd gericht op het mecA, mecC en het *S. aureus*-specifieke SA442-gen. Deze initiële stap wordt gevolgd door confirmatie met een andere real-time PCR assay, de GeneOhm MRSA assay, welke het Staphylococcal cassette chromosome mec element (SCCmec) gecombineerd met het orfX-gen detecteert. Bij een positief resultaat van beide assays vindt er uiteindelijk kweek plaats. De prestatie van de real-time PCR assays werd geëvalueerd met 104 verschillende MRSA stammen, met als resultaat een hoge sensitiviteit en specificiteit. Gedurende de 2-jaar durende studieperiode zijn in totaal 13.387 monsters gescreend op de aanwezigheid van MRSA. Op basis van alleen de real-time PCR assays, kon 95.2% van de monsters als negatief worden uitgeslagen binnen 24 uur na binnenkomst op het laboratorium. Uiteindelijk kon in 2.6% van alle monsters een MRSA gekweekt worden. Deze moleculaire screeningsmethode heeft bewezen een accurate methode te zijn, welke in staat is om binnen 24 uur na binnenkomst op het laboratorium betrouwbare resultaten te genereren. Deze snelle diagnostische methode draagt bij aan verbetering van infectie preventie programma's, zeker wanneer het een populatie betreft waar MRSA weinig voorkomt. In **hoofdstuk 5** wordt het gebruik van een vergelijkbare methode beschreven voor de detectie van CPE. Hierbij worden twee verschillende bouillons gebruikt, waarbij bij rectum uitstrijken na ophoping detectie van de meest voorkomende CPE genen (KPC, VIM, NDM, IMP, OXA-48) plaatsvindt, gebruikmakend van een commerciële ligatie-afhankelijke real-time PCR assay (Check-MDR Carba assay). Gedurende een periode van 14 maanden, zijn rectum uitstrijken van 454 verschillende patiënten gescreend met behulp van deze methode. In rectum uitstrijken afkomstig van zes patiënten (1.3%) kon een CPE worden gedetecteerd met behulp van de real-time PCR assay. Na afenting van deze bouillons werd in alle gevallen een CPE gekweekt, waarmee de resultaten van de real-time PCR assay werden geconfirmeerd. De zes patiënten waren allemaal opgenomen in ziekenhuizen in landen waarvan bekend is dat er een hoge prevalentie van CPE is. Vier patiënten bleken drager te zijn van een OXA-48 producerend micro-organisme en bij de overige twee patiënten kon een KPC worden geïdentificeerd. Aangezien een zo vroeg mogelijke detectie, met bijbehorende isolatie maatregelen, een uitzonderlijk belangrijk onderdeel is van een effectief infectie preventie beleid, zal deze methode mogelijk een enorme bijdrage kunnen leveren aan het voorkomen van verspreiding van CPE. **Hoofdstuk 6** van dit proefschrift beschrijft de evaluatie van een nieuwe real-time PCR assay (Check-Direct CPE assay), ontwikkeld voor de detectie van de carbapenemase genen KPC, VIM, NDM en OXA-48, direct in DNA geïsoleerd uit rectum uitstrijken. Evaluatie van deze assay met 83 verschillende

stammen liet een sensitiviteit en specificiteit van 100% zien. Om de betrouwbaarheid van de assay aan te tonen voor de detectie van CPE genen in DNA geïsoleerd uit klinisch materiaal, is gebruik gemaakt van rectum uitstrijken gespiked met verdunningsreeksen van 19 verschillende carbapenemase producers. Hiermee is de detectielimiet van de real-time PCR assay bepaald en vergeleken met de detectielimiet van een door de NVMM richtlijn aanbevolen CPE screenings medium (ChromID Carba). Behalve OXA-48 producerende isolaten met lage MICs voor carbapenem antibiotica, welke niet of nauwelijks werden gedetecteerd door de ChromID carba, was de detectielimiet van beide methoden vergelijkbaar. Detectie met de Check-Direct CPE assay genereert resultaten binnen 3 uur, dit in tegenstelling tot selectieve media waarbij minstens overnacht incubatie nodig is, gevolgd door een additionele confirmatie stap in geval van CPE verdachte kolonies. Als resultaat van deze studie kon worden geconcludeerd dat de real-time PCR assay een veelbelovende assay is, welke als screeningsmethode mogelijk een belangrijk onderdeel kan zijn van infectiepreventie programma's. In het laatste hoofdstuk van dit proefschrift, **hoofdstuk 7**, worden de resultaten van de vorige hoofdstukken bediscussieerd en wordt vooruitgeblikt op moleculaire detectie van antimicrobiële resistentie in de toekomst.