

De evolutie van antibioticum resistentie

S.E. Schoustra

Op 17 november 2004 promoveerde Sijmen Schoustra aan Wageningen Universiteit op het proefschrift getiteld '*Reducing fitness costs associated with antibiotic resistance. Experimental evolution in the filamentous fungus Aspergillus nidulans*'. Promotor was Prof. dr. R.F. Hoekstra en co-promotor was dr.ir. A.J.M. Debets, leerstoelgroep Genetica, Wageningen Universiteit.

Samenvatting

De laatste tientallen jaren hebben vele micro-organismen (bacteriën en schimmels) een resistentie ontwikkeld tegen antibiotica. Dit heeft tot gevolg dat antibiotica (een gedeelte van) hun genezende werking tegen microbiële ziekteverwekkers hebben verloren. Micro-organismen kunnen door één enkele mutatie in het DNA resistentie ontwikkelen tegen een antibioticum. In veel gevallen zijn er fitnesskosten verbonden aan resistentie: in de afwezigheid van antibioticum heeft een resistente stam een verminderde groei in vergelijking met niet-resistente stammen. Resistente stammen kunnen deze kosten echter compenseren met aanvullende mutaties in het DNA die de nadelige effecten van resistentie opheffen zonder de resistentie aan te tasten. Deze mutaties noemt men compenserende mutaties en het proces noemt men compenserende evolutie. Na compenserende evolutie is de resistentie blijvend geworden omdat resistente stammen zich kunnen handhaven naast sensitieve stammen, ook zonder antibioticum in de omgeving. Dit vermindert de effectiviteit van antibiotica. Het proefschrift beschrijft onderzoek naar de ontwikkeling van antibioticumresistentie en daaropvolgende compenserende evolutie. Met behulp van de modelschimmel *Aspergillus nidu-*

lans en het fungicide fludioxonil is dit proces experimenteel onderzocht onder verschillende omstandigheden. De resultaten laten zien dat resistentie zich gemakkelijk ontwikkelt en dat binnen korte tijd en onder alle onderzochte omstandigheden compenserende mutaties optreden. De belangrijkste conclusie is dan ook dat aangezien het proces van compenserende evolutie zo gemakkelijk optreedt na het gebruik van antibiotica, een blijvende resistentie moeilijk te voorkomen is.

Inleiding

Met de ontdekking van penicilline in 1928 door Alexander Flemming begon het tijdperk van de antibiotica. In de jaren '40 van de vorige eeuw werden antibiotica voor het eerst toegepast bij medische behandelingen. Sindsdien is gebleken dat antibiotica erg effectief zijn bij het bestrijden van microbiële infecties, niet alleen bij mensen maar ook bij landbouwgewassen. Dit heeft geleid tot een grootschalig gebruik. De laatste (tientallen) jaren is duidelijk geworden dat het grootschalige gebruik van antibiotica resistenties met een blijvend karakter tot gevolg heeft. Een humane ziekteverwekker als *Staphylococcus aureus* is bijvoorbeeld ongevoelig geworden voor vele antibiotica en daar-

mee tegenwoordig lastig te behandelen.

In de landbouw worden de meeste microbiële infecties op gewassen veroorzaakt door schimmels. In de jaren '50 zijn de eerste fungiciden (antibiotica tegen schimmels) ontwikkeld. In eerste instantie werd vooral gebruik gemaakt van fungiciden met een breed werkingsspectrum zoals zwavel- en koperverbindingen en resistentie kwam toen nog weinig voor. Vanaf de jaren '60 zijn er fungiciden ontwikkeld met een complexere chemische structuur die een specifieke werking hebben tegen één bepaalde schimmelsoort (phenylamiden, aminopyrimidinen; . In de eerste jaren na hun introductie zorgden de nieuwe fungiciden voor een grote vooruitgang in gewasbescherming. In de jaren '70 begonnen echter de eerste resistentie schimmels de kop op te steken. In de jaren '90 had 50% van de *Phytophthora infestans* stammen (veroorzakers van de aardappelziekte) een fungiciden-resistentie, met als gevolg dat schimmelinfecties lastiger te bestrijden werden. Hoewel *Phytophthora infestans* geen schimmel is maar een oömyceet, is wel eenzelfde problematiek van toepassing. In Nederland worden fungiciden voornamelijk gebruikt bij de teelt van snijbloemen en aardappelen. De overheid werkt samen met organisaties als de Land- en Tuinbouw Organisatie (LTO) aan de beheersing van fungicidenresistentie met het beleid om het gebruik van fungiciden te verminderen. In 1990 is hiertoe het Meerjarenplan Gewasbescherming opgesteld met als doel het fungicidengebruik met 35% te reduceren. De evaluatie van dit plan

PROMOTIES

in 2001 liet zien dat het gebruik van fungiciden in Nederland in de periode 1990-2000 niet was gedaald, maar vrijwel gelijk was gebleven op 4.000.000 kilogram actieve stof per jaar.

Het proefschrift beschrijft experimenteel onderzoek naar de ontwikkeling van resistentie en de daarop volgende compenserende evolutie die fitnesskosten verbonden aan resistentie vermindert. Hierbij is gebruik gemaakt van de modelschimmel *Aspergillus nidulans* en het fungicide fludioxonil. De gebruikte schimmel is een modelschimmel omdat de genetische architectuur geheel bekend is en er daardoor vele technieken beschikbaar zijn om vragen over genetische veranderingen te beantwoorden. Fludioxonil wordt onder andere gebruikt om schimmelinfecties op wijnranken te bestrijden.

Resistentie-ontwikkeling als evolutionair proces

Schimmels en andere micro-organismen zoals bacteriën kunnen met één enkele mutatie in het DNA een resistentie ontwikkelen en zich zo aanpassen aan een milieu met antibiotica. Mutaties in het DNA komen in alle organismen voor met een zeer lage frequentie van ongeveer één per miljoen celdelingen. Als een organisme al optimaal is aangepast aan zijn omgeving, hebben mutaties meestal een nadelig effect op de uitgroei en overleving van het individu dat de mutatie oploopt. Suboptimale groeiomstandigheden zoals de aanwezigheid van een antibioticum, vergroten de kans dat een mutatie een gunstig effect heeft. Het feit dat micro-organismen vaak in populaties van grote aantallen voorkomen, vergroot de kans op het optreden van een dergelijke mutatie in minstens één individu van die

populatie. Dit resistente individu zal sneller groeien en meer nakomelingen produceren dan niet-resistente individuen en zo de overhand kunnen krijgen.

In de meeste, zo niet alle gevallen heeft een resistentie ook bijeffecten. Uit verschillende onderzoeken is gebleken dat een (micro-) organisme zich met een enkele mutatie niet aan alle omstandigheden tegelijk kan aanpassen. De aanpassing die groei mogelijk maakt in een milieu met antibiotica verlaagt tegelijkertijd diezelfde groei in een milieu zonder antibiotica. Men spreekt in dit verband van fitnesskosten verbonden aan antibioticumresistentie, waarbij fitness de groei en overleving in brede zin aanduidt. Vanwege deze fitnesskosten zou het goed mogelijk zijn dat resistentie vanzelf weer verdwijnt als het antibioticum niet meer wordt gebruikt; resistente stammen verliezen de concurrentie met niet-resistente stammen en worden op die manier geëlimineerd.

Micro-organismen blijken echter in staat te zijn de fitnesskosten verbonden aan antibioticumresistentie te compenseren door de ontwikkeling van aanvullende mutaties in het DNA, compenserende mutaties genaamd. Dit proces heet compenserende evolutie en kan tot gevolg hebben dat een resistente stam goed groeit (een hoge fitness heeft) in zowel de aanwezigheid als afwezigheid van het antibioticum in het milieu. Als dit eenmaal het geval is, is de kans groot dat een resistentie blijvend is geworden. Resistente stammen zullen niet worden 'weggeconcurrerd' door niet-resistente stammen, ook niet tijdens de afwezigheid van het antibioticum in het milieu. De ontwikkeling van resistentie met de daaropvolgende ontwikkeling van compenserende mutaties is een evolutionair proces aangezien de meest succesvolle individuen binnen een populatie in frequentie toenemen door selectie.

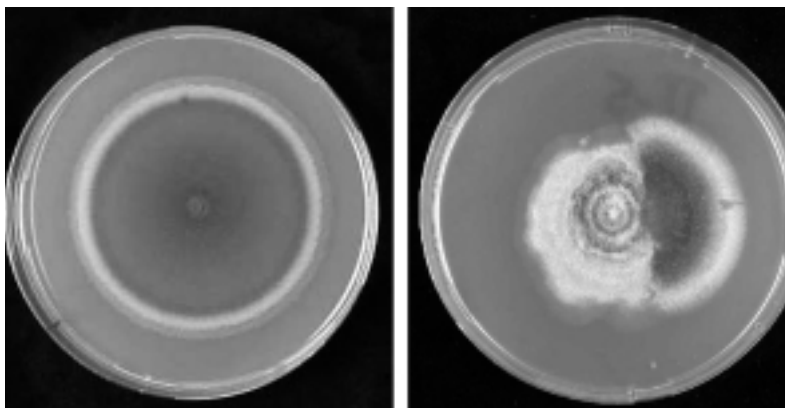
Evolutie bestuderen in een experiment met *Aspergillus nidulans*

Met behulp van micro-organismen kunnen evolutionaire processen experimenteel worden bestudeerd. Omdat micro-organismen een zeer korte generatietijd hebben (meestal maar een paar uur of minder), kan na het optreden van een mutatie het effect op de volgende generatie snel worden vastgesteld. Ter vergelijking: een generatie bij mensen duurt in Nederland tegenwoordig ongeveer 30 jaar. Van micro-organismen kunnen gemakkelijk grote populaties van miljoenen individuen worden gekweekt. Ondanks de lage mutatiefrequentie is er dan toch een reële kans dat er inderdaad een mutatie optreedt in één of meer individuen gedurende enkele weken.

De schimmel *Aspergillus nidulans* groeit aan het oppervlak van een groeimedium en vormt een netwerk van schimmeldraden (mycelium). Onder normale omstandigheden groeit de schimmel netjes radiaal uit vanuit het punt van aanenten (Figuur 1). Onder suboptimale omstandigheden (zoals groeimedium met het fungicide toegevoegd) is er een reële kans, dat er tijdens het uitgroeien een mutatie optreedt met een groeiverhogend effect. Vanaf het punt waar de mutatie optreedt, zal het mycelium sneller gaan groeien en een sector met verhoogde groei vormen (Figuur 1).

We hebben, door de schimmel te laten groeien op een medium met fungicide, verschillende resistente mutanten kunnen selecteren die goed groeien op het medium met fungicide. Genetische analyse heeft aangetoond dat er één enkele mutatie aan deze resistentie ten grondslag ligt. De resistente stammen hebben fitnesskosten op me-

PROMOTIES



Normale groei

Suboptimale groei

Figuur 1. Optimale (links) en suboptimale groei (rechts) na zes dagen van de schimmel Aspergillus nidulans op een voedingsbodem. Onder suboptimale omstandigheden kan er een mutatie optreden met een gunstig effect op de uitgroei. Na een dergelijke mutatie wordt een sector gevormd die sneller uitgroeit dan de rest van het mycelium.

dium zonder fungicide, hier groeien ze gemiddeld half zo snel uit als niet-resistente stammen. Dit betekent dat voor resistente stammen medium *zonder* fungicide een suboptimale groeiomstandigheid is geworden.

We hebben vervolgens één resistente stam geselecteerd voor een experiment om compenserende evolutie te bestuderen. Tijdens dit experiment werd deze stam geënt op vast medium. Na uitgroei van zes dagen werd het verst uitgegroeide mycelium geselecteerd. Hiervan werd een klein gedeelte overgebracht naar vers medium (Figuur 2). Deze cyclus werd meerdere malen herhaald. Door bij elke keer overenten de uitgroei op te meten, kon het proces van evolutie worden gevolgd in de tijd. Van de resistente stam werden meerdere replica's gebruikt (in totaal 40) die onafhankelijk van elkaar dezelfde behandeling van overenten kregen. De groeiomstandigheden waren niet voor alle replica's gelijk; de replica's zijn verdeeld over drie verschillende groeiomstandigheden om de gevolgen van verschillende manieren van fungicidegebruik te onderzoeken. De verschillende omstandigheden waren: (1) medium zonder fungicide, (2) medium met eerst veel fun-

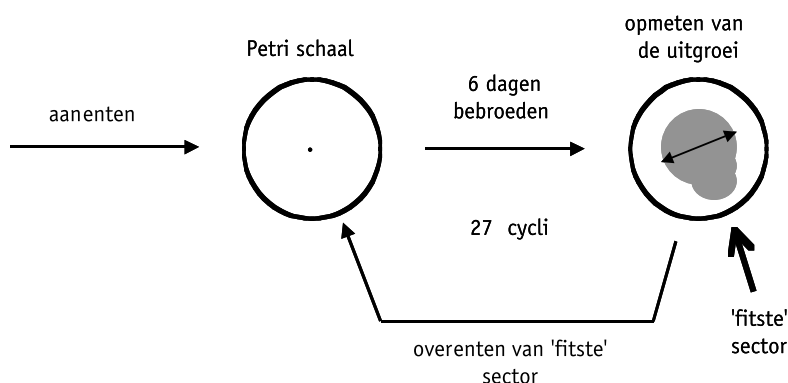
gicide dat bij elke keer overzetten iets afnam om na twaalf keer overzetten op nul te komen en (3) medium waar elke eerste drie keer geen fungicide in zat maar elke vierde keer wel.

De resultaten laten zien dat onder alle gekozen groeiomstandigheden de replica's gemiddeld genomen na 27 keer overenten sneller groeien dan aan het begin van het experiment. De snellere groei is veroorzaakt door compenserende mutaties die bij de verschillende replica's op verschillende momenten in de loop van de 27 cycli zijn ontstaan. Er zijn verschillen in

groeisnelheid ontstaan tussen de replica's onderling tijdens de 27 keer overenten. Niet alle replica's hebben hun uitgroei kunnen verbeteren, er zijn echter ook zeven replica's die hun groei zo veel verbeterd hebben dat ze nu op medium *zonder* fungicide zelfs beter groeien dan de niet-resistente stammen. De resultaten laten tevens zien dat er geen invloed is van de verschillende omstandigheden die gekozen waren. De wisselende aan- en afwezigheid van fungicide blijkt geen vertragend of versnellend effect te hebben op het proces van compenserende evolutie. Genetische analyse heeft laten zien dat 1, 2 of 3 mutaties met duidelijk waarneembaar effect verantwoordelijk zijn voor het proces van compenserende evolutie.

Gevolgen voor de praktijk van fungicidegebruik en resistentiebeheersing

Dit onderzoek heeft laten zien dat er twee stappen zijn in het ontstaan van een blijvende fungicidenresistentie. De eerste stap is het optreden van de resistentie-



Figuur 2. Opzet van het experiment van compenserende evolutie. De resistente stam werd aangeënt in het midden van een Petri schaal. Na zes dagen bebroeden (zie ook Figuur 1) werd het verst uitgegroeide stukje van het mycelium geselecteerd en overgebracht naar vers medium. Dit experiment werd uitgevoerd met 40 replica's, verdeeld over drie verschillende groeiomstandigheden.

mutatie. De tweede stap is het proces van compenserende evolutie dat ervoor zorgt dat ook in afwezigheid van fungicide, resistente stammen zich kunnen handhaven naast niet-resistente. Dit vermindert de effectiviteit van fungiciden als middel om schimmelinfecties te bestrijden. Beheersing van fungicidenresistentie en de bijbehorende problematiek richt zich in de praktijk onder andere op het voorkomen of vertragen van tenminste één van beide stappen. Dit onderzoek laat echter zien dat deze aanpak weinig kansrijk zal zijn. Voor resistentie is slechts één enkele mutatie nodig. Aangezien schimmels vaak in grote aantallen voorkomen, is het waarschijnlijk dat minstens in één individu een resistentiemutatie zal optreden. Voor een blijvende resistentie is compenserende evolutie nodig. Dit onderzoek heeft laten zien dat voor dit proces slechts een beperkt aantal mutaties nodig is en dat er geen vertragend effect is van verschillende groeiomstandigheden die de toepassing van verschillende spuitregimes hebben nage-

bootst. Ook het ontstaan van deze mutaties is moeilijk te verhinderen, ook met de toepassing van verschillende spuitregimes. Dit leidt ertoe dat het essentieel is om methoden van gewasbescherming te bevorderen die niet of minder gebruik maken van fungiciden. Gedacht kan worden aan het gebruik van gewassen die minder gevoelig zijn voor infecties door schimmels en aan diverse vormen van gewasdiversificatie zodat een schimmelinfectie minder snel om zich heen zal grijpen. Ook moet er bij het ontwikkelen van nieuwe gewassen aandacht worden besteed aan de natuurlijke afweer die planten hebben tegen infecties.

Dankbetuiging

Saskia P.W. Ivens heeft meegewerkt aan dit artikel.

Literatuurverwijzingen

Cabras, P., A. Angioni, V. L. Garau, M. Melis, F. M. Pirisi, E. V. Minelli, F. Cabitza, and M. Cubeddu. 1997. Fate of some new fungi-

- cides (cyprodinil, fludioxonil, pyrimethanil and tebuconazole) from vine to wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45:2708-2710.
- Clutterbuck, A. J. 1974. *Aspergillus nidulans*. Pp. 447-510 in P. C. King, ed. *Handbook of Genetics*. Plenum Press, New York.
- Ekkes, J. J., P. A. M. Besseling, and G. H. Horreman. 2001. Evaluatie Meerjarenplan Gewasbescherming, eindevaluatie van de taakstellingen over de periode 1990-2000. Expertisecentrum LNV, Ede.
- Elena, S., and R. Lenski. 2003. Evolution experiments with micro-organisms: dynamics and genetic basis of adaptation. *Nature Reviews Genetics* 4:457-469.
- Kacica, M., and L. C. McDonald. 2004. Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*. *MMWR* 53:322-323.
- Lenski, R. E. 1997. The cost of antibiotic resistance - from the perspective of a bacterium. Pp. 131-151 in D. J. Chadwick and J. Goode, eds. *Antibiotic resistance: Origins, Evolution and Spread*. Ciba Foundation, Wiley, Chichester.
- Levin, B. R., V. Perrot, and N. Walker. 2000. Compensatory Mutations, Antibiotic Resistance and the Population Genetics of Adaptive Evolution in Bacteria. *Genetics* 154:985-997.
- Russell, P. 1999. Fungicide resistance management: into the next millennium. *Pesticide Outlook*:213-215.
- Swart, K., and A. J. M. Debets. 2004. Genetics of *Aspergillus*. Pp. 21-37 in U. Kueck, ed. *The Mycota II, Genetics and Biotechnology*. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg.
- Wright, S. 1982. Character change, speciation, and the higher taxa. *Evolution* 36:427-443.