

## Risico op colistineresistentie neemt toe

### *Risk of colistin resistance on the rise*

<sup>1,6</sup>B. Callens, <sup>2</sup>F. Haesebrouck, <sup>3</sup>J. Dewulf, <sup>2</sup>F. Boyen, <sup>2,4</sup>P. Butaye, <sup>5</sup>B. Catry, <sup>6</sup>P. Wattiau, <sup>1</sup>E. De Graef

<sup>1</sup> Antimicrobial Consumption and Resistance in Animals, Eurostation II, Victor Hortaplein 40 bus 10, 1060 Brussels, Belgium

<sup>2</sup> Department of Pathology, Bacteriology and Avian Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, Ghent University, Salisburylaan 133, 9820 Merelbeke, Belgium

<sup>3</sup> Veterinary Epidemiology Unit, Department of Reproduction, Obstetrics and Herd Health, Faculty of Veterinary Medicine, Ghent University, Salisburylaan 133, 9820 Merelbeke, Belgium

<sup>4</sup> Ross University School of Veterinary Medicine, Department of Biosciences, PO 334, Basseterre, St. Kitts and Nevis, West Indies

<sup>5</sup> Scientific Institute of Public Health, Juliette Wytsmanstraat 14, 1050 Elsene, Belgium

<sup>6</sup> Veterinary and Agricultural Centre (CODA-CERVA), Groeselenberg 99, 1180 Ukkel, Belgium

benedicte.callens@amcra.be  
benedicte.callens@coda-cerva.be

## SAMENVATTING

In een recent artikel uit China werd overdraagbare resistentie tegen colistine beschreven die gevonden werd bij *Escherichia (E. coli)* bekomen uit voedselproducerende dieren, vlees en ziekenhuispatiënten (Liu et al., 2015). Heel recent werd deze resistentie onder meer ook gevonden in Denemarken, Frankrijk, het Verenigd Koninkrijk en België. Colistine wordt beschouwd als een van de laatste behandelopties tegen multiresistente bacteriën in de humane gezondheidszorg, voornamelijk bij patiënten met mucoviscidose. Alertheid voor colistineresistentie is geboden en het nieuwe resistentiemechanisme dient zorgvuldig te worden opgespoord bij dier- en mensgerelateerde bacteriën.

## ABSTRACT

In a recent article from China, a transferable resistance mechanism has been described in *Escherichia coli (E. coli)*, isolated from food-producing animals, meat and hospital patients (Liu et al., 2015). Recently, this resistance mechanism has also been found in Denmark, France, the United Kingdom and Belgium. Colistin is considered as one of the last resort treatments against multi-resistant bacteria in human medicine, especially for patients with cystic fibrosis. Alertness is needed and the new resistance mechanism has to be detected properly in animal and human related bacteria.

## COLISTINE ALS LAATSTE REDMIDDEL VOOR DE MENS

De incidentie van infecties bij mensen veroorzaakt door multiresistente carbapenemase producerende *Enterobacteriaceae*, zoals *E. coli* en *Klebsiella (K. pneumoniae)*, en door multiresistente stammen van *Pseudomonas (P. aeruginosa)* en *Acinetobacter* spp. neemt wereldwijd toe. Recente cijfers tonen aan dat dit ook in België het geval is (Catry et al., 2015). Colistine (= polymyxine E) werd, na een terughoudend gebruik te wijten aan neuro- en nefrotoxische bijwer-

kingen, de laatste jaren 'herontdekt' als een van de weinige redmiddelen in de bestrijding van deze infecties bij de mens.

Ook in de diergeneeskunde is colistine een belangrijk antibioticum. Het wordt frequent ingezet bij nutsdieren voor de behandeling van *E. coli*-infecties bij varkens en runderen. Bij varkens werd het gebruik van colistine in 2010 geschat op 30% van het totaal antibioticagebruik in de varkenssector, uitgedrukt in behandel dagen op 1000 (Callens et al., 2012). Neonatale diarree, speendiarree en slingerziekte, veroorzaakt door enterotoxigene (ETEC) en verotoxine



**Figuur 1.** Gebruik van colistine bij dieren in België tussen 2011 en 2014 uitgedrukt in tonnen.

producerende *E. coli* (VTEC) stammen, werden benoemd als de voornaamste redenen voor preventief en metafylactisch colistinegebruik bij jonge en gespeende biggen. Ook bij kalveren wordt colistine ingezet ter bestrijding van neonatale diarree veroorzaakt door ETEC.

### COLISTINERESISTENTIE

Ondanks het veelvuldig gebruik van colistine in de diergeneeskunde (BelVet-SAC, 2014) wordt het voorkomen van resistentie tegen colistine bij diergerelateerde *E. coli*- en *S. enterica*-stammen in België tot op heden relatief beperkt gerapporteerd (Figuur 1). De meest recente rapportering van colistineresistentie bij de indicatorbacterie *E. coli* toonde een voorkomen van 2,66%, 0,61%, 0% en 0,54% resistente stammen bij respectievelijk vleeskalveren, vleesvee, vleeskuijken en varkens, gebaseerd op een epidemiologische cut-offwaarde van 2 µg/ml (CODA-CERVA, 2014; Hanon et al., 2015). Een hogere mate van resistentie (9,6%) werd evenwel gevonden bij pathogene *E. coli* geïsoleerd bij zieke biggen (Boyen et al., 2010). Voor *S. enterica*-serotypes werd in 2012 een resistentiepercentage gerapporteerd van 20,7%, wat een stijging betekent ten opzichte van 2011 (5,5%) (CODA-CERVA, 2012). Stammen van rundvee vertoonden het meest resistentie (68,6%), gevolgd door stammen van kippen (17,5%) en van varkens (10,6%). Een verklaring voor deze hoge cijfers is waarschijnlijk dat natuurlijke resistentie voorkomt bij de serotypes Enteritidis en Dublin, die vaker werden geïsoleerd in 2012 dan in 2011. Voornamelijk bij rund- en pluimvee komen deze serotypes frequent voor. Er werd voorgesteld om voor deze *Salmonella*-serotypes de epidemiologische cut-offwaarden te verhogen, wat een betere inschatting mogelijk maakt van het reële voorkomen van verworven resistentie (Agersø et al., 2012). In 2014 werd voor de *S. enterica*-isolaten van kippen een resis-

tentiepercentage gezien van 9,6% (CODA-CERVA, 2014). In negen andere Europese landen werd resistentie tegen colistine bij *E. coli* en *S. enterica* gerapporteerd als < 1%, terwijl voor zieke dieren hogere resistentiepercentages gezien werden (3%) (Kempf et al., 2013).

Als verklaring voor de relatief lage prevalenties van verworven resistentie tegen colistine werd aangehaald dat deze uitsluitend te wijten was aan mutaties ter hoogte van het bacterieel chromosoom. Dit impliceert dat werd aangenomen dat horizontale overdracht van resistentiegenen via mobiele genetische elementen niet voorkwam. Bovendien werden vele van de mutatiemechanismen beschreven als in vitro niet stabiel (Moskowitz et al., 2012), wat het risico op een snelle spreiding van resistentie reduceerde (Landman et al., 2008).

### OVERDRAAGBARE COLISTINERESISTENTIE

Zeer recent werd evenwel voor het eerst resistentie tegenover colistine beschreven, die horizontaal overdraagbaar is van resistente naar niet-resistente bacteriën via conjugatie (Liu et al., 2015). De *E. coli*-stammen, waarin het zogenaamde *mcr-1* gen, verantwoordelijk voor klinische resistentie tegen colistine in een muismodel (MIC > 2 µg/ml), gevonden werd, werden geïsoleerd bij levende slachtvarkens in China. Ook uit vlees afkomstig van varkens en kippen werden *mcr-1* positieve *E. coli* geïsoleerd. Het gen werd ook gevonden bij *E. coli*- en *K. pneumoniae*-isolaten van ziekenhuispatiënten (Liu et al., 2015) (Tabel 1). De frequentie van het voorkomen bij dieren en op vlees nam bovendien toe tussen 2011 en 2014 (Liu et al., 2015) (Tabel 1). Plasmide-gemedieerde overdracht (pHNSHP4) van het *mcr-1* gen kon in vitro worden aangetoond voor *E. coli* en andere *Enterobacteriaceae*, zoals *K. pneumoniae*, alsook voor *P. aeruginosa*. Het frequenter voorkomen van MCR-1 gemedieerde

**Tabel 1. Prevalentie van *mcr-1* gemedieerde colistineresistentie (naar Liu et al., 2015).**

	Positieve isolaten (%)/aantal isolaten			
<i>Escherichia coli</i>	<b>2011</b>	<b>2012</b>	<b>2013</b>	<b>2014</b>
Varkens bij slacht		31 (14,4%)/216	68 (25,4%)/268	67 (20,9%)/320
Vlees (detail handel)				
<i>Kip</i>	<b>2011</b>		<b>2013</b>	<b>2014</b>
	10 (4,9%)/206		4 (25,0%)/16	21 (28,0%)/75
<i>Varken</i>	<b>2011</b>		<b>2013</b>	<b>2014</b>
	3 (6,3%)/48		11 (22,9%)/48	29 (22,3%)/130
Ziekenhuispatiënt				<b>2014</b>
				13 (1,4%)/902
<i>Klebsiella pneumoniae</i>				<b>2014</b>
Ziekenhuispatiënt				3 (0,7%)/420

colistineresistentie bij *E. coli* van bij voedselproducerende dieren dan bij mensen, doet de auteurs vermoeden dat dit type van resistentie eerst voorkwam bij dieren en zich daarna spreidde naar mensen (Liu et al., 2015). Ook de stabiliteit van het pHNSHP4-plasmide waarop het resistentiegen gelegen is, zowel in aan- en afwezigheid van een selectiedruk uitgeoefend door colistine, voorspelt het persisteren ervan in een bacteriële populatie.

Ondertussen werd het *mcr-1* gen ook reeds in Denemarken gevonden na de herscreening van 3000 *E. coli*-stammen (Hasman et al., 2015). Een van deze resistente stammen was afkomstig van een patiënt met septikemie en vijf stammen werden geïsoleerd uit geïmporteerd kippenvlees. Het ging telkens over een multiresistente “extended spectrum beta-lactamase” (ESBL) producerende *E. coli*-stamdrager van een identiek *mcr-1* gen. Het plasmide waarop het *mcr-1* gen zich bevond, was evenwel verschillend van het plasmide gevonden bij de stammen uit China. Dit toont aan dat het *mcr-1* gen kan spreiden op zich, alsook via een plasmide, wat het risico vergroot op een snelle spreiding van dit resistentiegen.

Ook in Frankrijk werd hetzelfde *mcr-1* gen ontdekt door de herscreening van diergerelateerde *S. enterica*-isolaten (Webb et al., 2015). In Nederland werd het *mcr-1* gen gevonden in ESBL-producerende *E. coli* geïsoleerd bij reizigers na thuiskomst in Nederland (Arcilla et al., 2015). Deze preliminaire data geven aan dat de horizontaal overdraagbare colistine-resistentie ook reeds in Europa circuleert en dat er bij gevolg vermoedelijk vaker detectie zal volgen in de komende maanden en jaren.

Isolaten die fenotypisch verworven resistentie vertonen tegen colistine, moeten nauwkeurig gescreend worden op het voorkomen van dit resistentiegen. In België werd het *mcr-1* gen gevonden in één *S.*

*enterica*-isolaat van kippenvlees (Katelijne Dierick, WIV, persoonlijke communicatie), alsook in dertien pathogene *E. coli*-stammen geïsoleerd bij biggen en kalveren met diarree (Malhorta-Kumar, et al. 2016). Het gebruik van colistine in de diergeneeskunde wordt, door de exclusiviteit van het antibioticum als een van de laatste opties tegen multiresistente bacteriën bij mensen al langer scherp in de gaten gehouden (Moore en Elborn, 2012). De rapportering van horizontaal overdraagbare resistentie tegen colistine zal het gebruik ervan in de diergeneeskunde, ondanks het hoog therapeutisch belang voor de behandeling van darmgerelateerde infecties door *Enterobacteriaceae* bij voedselproducerende dieren, ongetwijfeld verder onder druk zetten.

## GEBRUIK VAN COLISTINE IN BELGIË VERMINDERD

In 2014 werd voor het eerst sinds de eerste rapportering van antibioticagebruik bij dieren in België een heuse daling in het gebruik van colistine bij dieren waargenomen (BelVet-SAC, 2014) (Figuur 1). De daling van 28,1% tussen 2013 en 2014 is vermoedelijk gerelateerd aan het gebruik van zinkoxide (ZnO) als alternatief voor colistine in de preventie van speendiarree bij biggen. ZnO aan farmacologische dosering (2500 ppm) is, mede dankzij een positief advies van het kenniscentrum voor antibioticagebruik en -resistentie bij dieren in België (AMCRA) en met als doel het colistinegebruik te reduceren, sinds september 2013 toegelaten in België ter preventie van speendiarree in de eerste veertien dagen na het spenen van biggen. Echter, gegeven de zeer brede inzet van ZnO sinds de toelating ervan, is de waargenomen reductie van colistine in 2014 lager dan initieel verwacht werd

(BelVet-SAC, 2014). Dit houdt in dat een verdere daling van het colistinegebruik mogelijk moet zijn. Aan colistine werd door AMCRA kleurcode oranje toegekend. Dit impliceert dat er een additionele laboratoriumtest ter bevestiging van de diagnose dient uitgevoerd te worden. Het uitvoeren van een gepaste gevoeligheidstest vóór elk gebruik ervan is aangewezen om onnodig gebruik te voorkomen (Boyen et al., 2010). AMCRA kende deze kleurcodes toe op basis van de richtlijnen van de Wereldgezondheidsorganisatie (WHO) en de Werelddierengezondheidsorganisatie (OIE). Door de European Medicines Agency (EMA) werd colistine volgens de laatste verslaggevingen ingedeeld bij de antibiotica met een laag risico op overdracht van resistentiegenen en resistente bacteriën en dus met een laag risico voor de volksgezondheid (EMA, 2014). Gezien de meest recente bevindingen over de horizontale overdraagbaarheid van colistineresistentie, is het waarschijnlijk dat deze risico-inschatting zal moeten herzien worden door bovengenoemde instanties.

## PREVENTIE

Het gebruik van colistine zal verder onder de loep genomen moeten worden en zoveel als mogelijk moeten worden vermeden. Het belangrijkste medicamenteuze alternatief tegen spëndiarree bij biggen op heden is ZnO. Daar het gebruik ervan leidt tot coselectie van methicilline-resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA), wat zowel in experimentele studies als in veldproeven werd aangetoond (Cavaco et al., 2011; Moodley et al., 2011; Slifierz et al., 2015) en eventueel andere (multi)resistente bacteriën (Bednorz et al., 2013), dient het gebruik ervan als een tijdelijke maatregel beschouwd te worden. Andere preventieve maatregelen, zoals optimale voeding, voedingsadditieven, bioveiligheidsmaatregelen en vaccins, voor het gebruik bij biggen en pluimvee, dienen verder ontwikkeld en geïmplementeerd te worden ter preventie van neonatale diarree, slingerziekte en colibacillose bij biggen en pluimvee. Indien behandeling toch noodzakelijk blijkt te zijn, kunnen ook andere antibiotica dan colistine aangewend worden tegen *E. coli*- en *S. enterica*-gerelateerde infecties zoals beschreven in het formularium voor verantwoord gebruik van antibacteriële middelen bij varkens, rundvee en pluimvee (AMCRA, 2014).

## CONCLUSIE

Bij resistentie tegenover colistine werd er aanvankelijk enkel gesproken over een mutatiegededeeerde resistentie. Sinds kort is nu ook plasmidegededeeerde resistentie opgedoken. Het *mcr-1* gen verantwoordelijk voor colistineresistentie is al een tijdje onopgemerkt aanwezig, aangezien het gen in historische collecties aangetoond kon worden. Ondanks de rap-

portering van relatief lage prevalenties van colistine-resistentie bij *E. coli*- en *S. enterica*-stammen tijdens monitoringstudies, blijkt het verantwoordelijke resistentiegen al voor te komen in verschillende bacteriële species en op verschillende plasmiden.

Dit wijst op een potentieel explosieve situatie die de nodige opvolging vereist. Mogelijk is deze resistentie aanwezig in verschillende andere darmbacteriën. Onderzoek naar het voorkomen en de wijze van het zich spreiden van het resistentiegen dringt zich op. Ook dient nagegaan te worden of er klinische resistentie aanwezig is, en dus of infecties met *Enterobacteriaceae* of andere met colistine te behandelen bacteriën bij mens en dier nog behandelbaar zijn aan de voorgeschreven dosissen. Verder dient gezocht te worden naar valabele alternatieven voor de bestrijding van ziekten waartegen colistine gebruikt wordt.

## REFERENTIES

- Agersø Y., Torpdahl M., Zachariassen C., Seyfarth A., Hammerum A.M., Nielsen E.A. (2012). Tentative colistin epidemiological cut-off value for *Salmonella* spp. *Food-borne Pathogens and Disease* 9 (4), 367-369.
- AMCRA. (2014). *Formularium voor Verantwoord Gebruik van Antibacteriële Middelen bij Varkens, Rundvee en Pluimvee*. Eerste editie, versie 1.1.
- Arcilla M.S., van Hattem J.M., Matamoros S., Melles D.C., Penders J., de Jong M.D., Schultz C. (2015). *The Lancet Infectious Diseases*, [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(15\)00541-1](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(15)00541-1)
- Bednorz C., Oelgeschläger K., Kinnemann B., Hartmann S., Neumann K., Pieper R., Bethe A., Semmler T., Tedin K., Schierack P., Wieler L.H., Guenther S. (2013). The broader context of antibiotic resistance: zinc feed supplementation of piglets increases the proportion of multi-resistant *Escherichia coli* in vivo. *Internal Journal of Medical Microbiology* 303(6-7), 396-403.
- BelVet-SAC. Belgian Veterinary Surveillance of Antibacterial Consumption. (2015). National consumption report 2014. Available online: [http://www.belvetsac.ugent.be/pages/home/BelvetSAC\\_report\\_2014%20finaal.pdf](http://www.belvetsac.ugent.be/pages/home/BelvetSAC_report_2014%20finaal.pdf) (Accessed 26 August 2015)
- Boyen F., Vangroenweghe F., Butaye P., De Graef E., Castryck F., Heylen P., Vanrobaeys M., Haesebrouck F. (2010). Disk prediffusion is a reliable method for testing colistin susceptibility in porcine *E. coli* strains. *Veterinary Microbiology* 144, 359-362.
- Callens B.F., Persoons D., Maes D., Laanen M., Postma M., Boyen F., Haesebrouck F., Butaye P., Catry B., Dewulf J. (2012). Prophylactic and metaphylactic antimicrobial use in Belgian fattening pig herds. *Preventive Veterinary Medicine* 106, 53-62.
- Cavaco L.M., Hasman H., Aarestrup F.M. (2011). Zinc resistance of *Staphylococcus aureus* of animal origin is strongly associated with methicillin resistance. *Veterinary Microbiology* 150, 344-348.
- Catry B., Cavaleri B., Baptiste K., Grave K., Grein K., Holm A., Jukes H., Liebana E., Navas A.L., Mackay D., Magiorakos A.-P., Romo M.A.M., Moulin G., Madero C.M., Pomba M.C.M.F., Powell M., Pyörälä S., Rantalala M., Ruzauskas M., Sanders P., Tealen C., Threlfall E.J.,

- Törneke K., van Duijkeren E., Edo J.T. (2015). Use of colistin-containing products within the European Union and European Economic Area (EU/EEA): development of resistance in animals and possible impact on human and animal health. *International Journal of Antimicrobial Agents* 46, 297-306.
- CODA-CERVA. (2014). *Report on Susceptibility of Salmonella Serotypes in Belgium*.
- CODA-CERVA. (2014). *Antimicrobial Resistance in Indicator Commensal Bacteria from Livestock in Belgium: Trend Analysis 2011-2013*.
- Hanon JB., Jaspers S., Butaye P., Wattiau P., Méroc E., Aerts M., Imberechts H., Vermeersch K., Van der Stede Y. (2015). A trend analysis of antimicrobial resistance in commensal *Escherichia coli* from several livestock species in Belgium (2011–2014). *Preventive Veterinary Medicine* 122 (4), 443-452.
- Hasman H., Hammerum A.M., Hansen F., Hendriksen R.S., Olesen B., Agersø Y., Zankari E., Leekitcharoenphon P., Stegger M., Kaas R.S., Cavaco L.M., Hansen D.S., Aarestrup F.M., Skov R.L. (2015). Detection of *mcr-1* encoding plasmid-mediated colistin-resistant *Escherichia coli* isolates from human bloodstream infection and imported chicken meat, Denmark 2015. *Euro Surveill.* 2015;20(49):pii=30085. DOI: <http://dx.doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2015.20.49.30085>
- Kempf I., Fleury M.A., Drider D., Bruneau M., Sanders P., Chauvin C., Madec J., Jouy E. (2013). What do we know about resistance to colistin in *Enterobacteriaceae* in avian and pig production in Europe? *International Journal of Antimicrobial Agents* 42, 379-383.
- Landman D., Georgescu C., Martin D.A., Quale J. (2008). Polymyxins revisited. *Clinical Microbiology Reviews* 21, 449-465.
- Li J., Nation R.L., Turnidge J.D., Milne R.W., Coulthard K., Rayner C.R., Paterson D.L. (2006). Colistin: the re-emerging antibiotic for multidrug-resistant Gram-negative bacterial infections. *The Lancet Infectious Diseases* 6, 589-601.
- Liu Y.-Y., Wang Y., Walsh T. R., Yi L.-X., Zhang R., Spencer J., Doi Y., Tian G., Dong B., Huang X., Yu L.-F., Gu D., Ren H., Chen X., Lv L., He D., Zhou H., Liang Z., Liu J.-H., Shen J. (2015). Emergence of plasmid-mediated colistin resistance, mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *The Lancet Infectious Diseases*, [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(15\)00424-7](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(15)00424-7)
- Moodley A, Nielsen S.S., Guardabassi L. (2011). Effects of tetracycline and zinc on selection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) sequence type 398 in pigs. *Veterinary Microbiology* 152, 420-423.
- Moore J.E., Elborn J.S. (2012). Implications for colistin use in patients with cystic fibrosis (CF). Letter in response to “Prophylactic and metaphylactic antimicrobial use in Belgian fattening pig herds.” Callens et al., September 2012. *Preventive Veterinary Medicine* 106, 53-62.
- Moskowitz S.M., Brannon M.K., Dasgupta N., Pier M., Sgambati N., Miller A.K., Selgrade S.E., Miller S.I., Denton M., Conway S.P., Johansen H.K., Hoiby N. (2012). PmrB mutations promote polymyxin resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from colistin-treated cystic fibrosis patients. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 56, 1019-1030.
- Slifierz M.J., Friendship R., Weese J.S. (2015). Zinc oxide therapy increases prevalence and persistence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in pigs: a randomized controlled trial. *Zoonoses and Public Health* 62, 301-308.
- Webb H.E., Marault M., den Bakker H., Bugarel M., Scott H.M., Granier S.A., Millemann Y., Nightingale K., Ison S., Loneragan G.H. (2015). Dissemination of the *mcr-1* colistin resistance gene. *The Lancet Infectious Diseases*. December, [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(15\)00538-1](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(15)00538-1)