



Rapport ESBL-Attributieanalyse (ESBLAT)

Op zoek naar de bronnen van antibioticaresistentie bij de mens

Projectnummer Topsector TKI-AF 12067

ESBLAT Partners



Universiteit Utrecht



Rijksinstituut voor Volksgezondheid
en Milieu
Ministerie van Volksgezondheid,
Welzijn en Sport



WAGENINGEN
UNIVERSITY & RESEARCH



VanDrie Group
CONTROLLED QUALITY VEAL

One Health for Food (1H4F) Partners



nederlandse zuivel organisatie



LTO Nederland



WAGENINGEN
UNIVERSITY & RESEARCH



Universiteit Utrecht



Ministerie van Landbouw,
Natuur en Voedselkwaliteit



Ministerie van Volksgezondheid,
Welzijn en Sport



ESBL-Attributieanalyse

Op zoek naar de bronnen van antibioticaresistentie bij de mens

ESBLAT

Projectnummer topsector TKI-AF 12067

Februari 2018

Colofon

ESBLAT is een publiek-privaat samenwerkingsproject (PPS) binnen het Topsectoren programma 1Health4Food met een looptijd van april 2013 tot en met december 2017. Dit rapport kan als PDF worden gedownload via de volgende link: <http://www.1health4food.nl/esblat>

Partners in ESBLAT waren de kenniscentra:

Wageningen Bioveterinary Research, Lelystad (WBVR)

Institute for Risk Assessment Sciences, Faculteit Diergeneeskunde, UU Utrecht (IRAS)

Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu, Bilthoven (RIVM)

Departement Infectieziekten en Immunologie Faculteit Diergeneeskunde, UU Utrecht (I&I)

Universitair Medisch Centrum, Utrecht (UMCU)

Gezondheidsdienst voor Dieren, Deventer (GD)

De Stichting TKI Agri&Food (TKI)

Industriële partners waren:

VionFood Group, Eindhoven

Van Drie Group, Mijdrecht

Het project is gecoördineerd door:

Prof. Dr. D.J. Mevius (WBVR) en

Prof. Dr. A. Havelaar (tot 2014), daarna Prof. Dr. D. Heederik (beide IRAS)

Betrokken onderzoekers waren:

WBVR: Kees Veldman, Alieda van Essen, Arie Kant, Apostolos Liakopoulos, Yvon Geurts, Dik Mevius

RIVM: Engeline van Duijkeren, Wilfrid van Pelt, Lapo Mughini Gras, Heike Schmitt, Cindy Dierikx, Angela van Hoek, Eric Evers, Annemaria de Roda Husman, Hetty Blaak, Jaap van Dissel

IRAS: Joost Smid, Wietske Dohmen, Alejandro Dorado-Garcia, Heike Schmitt, Arie Havelaar, Dick Heederik

I&I: Joost Hordijk, Jaap Wagenaar

UMCU: Ad Fluit, Gerrita van den Bunt, Marc Bonten

GD: Annet Velthuis, Annet Heuvelink, Rianne Buter, Maaïke Gonggrijp, Inge Santman-Berends, Theo Lam

VionFood Group: Bert Urlings, Lourens Heres, Martijn Bouwknecht

Van Drie Group: Jacques de Groot, Meindert Nieland

Betrokkenen bij expertsessies:

Rundvee: Theo Lam, Henry Voogd, Jacques de Groot, Peter Mölder

Varkens: Peter van de Wolf, Lourens Heres

Pluimvee: Alex Spieker, Teun Fabri

Editors van het rapport waren:

Dik Mevius, Dick Heederik en Engeline van Duijkeren

Financiering:

Dit project ontving financiële steun van de Topsector Agri & Food. Binnen de Topsector werken bedrijfsleven, kennisinstellingen en de overheid samen aan innovaties voor veilig en gezond voedsel voor 9 miljard mensen in een veerkrachtige wereld. De publieke fondsen waren van de Ministeries van Landbouw, Natuur en Voedselkwaliteit (projectnr: 1600352-01, BO-22.04-008-001) en het Ministerie van Volksgezondheid, Welzijn en Sport.

De private fondsen werden gegenereerd door:

Productschappen voor Vee en Vlees, Pluimvee en Eieren en Zuivel (2013); Fonds Pluimveebelangen; ZuivelNL;

Vion Food Group; Van Drie Group.

Inhoudsopgave

1	Leeswijzer	4
2	Samenvatting	5
3	Inleiding	8
3.1	Doelstelling	9
4	ESBLs in Nederlandse reservoirs	11
4.1	Vergelijking van ESBLs in 22 reservoirs	13
4.2	Blootstelling van mensen aan ESBLs	16
4.2.1	Via consumptie van vlees	16
4.2.2	Via oppervlaktewater	17
4.3	Epidemiologie van ESBLs en Attributieanalyse	18
4.4	Discussie	22
4.5	Conclusies	23
5	Appendix	25
5.1	Gebuurde microbiologische methodes	25
5.2	ESBLs in mensen in Nederland	27
5.2.1	Gezin & Gezondheid studie	27
5.2.2	ESBLAT populatiestudie	28
5.2.3	Omwonenden van veehouderijbedrijven	32
5.3	ESBLs in landbouwhuisdieren en vlees (gegevens uit MARAN-2017).	34
5.3.1	Percentage ESBLs als deel van willekeurig gekweekte E. coli	34
5.3.2	Prevalentie van ESBLs in dieren	35
5.3.3	Prevalentie van ESBLs in vlees	36
5.4	ESBLs in Nederlandse melkveebedrijven	38
5.4.1	Doorsnede studie in Nederlandse melkveebedrijven	38
5.4.2	Longitudinale studie naar ESBLs in Nederlandse melkveebedrijven	39
5.5	ESBLs in Pluimvee	41
5.6	ESBLs in vleeskalverbedrijven	43
5.7	ESBLs in varkensbedrijven	45
5.8	ESBLs bij gezelschapsdieren	46
5.9	ESBLs bij paarden	47
5.10	ESBLs in het milieu	48
5.11	ESBLs in de voedselketen	50
5.11.1	Vleesvarkens	50
5.11.2	Vleeskalveren	51
5.11.3	Vleeskuikens	52
5.11.4	ESBLs in rauw vlees	53
5.12	Introductie en verspreiding van ESBLs in veehouderijketens	55
5.12.1	Rundvee	55
5.12.2	Vleeskalveren	56
5.12.3	Varkens	58
5.12.4	Pluimvee	61
5.13	Supplement	63
5.14	ESBLAT geaffilieerde publicaties en promovendi	73

1 Leeswijzer

Het rapport bevat na een inleiding over ESBLs en een beschrijving van de doelstellingen, een beschrijving van de epidemiologie van ESBLs in Nederland afkomstig van 22 verschillende studies van verschillende (potentiële) reservoirs. Deze studies zijn uitgevoerd in het kader van de ESBLAT-studie of eerder uitgevoerd maar in het kader van de ESBLAT-studie geanalyseerd. Dan volgen de resultaten op basis van (1) een vergelijkende analyse van het voorkomen van ESBLs in verschillende reservoirs, en (2) schatting van de blootstelling van de mens via vlees en oppervlaktewater en (3) een similariteit- en attributie-analyse van de bijdrage van verschillende bronnen aan besmetting van de mens.

In de appendix volgen uitgebreide beschrijvingen van de gebruikte protocollen voor monsternamen en de gebruikte laboratoriummethodes om een attributie-analyse te kunnen uitvoeren en wordt de structuur van de vier grootste veehouderijsectoren beschreven (rundvee-, vleeskalver-, varkens- en pluimvee-sector) op basis van bijeenkomsten met experts.

Vervolgens komen paragrafen met de gegevens over ESBLs in mensen, dieren, dierlijke producten en het milieu aan de orde die de basis vormen voor de similariteit- en attributieanalyses van de verzamelde gegevens. Het rapport wordt afgesloten met een lijst van alle publicaties die als onderdeel van dit project zijn geproduceerd.

2 Samenvatting

Sinds de eeuwwisseling komen ESBLs in toenemende mate bij mens en dier voor. Dit komt grotendeels door overmatig gebruik van antibiotica, maar ook toegenomen mobiliteit en besmetting via het milieu dragen hieraan bij. Dat is verontrustend. ESBLs kunnen voor de mens en dier belangrijke antibiotica zoals penicillines en cefalosporines afbreken waardoor ze hun werking verliezen.

ESBLs, dat staat voor Extended-Spectrum Bèta-Lactamasen, zijn enzymen die door bacteriën worden geproduceerd. Hoewel de term ESBL strikt genomen staat voor de enzymen, wordt deze term vaak ook gebruikt om de bacteriën zelf aan te duiden. De bacteriën die ESBLs kunnen produceren zijn meestal gewone darmbacteriën, zoals *Escherichia coli*. Deze bacteriën zijn onschadelijk zolang ze zich in de darm bevinden van gezonde personen of dieren (dragers), maar kunnen ook infecties veroorzaken. Infecties met ESBL-producerende bacteriën zijn moeilijker te behandelen omdat antibiotica uit de bèta-lactamgroep geen effect meer hebben.

Breed onderzoek onder mens, dier en in het milieu

Om in de toekomst adequate maatregelen te kunnen treffen, is door het consortium ESBLAT, onderzoek gedaan naar de bijdrage van dieren, vlees en het milieu aan het ESBL-dragerschap bij de mens.

Daarnaast is gekeken in hoeverre verschillende overdrachtsroutes (transmissie), zoals vleesconsumptie en zwemmen in oppervlaktewater, bijdragen aan de blootstelling van de algemene bevolking. Hiervoor is informatie verzameld over de aanwezigheid van ESBLs bij verschillende landbouwhuisdieren zoals koeien, kippen en varkens, en ook huisdieren en wilde vogels. ESBL-dragerschap is onderzocht bij mensen in de algemene bevolking en bij veehouders. Bij patiënten in ziekenhuizen en huisartsenpraktijken is onderzocht welk aandeel ESBLs hadden bij infecties.

De genetische informatie van de verschillende soorten ESBLs, de mate waarin die voorkomen en de aantallen ESBL-producerende bacteriën per reservoir zijn verzameld uit 35 Nederlandse studies met meer dan 27.000 observaties in de periode tussen 2005-2015. Deze studies waren al eerder uitgevoerd of zijn in het kader van het ESBLAT-onderzoeksproject geïnitieerd.

ESBLs komen overal voor

In alle onderzochte reservoirs, van zowel mens, dier als milieu, kwamen ESBLs voor. De hoogste percentages ESBLs werden gevonden bij pluimvee, op vlees van pluimvee en in oppervlaktewater (50 tot 100%). Bij de algemene bevolking en bij urineweg-, en invasieve infecties waarbij een *E. coli* geïsoleerd wordt, lag dit rond de 5%. Een hogere kans op dragerschap werd gevonden bij mensen die door hun beroep meer kans hebben op blootstelling aan dierlijke reservoirs, zoals veehouders en slachthuismedewerkers.

Ook alle ESBL-soorten zijn overal

Door de genetische overeenkomst van ESBL-soorten tussen reservoirs in kaart te brengen (*similariteitsanalyse*) ontstaat een beeld van de mogelijke transmissieroutes tussen deze reservoirs. Hoe groter de genetische overeenkomst, hoe aannemelijker dat er daadwerkelijk overdracht heeft plaatsgevonden. In alle onderzochte reservoirs en transmissieroutes werd een grote diversiteit aan soorten ESBLs gevonden. Een opvallende bevinding is dat alle ESBL-soorten ook in alle reservoirs voorkomen, zij het in verschillende mate.

Uitwisseling tussen mensen onderling levert grootste bijdrage

ESBL-soorten uit de algemene bevolking en patiënten vertonen onderling grote genetische overeenkomsten, terwijl soorten uit de veehouderij (vee, vlees) beduidend minder overeenkomen met die van de mens. De gevonden verschillen tussen ESBLs in mensen en in de veehouderij suggereren dat landbouwhuisdieren, met inbegrip van pluimvee en vlees van pluimvee, een relatief kleine bijdrage leveren aan ESBLs die voorkomen bij de mens in vergelijking met de bijdrage van de mens zelf.

Dat de mens zelf de belangrijkste bron is van ESBLs, is in lijn met het recent uitgebrachte ECDC/EFSA/EMA-rapport, waarin het gebruik van cefalosporines in de humane gezondheidszorg als belangrijkste oorzaak voor het voorkomen van ESBL-producerende *E. coli* bij de mens werd genoemd.

Uitwisseling met vee belangrijkste route voor veehouder

Een uitzondering vormen veehouders. De verdelingen van ESBL-soorten in deze groepen vertonen een sterke gelijkenis met die in het eigen vee en verschillen van die van anderen bevolkingsgroepen. Dit suggereert dat contact met vee de meest waarschijnlijk transmissieroute is.

ESBL-bijdrage gezelschapsdieren nog onduidelijk.

De ESBL-soorten van honden leken zowel op die van mensen als die van de veehouderij. Dit is vermoedelijk deels te verklaren door het intensieve contact van de hond met zijn eigenaar, maar deels ook door het eten van besmet verse of rauwe vleesproducten en deels door het uitwisselen van ESBLs tussen honden via intensief onderling contact. Of direct contact met gezelschapsdieren leidt tot een hogere kans op ESBL-dragerschap bij mensen is binnen ESBLAT niet aangetoond.

ESBL-bijdrage door vlees eten, zwemmen en veehouderijlucht gering

Op basis van zwemfrequentie, wateropname en watercontaminatie is de blootstelling van zwemmers geschat. Hetzelfde is gedaan voor de blootstelling door consumptie van varkens-, kip- en rundvlees. Hiervoor zijn gegevens over de mate van besmetting van vlees en vleesproducten gecombineerd met informatie over de consumptiefrequentie.

De analyses laten zien dat zowel zwemmers als consumenten worden blootgesteld aan lage concentraties ESBLs. De blootstelling door consumptie van vlees, en vooral rauwe vleesproducten, is hoger dan de blootstelling aan ESBLs via zwemmen. Op dit moment zijn er in Nederland geen epidemiologische studies die laten zien dat blootstelling door vleeseten of zwemmen leidt tot een verhoogde kans op dragerschap in de algemene bevolking of infecties bij patiënten.

Omwonenden van veehouderijbedrijven zijn blootgesteld aan ESBLs via het milieu, bijvoorbeeld in de lucht. Onderzoek onder omwonenden liet zien dat deze blootstelling niet resulteert in een verhoogde kans op dragerschap.

Rekenmodel verspreiding van ESBLs bevestigt geringe bijdrage dier en milieu

De eerste verkennende attributieanalyse, gebruikmakend van reeds bestaande modellen, ondersteunt eerdere studies die concludeerden dat ESBLs bij de mens slechts in beperkte mate kunnen worden toegeschreven aan dierlijke bronnen en oppervlaktewater.

Door de vele mogelijke verspreidingsroutes en reservoirs is een kwantitatieve analyse van de bijdrage aan ESBL bij de mens echter uitermate complex. Zelfs met de omvangrijke hoeveelheid nieuwe gegevens die verkregen zijn in de ESBLAT-studies blijven er nog vragen over. Bijvoorbeeld over hoe lang mensen en dieren drager van ESBL blijven, wat de relatie tussen de mate van blootstelling en de kans op dragerschap is (dosis-effectrelaties) en wat de rol van met ESBL terugkerende reizigers is. Ook geeft de analyse nog geen volledig en onvoldoende kwantitatief beeld van de transmissieroutes van verschillende reservoirs naar de mens (direct contact, voedsel, milieu).

Mens, dier en milieu: one-health

De alom aanwezigheid van ESBLs in mens, dier en milieu maakt het opsporen van bronnen en transmissieroutes een typisch *one-health* probleem, wat een interdisciplinaire aanpak vraagt. Het onderzoek binnen het ESBLAT-consortium betrof dan ook een unieke samenwerking van experts uit de humane gezondheidszorg en gezondheidsonderzoek, diergeneeskunde en milieuwetenschappen. Deze samenwerking was van groot belang om de humane blootstellings- en gezondheidsrisico's door mens, dier en milieu te kunnen onderzoeken en kwantificeren. Dit heeft geleid tot belangrijke nieuwe inzichten in de aanwezigheid en de verspreiding van ESBLs, en ook openliggende vragen. Gezien de dynamische van aard van deze problematiek blijft daarom continue aandacht in alle domeinen gewenst.

Blijvende monitoring ESBL cruciaal

De mens zelf lijkt vooralsnog de belangrijkste bron van ESBLs die bij patiënten infecties veroorzaken.

Infectiecontrole en verantwoord gebruik van antibiotica (*antibiotic stewardship*) in de gezondheidszorg en de diergeneeskunde blijven daarom van belang om verspreiding van ESBLs te voorkomen.

Hoewel de directe bijdrage vanuit de voedselketen en het oppervlaktewater op dit moment gering lijkt, zijn het wel zeer grote reservoirs die altijd een bron van blootstelling en verspreiding zullen blijven. Er is dan ook grote behoefte aan aanvullende longitudinale studies in een aantal reservoirs om de rekenmodellen verder te

verbeteren en de bijdrage van bronnen te identificeren. Monitoring van ESBLs in de verschillende reservoirs is daarom cruciaal om veranderingen in de dynamiek tijdig te herkennen.

3 Inleiding

Wat is het probleem?

Sinds de eeuwwisseling komen ESBLs in toenemende mate bij mens en dier voor. Dit komt grotendeels door overmatig gebruik van antibiotica, maar ook toegenomen mobiliteit en besmetting via het milieu dragen hieraan bij. Dat is verontrustend. ESBLs kunnen voor de mens en dier belangrijke antibiotica zoals penicillines en cefalosporines afbreken waardoor ze hun werking verliezen. De mate waarin de veehouderij, de voedselketen en het milieu bijdragen aan dragerschap en infecties bij de mens is onbekend.

Wat zijn ESBLs?

ESBLs zijn door bacteriën geproduceerde enzymen die antibiotica die tot de bèta-lactamgroep behoren inactiveren. De Extended Spectrum Bèta-Lactamasen, waar de afkorting ESBLs voor staat, inactiveren de penicillines, ampicilline, amoxicilline en ook alle cefalosporines, allen bèta-lactamantibiotica. Dit zijn voor mens en dier zeer belangrijke antibiotica. Bacteriën die ESBLs produceren zijn resistent en dus niet effectief met deze middelen te behandelen.

Er zijn veel soorten ESBLs bekend en die behoren tot een toenemend aantal groepen waarvan de naam altijd uit een code bestaat met een nummer erachter. De meest voorkomende ESBLs behoren tot de groepen TEM, SHV en CTX-M. Een veel voorkomende variant op de ESBLs is de CMY-groep (behorend tot de plasmid overdraagbare AmpC-klasse). Het nummer zegt iets over de genetische variant binnen een groep. Veel voorkomend zijn CTX-M-1, 9, 14, 15 etc., TEM-20, 52 etc., SHV-2, 12 etc. en CMY-2.

Waar komen ESBLs voor?

ESBLs komen sinds ongeveer 2000 in toenemende mate bij mens en dier voor. Bij de mens wordt dat grotendeels veroorzaakt door een wereldwijde (pandemische) verspreiding van CTX-M-genen, met name CTX-M-15 die van bacterie op bacterie wordt overgedragen via plasmiden, kleine ringvormige stukje DNA (zie de volgende paragraaf "hoe worden ESBLs verspreid"). Deze plasmiden hebben zich in een bij mensen succesvolle darmbacterie, de *E. coli*-variant ST131, genesteld. Deze *E. coli*-bacterie met ESBL wordt van mens op mens overgedragen.

In landbouwhuisdieren worden veelal andere ESBL-varianten gezien, waarbij CTX-M-1, TEM-52, CMY-2, SHV-12, CTX-M-14 en SHV-2, in volgorde van mate van voorkomen, kunnen worden genoemd. Deze ESBLs worden in de mest van alle diersoorten gevonden zonder dat deze er last van hebben.

Daarnaast is vooral pluimveevlees vaak besmet. Vlees van andere diersoorten is veel minder vaak besmet. De ESBL die bij mensen het vaakst wordt gevonden, CTX-M-15, komt ook voor bij landbouwhuisdieren, maar dat is slechts incidenteel het geval.

Hoe worden ESBLs verspreid?

De verspreiding van ESBLs is uiterst complex van aard. Dit omdat ESBL-genen overdraagbaar zijn binnen bacteriën van het chromosomale DNA naar plasmiden. Plasmiden zijn extra-chromosomale DNA-structuren die zich binnen een bacterie kunnen vermenigvuldigen en die onafhankelijk van de celdeling van bacteriën actief worden overgedragen naar andere bacteriën. Dit laatste proces heet conjugatie. Conjugatie is het meest efficiënt binnen een soort, zoals b.v. van de ene *E. coli* naar een andere *E. coli*. Maar, het kan ook plaatsvinden tussen bacteriën die minder nauw verwant zijn zoals van *E. coli* naar b.v. *Salmonella*. Conjugatie gebeurt op plekken waar veel bacteriën in innig contact met elkaar aanwezig zijn, zoals het maagdarmkanaal van mens of dier, en mogelijk ook in mestputten of riolen. Door deze eigenschappen zijn er in feite geen grenzen aan de verspreidingsmogelijkheden van ESBLs.

De overdracht van ESBLs binnen dieren en tussen dier en mens wordt in eerste instantie bepaald door besmetting van mensen door ESBL-dragende bacteriën van waaruit overdracht van plasmiden die ESBLs in zich dragen kan plaatsvinden naar bacteriën van de mens. De bijdrage daaraan door specifieke aan mens aangepaste bacteriën, zoals de humane *E. coli* ST131, lijkt voor dierlijke bronnen van minder belang te zijn. Dit betekent dat voor het bestuderen van de verspreiding van ESBLs het dus nodig is om zowel de ESBL-genen zelf, ook de plasmiden die ESBLs dragen goed te karakteriseren. Op basis van de aan of afwezigheid van genetische overeenkomsten kan een inschatting worden gemaakt van de aan-, of afwezigheid van een bijdrage vanuit een bepaald reservoir aan het voorkomen bij de mens.

Wat bepaalt het voorkomen van ESBLs?

Het voorkomen van ESBLs bij mensen en dieren is het gevolg van een combinatie van factoren. Antibioticagebruik, zowel humaan als veterinair, is de belangrijkste factor. Dit heeft een positieve selectie van ESBLs tot gevolg en stimuleert de recirculatie in een bepaald reservoir en de kans op verspreiding via overdracht. Dit betreft vooral bèta-lacmanantibiotica die specifiek ESBLs selecteren, zoals de cefalosporinen, maar via co-selectie kunnen ook andere antibiotica zoals de fluorchinolonen en aminoglycosiden indirect ESBLs selecteren. Dit gebeurt zowel bij de mens als bij dieren.

De verspreiding van ESBLs wordt vervolgens bij mens en dier bepaald door niet-afdoende hygiëne- en infectiecontrolemaatregelen en bij landbouwhuisdieren vooral door dierbewegingen binnen en tussen bedrijven. Blootstelling aan ESBLs bepaalt of er overdracht tot stand kan komen. Dat kan bijvoorbeeld via contact met mens of dier, via besmet voedsel of via het milieu. Wanneer er sprake van blootstelling is, bepaalt niet alleen de concentratie aan ESBLs en de blootstellingsfrequentie of succesvolle uitwisseling tot stand komt en dit tot dragerschap leidt, maar ook de moleculaire eigenschappen van de ESBL-dragende bacteriën en de plasmiden. Al met al een zeer complex en moeilijk te voorspellen proces. Dragerschap leidt vervolgens meestal niet tot ziekte.

Omdat in Nederland een groot verschil bestond tussen de hoeveelheid antibiotica die bij de mens (zeer laag) en dieren (tot voor kort hoog) werden gebruikt, is het reduceren van het gebruik in de dierhouderij een belangrijk onderdeel van het overheidsbeleid sinds 2008. Er zijn door diersectorpartijen binnen de in de keten gebruikte kwaliteitssystemen, uitgebreide maatregelen geïnitieerd ter registratie en reductie van het gebruik. Dit heeft van 2009 tot 2016 geleid tot een reductie van bijna 65% in verkochte antibiotica voor gebruik in dieren. Dit is een belangrijk resultaat dat onder andere tot een reductie van het voorkomen van ESBLs in de meeste landbouwhuisdieren en dierlijke producten heeft geleid.

Wat is er bekend over relaties tussen ESBLs uit mensen en dieren?

Onderzoek van UMCU, WBVR, RIVM en VUMC heeft aangetoond dat er een genetische relatie bestaat tussen een deel van de ESBLs die klinische infecties veroorzaken bij mensen en die van pluimvee en pluimveevlees. Echter, uit kippen(vlees) geïsoleerde ESBLs worden ook in andere diersoorten en het milieu gevonden, wat suggereert dat er ook andere reservoirs voor verspreiding naar de mens kunnen zijn, waaronder de mens zelf (NETHMAP/MARAN-2017).

Verder is niet duidelijk in hoeverre andere overdrachtsroutes dan vlees bijdragen aan blootstelling van de mens, bijvoorbeeld via plantaardige producten, het milieu of direct contact. Ook de relatieve bijdrage van ESBLs uit dierreservoirs ten opzichte van de mens als reservoir (inclusief circulatie in ziekenhuizen en besmetting tijdens buitenlandse reizen) is onbekend. Afhankelijk van het detailniveau waarop naar genetische verwantschap wordt gekeken, is voor de *E. coli*-bacterie geschat dat 10-30% van de ESBLs uit klinische isolaten van de mens uit de veehouderij (vooral kip) afkomstig kan zijn. Het is niet uit te sluiten dat deze relatie aan variatie in regio, tijd en bron onderhevig is.

3.1 Doelstelling

Dit project heeft twee doelstellingen:

1. Vaststellen wat de bijdrage is van alle ESBL-reservoirs aan het dragerschap en infecties bij mensen.
2. Vaststellen wat de transmissieroutes zijn vanuit deze reservoirs naar de (geïnfecteerde) mens.

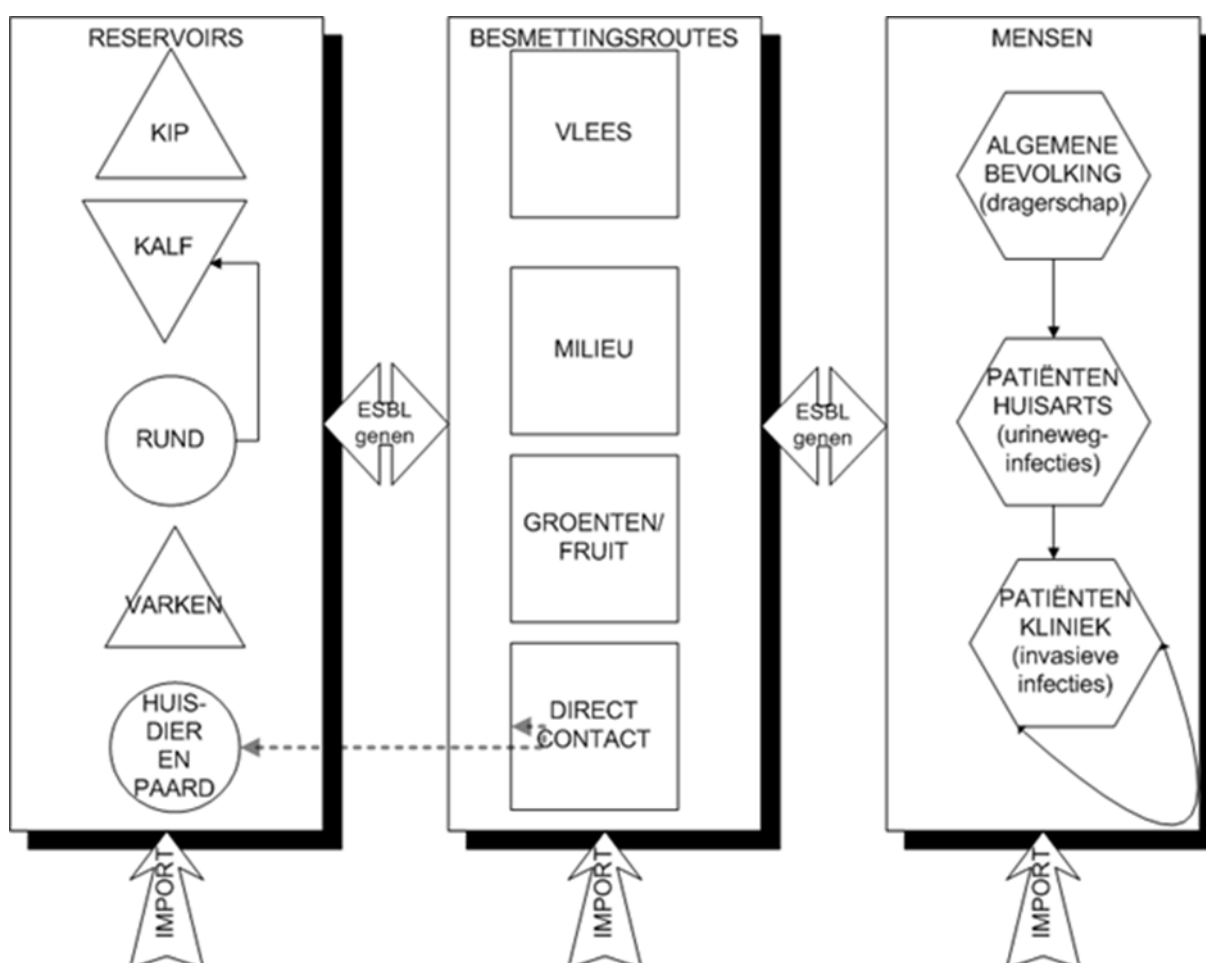
De belangrijkste reservoirs van waaruit transmissie naar de mens kan plaatsvinden zijn, naast de mens zelf, landbouwhuisdieren: kippen, varkens en runderen (zie figuur 3.1.). Andere potentieel belangrijke reservoirs zijn voedsel van dierlijke oorsprong (vooral vlees, maar ook zuivelproducten), voedsel van plantaardige oorsprong en het milieu (vooral water en bodem); waarbij ook tal van interacties tussen reservoirs en blootstellingsroutes onderling bestaan. Ook de bijdrage van direct contact tussen mensen en huisdieren en paarden zal worden bestudeerd. Daarnaast is de vermeerdering van ESBL door contact tussen mensen onderling en selectiedruk door antibioticagebruik in de humane geneeskunde een belangrijke factor. Ook moet rekening worden

gehouden met "import" van genen/plasmiden/bacteriën via mensen, dieren, voedsel en (rivier)water uit andere landen, en met genoverdracht binnen en tussen reservoirs.

Wat betreft de humane reservoirs wordt onderscheid gemaakt tussen de algemene bevolking (dragerschap), patiënten in huisartsenpraktijken (urinewegsinfecties) en patiënten in ziekenhuizen. De aanname is dat dragerschap in de algemene bevolking kan leiden tot urinewegsinfecties met resistente bacteriën, waarna een deel van deze patiënten in het ziekenhuis moet worden opgenomen. Daarnaast is er een autonome kringloop in het ziekenhuis (*Klebsiella* overleeft beter in ziekenhuizen dan *E. coli*) naast die van de instroom uit de algemene bevolking.

Het onderzoek richt zich op de in figuur 3.1. aangegeven reservoirs en besmettingsroutes.

Figuur 3.1. Reservoirs en besmettingsroutes van ESBLs (met dank aan Prof. A. Havelaar).



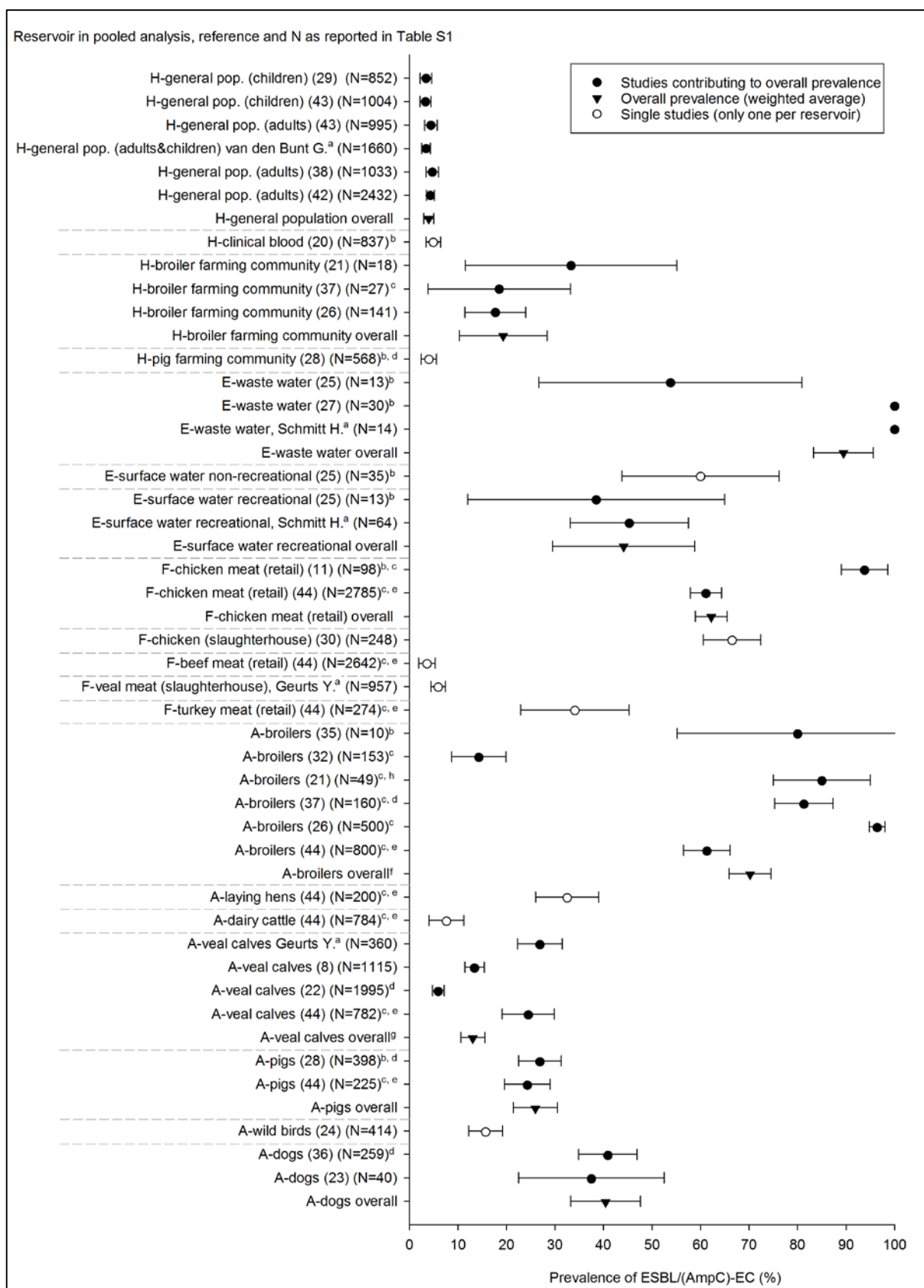
4 ESBLs in Nederlandse reservoirs

Alle Nederlandse studies die in de afgelopen jaren zijn uitgevoerd volgens een systematiek vergelijkbaar met de microbiologische protocollen van het ESBLAT-project, zijn opgenomen in deze studie. In een aantal gevallen was sprake van lopend onderzoek en zijn nog niet gepubliceerde gegevens opgenomen in de ESBLAT-gegevensbestanden. Daarnaast zijn met middelen van het ESBLAT-project in verschillende reservoirs monsters genomen. Deze studies zijn opgenomen in de appendix. Het betrof onder meer analyse van monsters afkomstig van varkenshouders en hun varkens, slachthuismedewerkers, een open populatiestudie, een steekproef met huisdieren en oppervlaktewatermonsters.

In figuur 4.1. zijn de prevalentiegegevens opgenomen van 5.808 binnen ESBLAT verzamelde ESBLs. Dit betreft aantallen isolaten, gekarakteriseerde genen en plasmiden waarop deze genen liggen. Deze 5.808 ESBLs zijn gekweekt uit meer dan 27000 monsters, die zijn verzameld in 35 studies uit 22 verschillende reservoirs. Van een deel van deze isolaten (N = 812) waren ook gegevens beschikbaar over de plasmiden waarop de ESBLs zijn gelegen. Op basis van deze gegevens zijn de berekende prevalenties van ESBL/(AmpC)-producerende *E. coli* per humane, dierlijke, voedsel en milieu-bron met het betrouwbaarheidsinterval weergegeven.

In alle 22 onderzochte reservoirs werden ESBLs aangetoond. Het aandeel ESBLs bij patiënten en de prevalentie van dragerschap bij mensen in de algemene bevolking en bij varkenshouders en besmetting van rundvlees was laag (< 5%). De prevalentie was gemiddeld (10 – 50%) in vleeskuikenhouders, recreatiewater, varkens, vleeskalveren, honden en wilde vogels en het hoogst (> 60%) in rioolwater, vleeskuikens en pluimveevlees.

Figuur 4.1. Prevalentie (%) van genetisch bevestigde ESBL/(AmpC) producerende *E. coli* per bron (met toestemming uit Dorado-Garcia et al. 2017; voor referenties zie Tabel Supplement 1).



4.1 Vergelijking van ESBLs in 22 reservoirs

De interactie tussen dierlijke, voedsel- en omgevingsbronnen en mensen bij de overdracht van ESBLs is moeilijk te kwantificeren. Om een uitgebreide analyse van de dynamiek van de ESBLs in en tussen deze reservoirs mogelijk te maken, werden genetische gegevens van ESBLs uit 35 studies in Nederland met in totaal meer dan 27.000 observaties verzameld. Deze studies zijn tussen 2005-2015 uitgevoerd in 22 verschillende reservoirs.

De relatieve verdeling van ESBL-genen uit 5.808 opgekweekte bacteriën en de ESBL-dragende plasmiden uit 812 van deze bacteriën werden vergeleken voor de 22 reservoirs (figuur 4.1.1. en 4.1.2.). De grote diversiteit aan ESBLs die werd aangetroffen in alle reservoirs, maakt de complexiteit van de ESBL-problematiek duidelijk. De evolutionaire relatie van de ESBLs in deze reservoirs zijn onbekend, maar er zal ongetwijfeld uitwisseling bestaan tussen de reservoirs en deels zullen er gemeenschappelijke bronnen zijn.

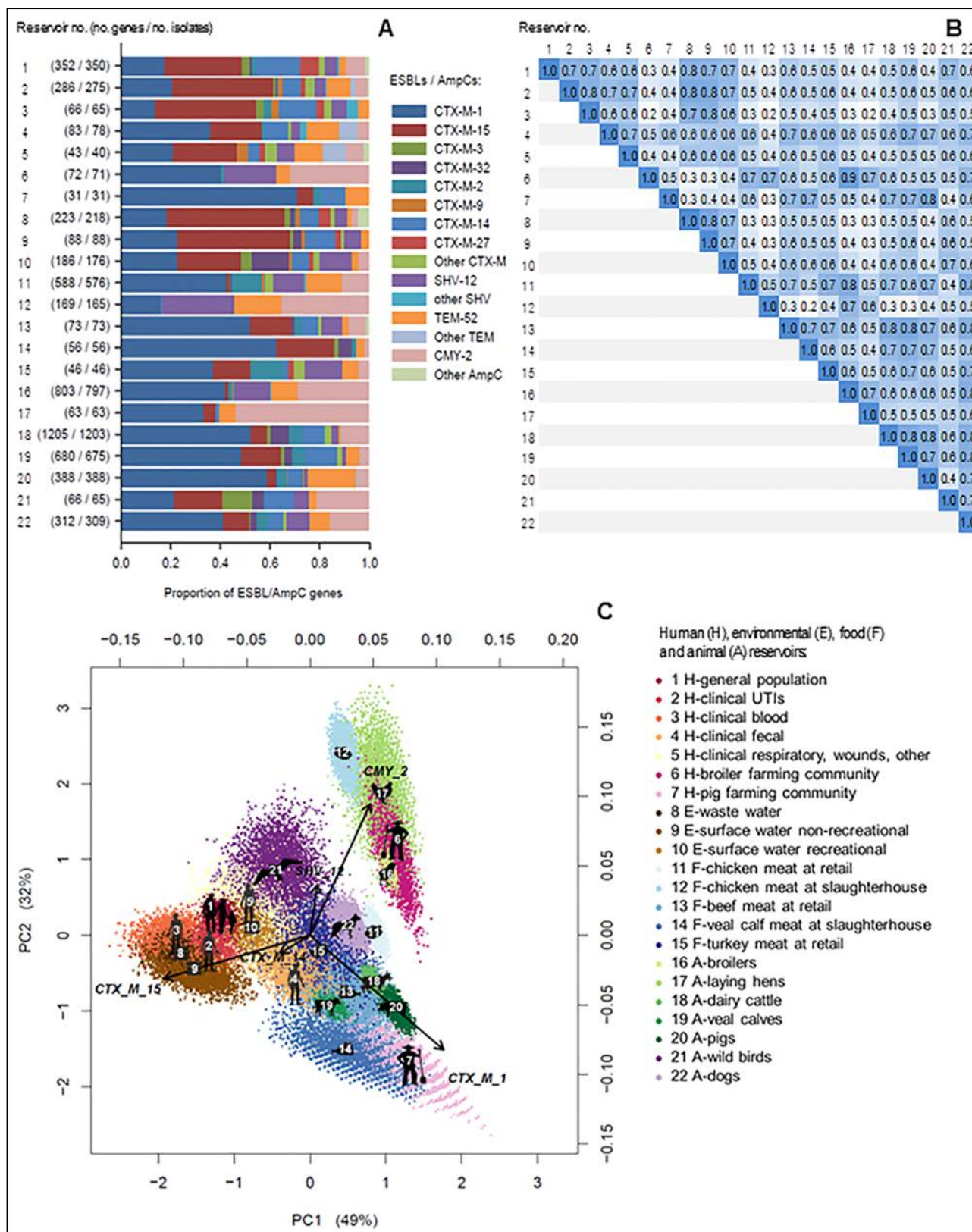
CTX-M-1 is de ESBL-soort die het meest voorkomt in dierlijke reservoirs en in lagere frequenties bij de mens. Het omgekeerde geldt voor CTX-M-15, die juist vaker bij de mens wordt gevonden dan bij dieren. Deze ESBL-soort is ook in grote delen van de wereld de meest voorkomende variant bij mensen en veroorzaakt infecties. In de ESBLAT-collectie komt CTX-M-15 het meest voor bij de mens en in rioolwater. Bij veehouders komt CTX-M-15 slechts incidenteel voor. Zij zijn vaker drager van ESBL-soorten die ook bij hun dieren voorkomen. Dit is te verklaren door de frequentie en mate van contact die er is met hun dieren.

De genetische overeenkomsten tussen de ESBL-soorten uit verschillende humane populaties en vee- of voedselgerelateerde reservoirs varieerden van 0.2 tot 0.6 en tussen mens en oppervlakte- en rioolwater en wilde vogels van 0.6 tot 0.8 (figuur 4.1.1.B). Dit suggereert dat de veehouderij, waaronder ook pluimvee en pluimveevlees, niet de belangrijkste reservoirs zijn van ESBLs bij mensen. Dit geldt zowel voor mensen in de algemene bevolking als voor patiënten. Daarentegen was er een nauwe overeenkomst tussen mens en dier (0.8-0.9) voor veehouders die direct contact hebben met hun vleeskuikens en varkens. In de onderzochte humane populaties was de diversiteit in ESBL-soorten en plasmiden groter dan in andere reservoirs. Deze bevindingen demonstreren de complexe dynamiek van ESBLs en bijbehorende plasmiden en lieten geen nauwe koppeling zien tussen het dierreservoir en de algemene bevolking.

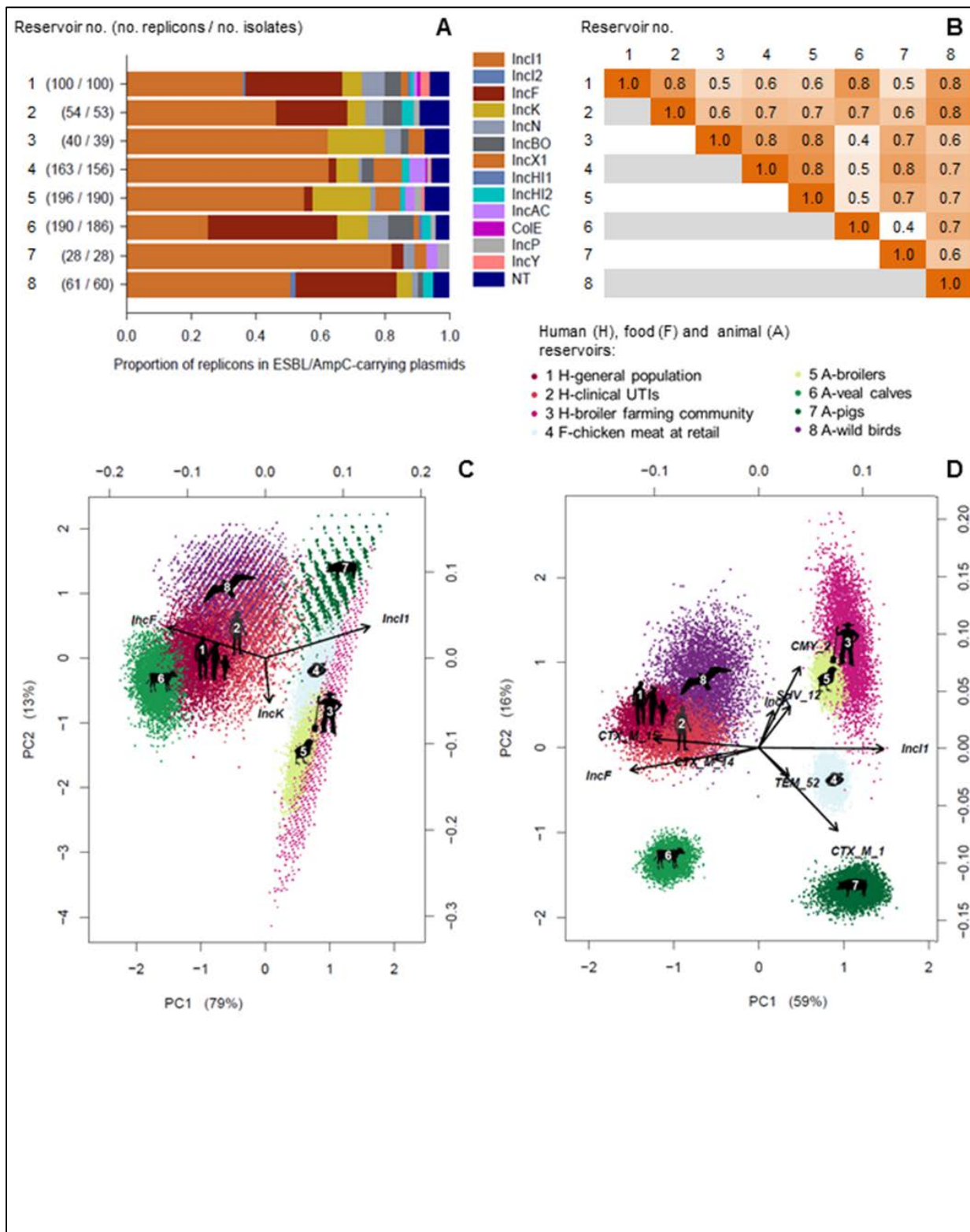
Literatuur

- Dorado-García A, Smid JH, van Pelt W, Bonten MJM, Fluit AC, van den Bunt G, Wagenaar JA, Hordijk J, Dierikx CM, Veldman KT, de Koeijer A, Dohmen W, Schmitt, H, Liakopoulos A, Pacholewicz E, Lam TJGM, Velthuis AG, Heuvelink A, Gonggrijp, MA, van Duijkeren E, van Hoek AHAM, de Roda Husman AM, Blaak H, Havelaar AH, Mevius DJ, Heederik DJJ. Molecular relatedness of ESBL/AmpC-producing *Escherichia coli* from humans, animals, food and the environment: a pooled analysis. *J Antimicrob Chemother.* 2017 Nov 18. doi: 10.1093/jac/dkx397.

Figuur 4.1.1. A: Relatieve verdeling van ESBL-genen aangetoond in 22 reservoirs. B: Proportionele similariteit in ESBL-verdelingen tussen de 22 reservoirs (0 is geen overeenkomst en 1 is identiek). C: Principale componenten analyse op basis van bootstrap waarbij de overeenkomsten en verschillen in de verdelingen worden gevisualiseerd (met toestemming uit Dorado Garcia et al, 2017).



Figuur 4.1.2. A: Relatieve verdeling van plasmid varianten aangetoond in 8 reservoirs. **B:** Proportionele similariteit in plasmiden tussen de 8 reservoirs (0 is geen overeenkomst en 1 is identiek). **C:** Principale Componenten Analyse op basis van bootstrap waarbij de overeenkomsten en verschillen in de verdelingen worden gevisualiseerd. **D:** PCA van ESBL-Plasmid combinaties per reservoir (met toestemming uit Dorado Garcia et al, 2017).



4.2 Blootstelling van mensen aan ESBLs

Mensen kunnen op verschillende manieren blootgesteld worden aan bacteriën die resistent zijn tegen antibiotica, zoals de ESBL-producerende *E. coli*-bacteriën. In dit onderzoek zijn twee mogelijke bronnen nader bekeken: vlees en oppervlaktewater.

4.2.1 Via consumptie van vlees

Er is berekend in welke mate verschillende vleessoorten bijdragen aan de blootstelling van de mens aan ESBL-producerende bacteriën op basis van ESBL-metingen op vlees (tabel 4.2.1.) en gegevens over vleesconsumptiepatronen in de Nederlandse populatie. Volgens deze gegevens is rundvlees een belangrijkere bron dan kippenvlees (tabel 4.2.2). Vlees van varken, kalf of schaap is minder relevant voor de totale blootstelling door het eten van vlees. Bovendien is rekening gehouden met de invloed van diverse factoren die de aanwezigheid van bacteriën op vlees beïnvloeden: soorten voorbewerking (verhitten, zouten, drogen/fermenteren), bewaarcondities (kamertemperatuur, koelkast, vriezer), en de bereiding in de keuken (rauw, goed doorbakken, half doorbakken, de mate van kruisbesmetting etc.).

Van de onderzochte vleessoorten is rundvlees verantwoordelijk voor circa 78% van de totale blootstelling via het eten van vlees. Dat komt vooral doordat sommige rundvleesproducten rauw worden gegeten, zoals filet americain. Op rauw kippenvlees komen weliswaar de meeste ESBL-producerende bacteriën voor. Maar doordat kippenvlees meestal goed wordt verhit voordat het wordt gegeten, is de blootstelling veel lager (18%). Mensen kunnen wel door rauw kippenvlees besmet raken via kruisbesmetting in de keuken, bijvoorbeeld door kip en groente met hetzelfde mes of op dezelfde snijplank te snijden.

De geschatte opname van ESBL-*E. coli* door het eten van vlees voor de totale Nederlandse bevolking bedroeg $1,2 \times 10^9$ bacteriën per jaar.

Het gaat in dit onderzoek om het verschil in blootstelling tussen soorten vlees. Het is hierbij niet duidelijk in welke mate mensen hierdoor daadwerkelijk drager worden van deze bacterie. Bovendien wordt niet iedere drager ziek van een resistente bacterie.

Tabel 4.2.1 Prevalentie van vlees en vleesproducten die besmet zijn met ESBL-*E. coli* (EEC) (Evers et al. 2016; MARAN-015).

Dier	EEC prevalentie (%)	
	Vers vlees	Vlees producten
Rund	2.2	7.8
Kalf	3.1	21.0
Varken	2.7	4.0
Lam	0	0
Kip	67.0	67.0 ^a

a. Is een schatting gebaseerd op het percentage besmet onverwerkt vlees

Tabel 5.2.2. Blootstelling van mensen aan ESBL-*E. coli* (EEC) via vlees (Evers, et al. 2016).

Dier	Blootstelling Nederlandse bevolking per jaar (aantal EEC)	Blootstelling per portie (aantal EEC/portie)
Rund	9,05E+08	0,275
Kip	2,09E+08	0,120
Varken	5,29E+07	0,007
Kalf	1,35E+06	0,048
Schaap/Lam	0,00E+00	0
Som/gemiddelde	1,17E+09	0,096

Literatuur

- E. G. Evers, E. van Duijkeren. Vergelijkende humane blootstellingschatting van ESBL - producerende *Escherichia coli* via consumptie van vlees. RIVM Briefrapport 2016 – 0160.
- Evers EG, Pielaat A, Smid JH, van Duijkeren E, Vennemann FB, Wijnands LM, Chardon JE. Comparative Exposure Assessment of ESBL-Producing *Escherichia coli* through Meat Consumption. PLoS One. 2017 Jan 5; 12(1):e0169589. doi:10.1371/journal.pone.0169589. eCollection 2017. Erratum in: PLoS One. 2017 Feb 24; 12 (2):e0173134.

4.2.2 Via oppervlaktewater

ESBL-producerende *E. coli*-bacteriën zijn aangetroffen in afvalwater van huishoudens en in oppervlaktewater dat wordt gebruikt voor recreatie, waardoor ook via deze route blootstelling mogelijk is. In de periode van juni tot september 2014 werden op 66 verschillende zwemlocaties watermonsters verzameld. Dit betrof officiële en niet-officiële plaatsen waar waterrecreatie plaatsvindt. Ook werden gegevens over mogelijke risicofactoren, zoals de afstand tot rioolwaterzuiveringsinstallaties, verzameld. Aanwezigheid van ESBLs in de monsters en ESBL-genotypen werden bepaald en vergeleken met genotypen in een stedelijke afvalwaterketen om de analyse van risicofactoren te ondersteunen. Bovendien werd de blootstelling van zwemmers geschat door middel van kwantitatieve microbiële risicoanalyse (QMRA).

ESBLs waren aanwezig in 67% van de geteste badplaatsen en in 100% van de monsters van de twee locaties waar het onderzoek herhaald is. De concentraties waren lager op officiële zwemlocaties (gemiddeld 0,6 ESBL-producerende bacteriën per 100 ml) dan op niet-officiële locaties (gemiddeld 1,8).

De studie liet zien dat afvalwater een risicofactor is voor de mate van besmetting van recreatiewater. In zwemlocaties met rioolwaterzuiveringsinstallaties (rwzi's) in de nabije omgeving was de concentratie aanzienlijk hoger. Hogere concentraties aan ESBLs werden ook gevonden wanneer het de dag daarvoor regende ($p = 0,01$). De studie liet zien dat afvalwater een risicofactor is voor de mate van besmetting van recreatiewater. Volgens een kwantitatieve microbiële risicobeoordeling leidt 53% of meer van de zwemgebeurtenissen niet tot blootstelling van zwemmers aan ESBLs. In de rest van zwemgebeurtenissen (47%) was de gemiddelde opname van ESBL-producerende bacteriën: 0,37 voor kinderen, 0,18 voor vrouwen en 0,27 voor mannen. De opname van ESBLs door zwemmen in zoet oppervlaktewater voor de totale Nederlandse bevolking bedroeg $4,6 \times 10^6$ kve per jaar.

Concluderend komen ESBLs vaak voor in zwemlocaties in Nederland, zelfs op plaatsen die als "goed" zijn geclassificeerd volgens de Europese zwemwaterrichtlijn (Richtlijn 2006/7 / EG). Bovendien bevestigde deze studie dat de nabijheid van rwzi's een risicofactor is voor het voorkomen van ESBLs in recreatiewater, wijzend op de rol van fecale besmetting bij de verspreiding van ESBL-bacteriën in het milieu.

Literatuur

- Daisy de Vries, et al. Risk factors for ESBL producing *E. coli* in recreational waters and potential human exposure. Submitted

4.3 Epidemiologie van ESBLs en Attributieanalyse

Vóór het jaar 2000 kwamen ESBLs vooral voor in ziekenhuizen en dit betroffen voornamelijk TEM en SHV-varianten en ziekenhuispathogenen zoals *Klebsiella pneumoniae*. Vanaf het einde van de negentiger jaren maar vooral vanaf het jaar 2000 werd een sterke toename gezien van ESBLs die behoren tot de CTX-M-familie en ook een sterke toename in *E. coli* (Canton en Cocque, 2006). De wereldwijde verspreiding van CTX-M werd gedomineerd door de humaan meest voorkomende variant CTX-M-15, maar ook CTX-M-3, -9, -14 of -2 komen veel bij mensen voor, waarbij er regionale verschillen bestaan in frequentie van voorkomen.

CTX-M-varianten zijn niet gelijkmatig over de wereld verspreid. ESBLs uit de CTX-M-9 groep komen veel voor in het Mediterrane gebied, het verenigd Koninkrijk en China, CTX-M-2 vooral in Zuid-Amerika, terwijl CTX-M-15 zich wereldwijd heeft verspreid. De succesvolle verspreiding van CTX-M-15 komt doordat het gen dat voor deze ESBL codeert, ingebed is in een plasmide dat stabiel aanwezig blijft zonder selectiedruk gemakkelijk kan overleven (incompatibiliteitsklasse-F). Op basis van de indeling in incompatibiliteitsklassen zijn alleen al voor *E. coli* meer dan 25 plasmide-soorten beschreven die deze kenmerkende eigenschappen hebben. Het F-plasmide is opgenomen door de aan mensen aangepaste pathogene *E. coli*-variant ST131. Deze *E. coli* kan leiden tot langdurig dragerschap bij mensen en zowel in de bevolking als in zorginstellingen tot infecties leiden. Door reizen en hospitalisatie in het buitenland is deze *E. coli* snel en effectief verspreid in de wereldbevolking (Pitout, 2009). Op basis van de indeling in incompatibiliteitsklassen zijn alleen al voor *E. coli* meer dan 25 plasmide-soorten beschreven die hun kenmerkende eigenschappen hebben. Dit F-plasmide is opgenomen door een aan mensen aangepaste uropathogene *E. coli* variant (ST131). Deze *E. coli* kan leiden tot langdurig dragerschap bij mensen en zowel in de bevolking als in zorginstellingen tot infecties leiden. Door reizen en hospitalisatie in het buitenland is deze *E. coli* snel en effectief verspreid in de wereldbevolking (Pitout, 2009).

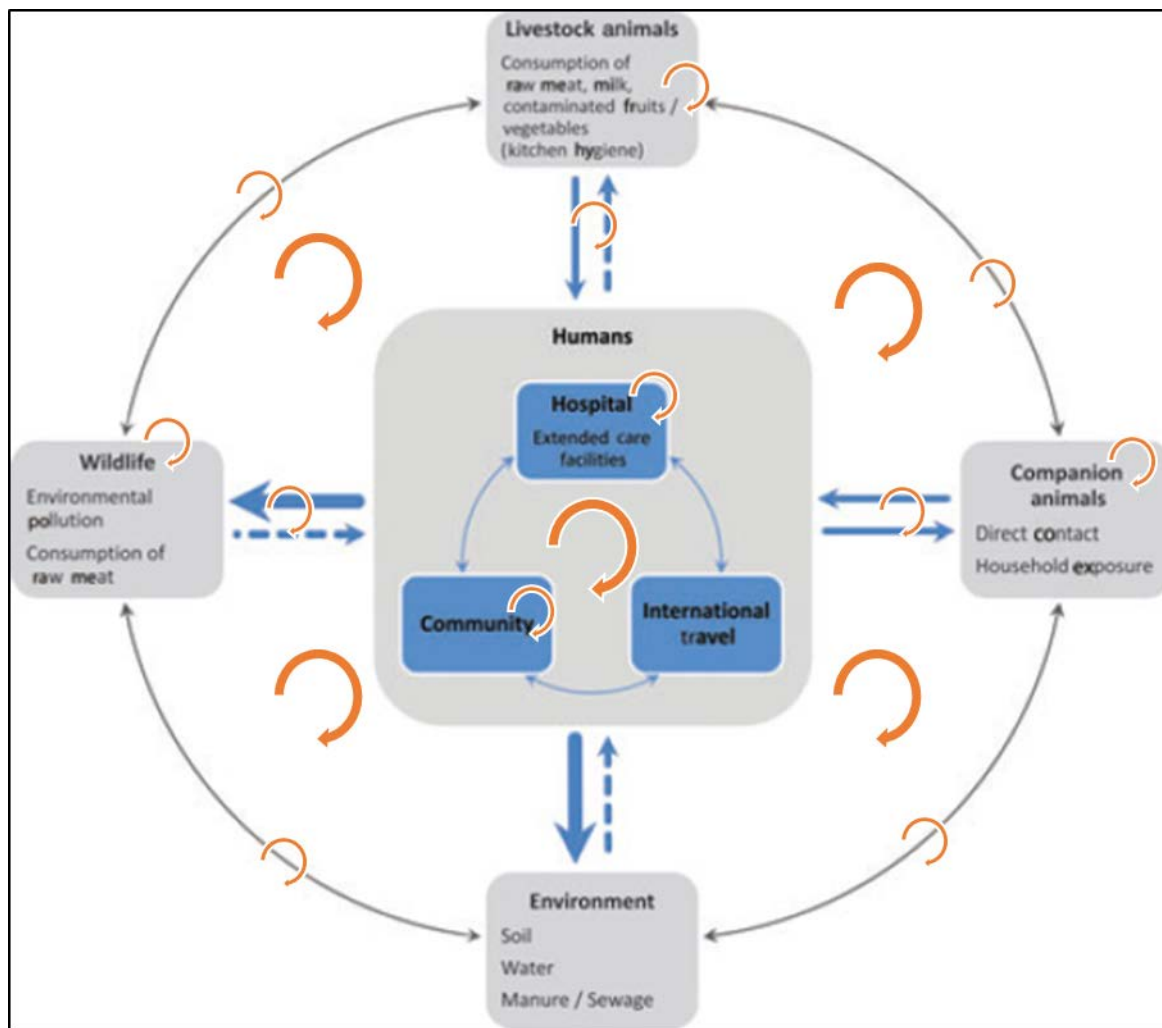
Er bestaat veel literatuur over het feit dat reizen een risicofactor is voor dragerschap van ESBLs, hetgeen is samengevat door Ruppé et al. in 2017. Het risico om besmet te raken varieert per regio van 21 tot 51%. Reizen naar Zuidoost-Azië geeft het hoogste risico om als drager terug te komen. De eerste analyse van de binnen ESBLAT uitgevoerde studie naar ESBLs in de open algemene bevolking bevestigt dit (zie paragraaf 5.2.2).

De ESBL-soorten die bij mensen het meest worden gevonden, komen bij dieren ook voor. Er zijn ook grote verschillen met die van de mens. In Europa is het meest voorkomende ESBL-type bij alle diersoorten CTX-M-1 en daarnaast worden SHV-12 en CMY-2 (een AmpC bèta-lactamase) ook veel gevonden. Het simpele feit dat er verschillen zijn in de mate van voorkomen van bepaalde varianten bij mens en dier, suggereert al dat dieren en de voedselketen niet de meest belangrijke bron van ESBLs voor de mens zijn. Het wijst erop dat de evolutie en verspreiding in dieren en mensen grotendeels gescheiden is verlopen.

Verspreidingsroutes

De interactie en uitwisseling tussen verschillende reservoirs of bronnen van ESBL en mogelijke routes naar de mens zijn dan ook zeer complex, zoals is weergegeven in figuur 4.3.1. De mens zelf staat centraal met transmissie tussen populaties in zorginstellingen, de algemene bevolking en reizigers. Daaromheen liggen reservoirs als veehouderij, gezelschapsdieren en milieu die via routes als direct contact, de voedselketen en het milieu ESBLs kunnen uitwisselen met mensen. Echter deze reservoirs worden ook gevoed met ESBLs vanuit de mens zelf. De oranje pijlen in de figuur symboliseren de dynamiek die er bestaat binnen en tussen reservoirs. Deze complexe dynamiek kan ook sterke invloed hebben op de verspreiding van ESBLs in de tijd.

Figuur 4.3.1. De dynamiek van de transmissie van ESBLs tussen verschillende reservoirs (naar Ewers et al, 2012)



Voor ESBLs is de verspreiding essentieel verschillend van die van voedselpathogenen zoals *Salmonella* en *Campylobacter* waarvoor geen humaan reservoir bestaat en er dus zo goed als geen mens-mens- en mens-diertransmissie plaatsvindt. Voedselpathogenen verspreiden zich voornamelijk via dierlijke bronnen. Het schema in figuur 4.3.1. laat zien dat voor ESBLs alle reservoirs in potentie aan elkaar kunnen bijdragen. Dit kan omdat ESBLs overdraagbaar zijn tussen bacteriesoorten en een gastheervoorkeur ontbreekt. Wat ook essentieel anders is dan bij de voedselpathogenen, is dat na blootstelling aan ESBLs de kans op ziekteverschijnselen zeer beperkt is en dat dragerschap veelal voorkomt in gewone darmbacteriën. Infecties kunnen optreden als de ESBLs in *E. coli*-varianten terechtkomen als ST131 die urineweginfecties veroorzaken. Infecties kunnen ook optreden als de ESBLs worden overgedragen vanuit gewone darmbacteriën op bacteriën zoals *Klebsiella* of *Enterobacter* die onder verzwakte personen in ziekenhuizen, zorg-gerelateerde infecties kunnen veroorzaken. Ook gewone darmbacteriën kunnen in verzwakte patiënten betrokken zijn bij infecties.

Beschikbaarheid modellen en gegevens

Dit alles betekent dat het modelleren van de bijdragen van verschillende bronnen (attributie) zeer ingewikkeld is. Er is nog geen model beschikbaar dat al deze aspecten meeneemt en voorspellingen oplevert die empirisch getoetst kunnen worden. Daarnaast is de beschikbaarheid van inputgegevens voor het model een essentieel probleem. Allereerst zijn gegevens slechts over een beperkte periode beschikbaar. Er is weinig inzicht in de factoren die afgelopen jaren tot een stijging in het voorkomen van ESBLs hebben geleid bij dieren en mensen. Tegelijkertijd zijn er duidelijke aanwijzingen dat veranderingen in het antibioticagebruik in de

dierhouderijsectoren (benchmarken derde keuze middelen en de algehele reductie in gebruik van antibiotica) hebben geleid tot een reductie in het voorkomen van ESBLs in ieder geval in pluimvee en varkens (MARAN-2017, Dohmen et al 2017). De voor ESBLAT beschikbare informatie laat niet toe deze veranderingen over de tijd in de modellen mee te nemen. Omdat sprake is van veel potentiële reservoirs die tot dragerschap bij de mens kunnen leiden zijn veel gegevens nodig om tot een goede inschatting te kunnen komen van de attributie voor ESBLs bij mensen.

Met kwantitatieve microbiologische risicoanalyse (QMRA) is de blootstelling van de mens via verschillende reservoirs in kaart gebracht. Dit betreft met name de blootstelling door consumptie van vlees en door zwemmen in recreatiewater. Dit geeft inzicht in het relatieve belang van verschillende blootstellingsroutes. Bekend was dat er belangrijke hiaten zitten in de kennis van de reservoirs en wijze van transmissie tussen reservoirs en de mens of dier. Een daarvan betrof de rol van ESBL-houdend stof afkomstig vanuit veehouderijen. Een groot deel van dit ESBLAT-project was daarom gewijd aan het systematisch verzamelen van basale gegevens om tot een eerste aanzet van QMRA en modelleringsstudies te komen. De verzamelde informatie is vervolgens geïntegreerd om tot een samenvattende conclusie over attributie van ESBLs te komen.

In het verleden zijn verschillende methodes ontwikkeld om attributie van dragerschap of infectie te berekenen. Deze methodes zijn eigenlijk allemaal gebaseerd op processen waarbij mensen besmet worden vanuit een dierlijk reservoir; hetzij via voedsel, hetzij via direct contact of een milieuroute. Vooral voor infecties met voedselpathogenen *Campylobacter* en *Salmonella* is hier veel ervaring mee opgedaan. Dit soort methodes zijn uitgebouwd om bijvoorbeeld het risico van besmetting met ESBLs door oppervlaktewater (bij zwemmen in open water) mee te nemen.

Op het eerste gezicht lijken dergelijke methodes geschikt voor ESBL-risicoattributie bij mensen. Echter, er zijn een paar belangrijke verschillen. Deze methodes richten zich op infecties die vanuit allerlei bronnen de mens kunnen besmetten, maar beschouwen de mens zelf niet als potentiële infectiebron. Verder is de orale infectieroute de kern van de analyse. Daardoor is er een enorme hoeveelheid informatie aanwezig over het aantal bacteriën dat door mensen via voedsel wordt ingenomen. Echter, veel minder informatie is beschikbaar voor de orale infectieroutes van besmettingen in het milieu en op handen. Bacteriën worden onbewust oraal opgenomen door bijvoorbeeld hand-mond contact.

Bij ESBLs is de mens zelf een belangrijke bron van de infectie en dit aspect moet daarom aan het model toegevoegd worden. Daarnaast zijn ook huisdieren potentiële infectiebronnen die moeten worden opgenomen in attributiemodellen. Voor beide groepen is de fecaal-orale transmissieroute, vooral binnen een gezin en binnen de zorg een mogelijke transmissieroute.

Omdat in dit geval de mens niet een "dead-end" infectieroute is (zoals bij *Salmonella* en *Campylobacter*), maar ook als bron van de besmetting kan optreden, is het belangrijk om het hele systeem te beschouwen en na te gaan of daarin cirkels van snelle transmissie en groei kunnen bestaan. Zie hiervoor figuur 4.3.1., hierin zijn met oranje cirkelvormige pijlen enkele (maar niet alle) transmissiecirkels binnen het systeem aangegeven.

Bijvoorbeeld in zorgsystemen kan de cyclus van mens naar mens heel kort en snel gaan omdat er veel zieke mensen dicht bij elkaar zijn en er veel antibiotica worden gebruikt. Dit kan van grote invloed zijn op de totale transmissie in het systeem. Ook kan een veehouder met een resistente bacterie onder behandeling van een antibioticumkuur tijdelijk veel resistente bacteriën uitscheiden en vervolgens het vee besmetten. Door antibioticagebruik in de veestapel kan het vee ook veel resistente bacteriën uitscheiden en mensen of andere dieren besmetten.

Een goede analyse van een systeem waarin veel verschillende reservoirs zijn die op verschillende manieren kunnen bijdragen aan het voorkomen en de verspreiding van ESBLs, is lastig omdat sprake is van veel veranderingen over de tijd. Lange termijn trends, zoals de vermindering van het antibioticumgebruik in de Nederlandse veehouderij sinds 2008 vormen een additionele complicatie, die op dit moment niet in de modellen is meegenomen onder meer door het ontbreken van goede kwantitatieve gegevens over het effect van de antibioticareductie op het voorkomen van ESBLs op bedrijfsniveau.

Nadere uitwerking verkregen gegevens

Risicoattributie kan in dergelijke cirkels met een *next-generation matrix* worden geanalyseerd. Daarmee wordt duidelijk welke van deze cirkels binnen het systeem de grootste invloed hebben en de transmissie naar de mens bepalen. Deze methodiek is binnen dit project geëxploreerd, en heeft het inzicht in het systeem vergroot. In principe zijn ook insleep vanuit het buitenland, en het effect van nieuw te implementeren maatregelen met

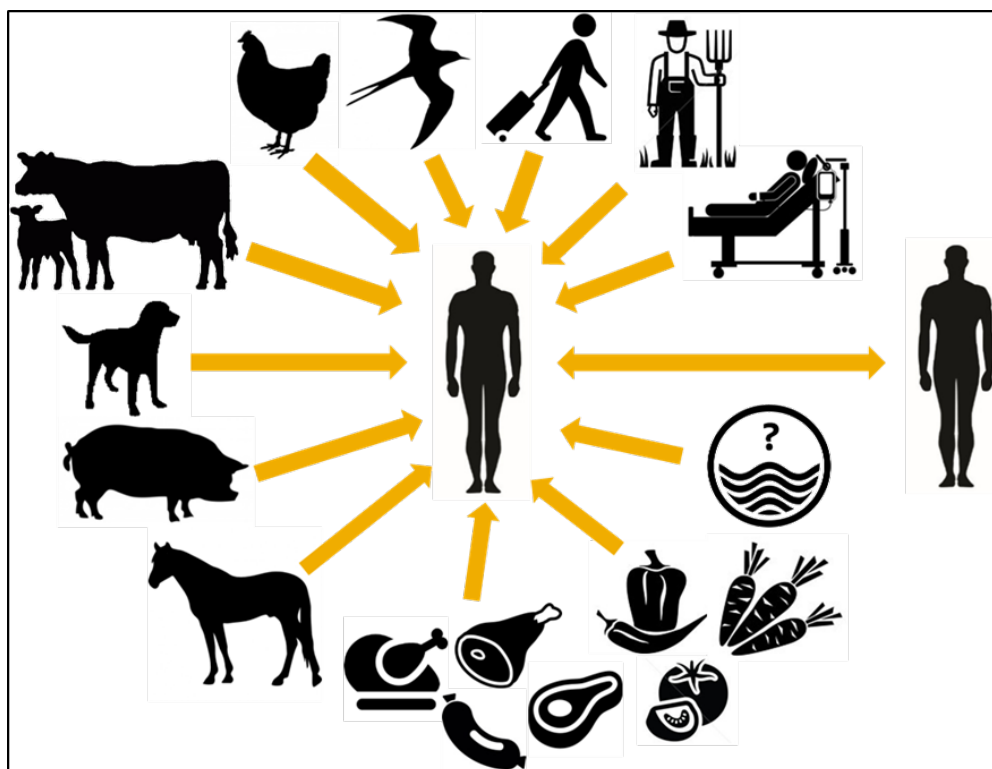
deze methode te analyseren, maar niet geëxploreerd. Het direct vertalen van de resultaten in attributie bleek lastiger dan verwacht doordat transmissie uit allerlei verschillende reservoirs kan plaatsvinden in verschillende richtingen. Daardoor is het moeilijk om op basis van de beschikbare data specifieke transmissieroutes met deze methode te kwantificeren. Een goede analyse van de attributie met deze methode is op dit moment slechts beperkt mogelijk (De Koeijer et al., 2014)

Binnen ESBLAT bediscussieerde modellen

Een methode die verder wordt uitgewerkt, is het gebruik van het attributie-model gebaseerd op typeringsgegevens van ESBLs en blootstellingsgegevens, waarbij de mens zelf ook als bron voor attributie wordt meegenomen in de berekeningen (figuur 5.3.4.). Dit is een vereenvoudiging van de realiteit omdat de mens zelf ook een bron is voor transmissie naar alle andere reservoirs. Daarnaast kan de humane populatie worden onderverdeeld in populaties met een verschillende kans op besmetting, zoals reizigers of veehouders die zich onderscheiden van de algemene bevolking. Dit model doet recht aan de *one health*-problematiek van ESBLs zoals bleek in de similariteitsanalyse (paragraaf 5.1.) waarbij op basis van genetische overeenkomsten een sterke indicatie wordt verkregen over verbanden tussen ESBLs in verschillende reservoirs.

Bij het toepassen van dit gemodificeerde model in zijn meest eenvoudige vorm, blijkt de mens zelf de belangrijkste bron van infectie voor de mens en dragen alle andere reservoirs in veel mindere mate bij. De mate van bijdrage wordt sterk bepaald door de ESBL-variant. De klassieke mens-gerelateerde CTX-M-15 is voor het overgrote deel van mensen afkomstig, terwijl voor wat in het verleden Poultry Associated ESBLs werden genoemd, waaronder CTX-M-1, TEM-52, CMY-2 en nu ook SHV-12, alle reservoirs inclusief de mens een bijdrage hebben. Dit geldt zowel voor alle diersoorten uit de veehouderij, de voedselketen, het milieu en huisdieren. Dit model bevat nog veel onzekerheden over aannames die kunnen worden gedaan over de blootstelling van de mens aan ESBLs vanuit verschillende bronnen en de dynamiek daarin. Er zijn meer longitudinale waarnemingen nodig om deze modellen beter te kunnen specificeren en van beter input te kunnen voorzien.

Figuur 4.3.2. Bron-attributie model waarbij de mens ook als bron is opgenomen voor de mens.
(met dank aan L. Mughini Gras, 2017)



Literatuur

- Cantón R, Coque TM. The CTX-M beta-lactamase pandemic. *Curr Opin Microbiol.* 2006 Oct;9(5):466-75. Epub 2006 Aug 30. Review.
- Pitout JD. Recent changes in the epidemiology and management of extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae. *F1000 Med Rep.* 2009 Nov 16;1.
- Ruppé E, Andremont A, Armand-Lefèvre L. Digestive tract colonization by multidrug-resistant Enterobacteriaceae in travellers: An update. *Travel Med Infect Dis.* 2017 Nov 17.
- Pitout JD. Enterobacteriaceae that produce extended-spectrum β -lactamases and AmpC β -lactamases in the community: the tip of the iceberg? *Curr Pharm Des.* 2013;19(2):257-63. Review.
- Ewers C, Bethe A, Semmler T, Guenther S, Wieler LH. Extended-spectrum β -lactamase-producing and AmpC-producing *Escherichia coli* from livestock and companion animals, and their putative impact on public health: a global perspective. *Clin Microbiol Infect.* 2012 Jul;18(7):646-55.
- Mughini-Gras L, van Pelt W. Salmonella source attribution based on microbial subtyping: does including data on food consumption matter? *Int J Food Microbiol.* 2014 Nov 17;191:109-15.
- RIVM-rapport Aline de Koeijer
- MARAN-2017. Monitoring of Antimicrobial Resistance and Antibiotic Usage in 2016. Veldman et al.
- Dohmen W*, Dorado-Garcia A*, MJM Bonten, JA Wagenaar, Mevius D, Heederik DJJ. Farm management practices associated with ESBL-producing *Escherichia coli* in pigs: a longitudinal study in the context of reduced use of antimicrobials. *PLOS ONE.* 2017 12(3): e0174094.
- de Koeijer AA, Evers EE, Koningstein M, van Duijkeren E. Framework voor risk assessment en bron-attributie van antibioticumresistentie-factoren. RIVM rapport 2014

4.4 Discussie

De wereldwijde verspreiding van ESBLs buiten ziekenhuizen, in de dierhouderij en het milieu is na 2000 op gang gekomen. Daarna is het in een stroomversnelling geraakt door toename van antibioticagebruik bij dieren en mens dat niet altijd gebeurde uit oogpunt van dierenwelzijn of bewezen gezondheidsbevordering. Ook de toegenomen mobiliteit van personen, globalisering van handel met complexe internationale dierlijke productieketens en besmetting van het milieu via rioolwater en dierlijke mest, droegen hieraan bij. Op basis van de verschillen in ESBL-soorten die bij mensen, dieren en in het milieu voorkomen, lijkt er sprake van een evolutie die in verschillende reservoirs min of meer synchroon is verlopen. Die ontwikkeling kent een gedeeltelijke overlap maar heeft voor een belangrijk deel ook gescheiden plaatsgevonden. Er zijn ook overeenkomsten in ESBL-soorten tussen deze reservoirs waargenomen, die bepaald zullen zijn door een continu proces van uitwisseling. Details van de dynamiek van alle (deel)processen worden maar in beperkte mate begrepen.

In deze studie zijn prevalentie en genetische gegevens van ESBLs verzameld tussen 2005-2015 in 22 verschillende Nederlandse reservoirs. Dit betrof naast patiënten in ziekenhuizen en huisartsenpraktijken, de algemene bevolking, veehouders, dierlijke reservoirs (varkens, kippen, rundvee, kalveren, huisdieren en wilde vogels), vlees van verschillende diersoorten en milieumonsters uit recreatiewater. Dat ESBLs in alle onderzochte reservoirs voorkwamen met deels overlappende verdelingen van genetische varianten, laat zien dat ESBLs een typische *one health*-problematiek is van mens, dier en milieu samen.

De hoogste prevalentie ESBLs werd gezien in pluimveebedrijven, op pluimveevlees en in oppervlaktewater. Kwantitatieve microbiologische risicoanalyses voor zwemmers en consumenten van vlees laten zien dat het aantal ESBL-bacteriën dat de consument binnen krijgt door het eten van vlees laag is. Dit geldt ook voor de blootstelling van de Nederlandse bevolking via zwemmen in recreatiewater. Ook omwonenden van veehouderijbedrijven hadden geen verhoogde kans op dragerschap.

Beroepsmatige blootstelling door direct contact met besmet vee is wel geassocieerd met een verhoogde kans op dragerschap. Dit betreft echter een relatief klein aantal mensen. Het is niet bekend hoe lang deze mensen drager blijven, of deze mensen meer kans hebben op infecties door een ESBL dan de gemiddelde Nederlander en of zij bijdragen aan de verspreiding naar mensen buiten het eigen huishouden of naar dieren.

De ESBL-soorten in veehouders vertonen een sterke gelijkenis met die van het eigen vee en verschillen van die van anderen bevolkingsgroepen. Samen met de hogere prevalentie bij veehouders suggereert dit dat contact met vee de meest waarschijnlijk transmissieroute is.

ESBLs uit de verschillende humane reservoirs (algemene bevolking en patiënten) vertonen onderling grote genetische overeenkomsten. Dit suggereert dat er transmissie is tussen mensen in de algemene bevolking en patiënten. Dit komt overeen met de conclusies van het recent uitgebrachte ECDC/EFSA/EMA-rapport¹ waarbij voor ESBLs in *E. coli* de mens zelf en vooral het gebruik van cefalosporines door de mens in de gezondheidszorg als de belangrijkste oorzaak werd genoemd.

De ESBL-soorten van honden leken zowel op die van mensen als die van de veehouderij. Dit is deels te verklaren door het intensieve contact van de hond met zijn eigenaar, maar deels ook door het eten van besmet verse of rauwe vleesproducten en deels door het uitwisselen van ESBLs tussen honden via intensief onderling contact. Of direct contact met gezelschapsdieren ook leidt tot een hogere kans op dragerschap bij mensen is binnen ESBLAT niet aangetoond.

Dragerschap in de algemene bevolking kan een bron zijn voor infecties in de gezondheidszorg, maar ook kunnen mensen na het doormaken van een infectie in het ziekenhuis of in de huisartsenpraktijk, ESBLs overdragen aan andere mensen. Gegevens uit de literatuur en ook het eigen onderzoek laten zien dat zowel reizen naar, als hospitalisatie in het buitenland een belangrijke risicofactor is voor ESBL-dragerschap van mensen.

Ten opzichte van de humane populaties waren de genetische overeenkomsten van ESBLs uit de veehouderij-gerelateerde bronnen beduidend lager. Dit suggereert dat dierlijke bronnen, met inbegrip van pluimvee en vlees van pluimvee, een relatief kleine bijdrage leveren aan ESBLs die voorkomen bij de mens in vergelijking met de bijdrage van humane bronnen.

De genetische overeenkomsten van ESBLs uit oppervlakte-, en afvalwater en wilde vogels bleken meer vergelijkbaar met die van de mens, maar in deze reservoirs werden ook ESBL-soorten gevonden die vaker in dierlijke reservoirs voorkomen. De gevonden overeenkomst in ESBL-soorten tussen de mens en oppervlaktewater wordt veroorzaakt door invloed van afvalwater uit het riool op het oppervlaktewater. De onderzochte wilde vogels (weide-, en watervogels) worden waarschijnlijk via het oppervlaktewater besmet. Het milieu is dus een reservoir waarin verschillende soorten ESBLs uit het riool, maar ook uit dierlijke mest samenkomen. Deze ESBLs kunnen vervolgens weer een potentiële bron vormen voor de mens. Ondanks het veelvuldig voorkomen van ESBLs in recreatiewater en in delen van de voedselketen bleek de blootstelling laag bij mensen die zwemmen en vlees consumeren. Er zijn geen aanwijzingen dat deze blootstelling aan ESBLs leidt tot een verhoogde kans op dragerschap in de algemene bevolking. Wonen in de nabijheid van veehouderijbedrijven was geen risicofactor voor het dragerschap van ESBLs.

Het oppervlaktewater en de veehouderij lijken dus kwantitatief niet een belangrijke bron voor de ESBLs bij de mens te zijn. Echter het zijn erg grote reservoirs, waar een constante verdere evolutie van ESBLs kan plaatsvinden, wat een potentieel risico geeft voor het ontstaan van nieuwe gen/plasmid/stam combinaties die zich vervolgens kunnen verspreiden in humane of dierlijke populaties. Bovendien is er een constant blootstellingsrisico vanuit deze reservoirs, wat met name geldt voor besmette voedingsmiddelen.

4.5 Conclusies

Er is sprake van een groot aantal reservoirs van waaruit blootstelling van en verspreiding naar de mens kan plaatsvinden. De mens zelf lijkt daarbij de belangrijkste bron voor besmetting van de mens. De dierhouderij en het milieu dragen hier slechts beperkt aan bij. Effectieve infectiecontrole en verantwoord antibioticagebruik (*antibiotic stewardship*) in de gezondheidszorg en de diergeneeskunde blijven van belang om verspreiding van ESBLs te voorkomen.

Dat ESBLs in alle reservoirs zijn aangetroffen en genetische overeenkomsten vertonen, geeft aan dat mens, dier en natuur onderling verbonden zijn en geeft de problematiek een typisch *one-health*-karakter. Het onderzoek binnen het ESBLAT-consortium betrof dan ook een unieke samenwerking van experts uit het humane, veterinaire en milieudomein, en dit was noodzakelijk om humane blootstellings- en

¹ ECDC/EFSA/EMA rapport second joint report on the integrated analysis of the consumption of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from humans and food-producing animals, June 2017, doi: 10.2903/j.efsa.2017.4872

gezondheidsrisico's te kunnen onderzoeken en kwantificeren. Deze samenwerking heeft geleid tot belangrijke nieuwe inzichten in het vóórkomen en de verspreiding van ESBLs. Desondanks zijn er nog onzekerheden rond de ESBL-epidemiologie. Deze betreffen met name de overdracht van EBSL vanuit verschillende reservoirs via allerlei verschillende routes naar de mens.

De ESBL-problematiek is zeer dynamisch van aard en vergt daarom continue aandacht in alle domeinen. Hoewel de directe bijdrage vanuit de voedselketen en het oppervlaktewater op dit moment gering lijkt te zijn, zijn het wel zeer grote reservoirs die altijd een bron van blootstelling en verspreiding kunnen zijn. Surveillance van ESBLs in de verschillende reservoirs is daarom cruciaal om veranderingen in de dynamiek tijdig te herkennen. Om de resterende onzekerheden in de dynamiek te verkleinen is er behoefte aan aanvullende (longitudinale) studies in een aantal reservoirs, teneinde betere input voor verder te ontwikkelen attributie- en transmissiemodellen te genereren.

5 Appendix

5.1 Gebruikte microbiologische methodes

Voorwaarde voor de methode was dat deze voldoende gevoelig is en specifiek waren voor het detecteren van ESBL-producerende organismen. Dat voorkomt een hoop overbodige en dure moleculaire identificatie en typeringsmethodes.

Selectieve kweek

Voor het vaststellen van prevalenties per bron werd een selectieve ophoping gebruikt. Dit is een vereiste voor laag besmette milieus. Hiervoor werd LB-bouillon met 1 mg/L cefotaxim (LB+) gebruikt.

Het medium waarop deze bouillon werd afgeënt was MacConkey agar met 1 mg/L cefotaxim (Mac+) als selectief/electief medium voor ESBL-producerende *E. coli*.

Per Mac+-plaat werd van 5 kolonies met verschillende morfologie met de MALDI-TOF vastgesteld tot welke species ze behoren. Per monster werd één *E. coli* en indien aanwezig één *K. pneumoniae* en één *Enterobacter cloacae* complex reingekweekt op een niet selectieve plaat en bewaard als suspensie in pepton glycerol (of microbank) bij -80°C.

Kwantitatieve kweek

Voor een selectie van de monsters werd een kwantitatieve analyse gedaan van de aantallen aanwezige ESBL-producerende organismen, door een semi kwantitatieve telling te doen met de 'running drop' methode.

Hiervoor werd een tienvoudige verdunning gemaakt van een faecessuspensie. Vanuit ieder verdunning wordt met behulp van een multichannel pipet 10 µl op een vierkante TBX (Biorad of Oxoid) plaat met en zonder 1 mg/L cefotaxim geënt. De platen werden tijdens het beënten onder een hoek van 45° geplaatst zodat de druppels over de agar liepen. Het kiemgetal werd bepaald door de hoogste verdunning waarin nog groei zichtbaar is. De fractie ESBL-producerende organismen werd bepaald door de resultaten op elkaar te delen. Resultaten werden geregistreerd als KVE/g. De detectielimiet was 100 KVE/g.

Kip en kalkoen

25 g vlees werd verdund in 225 ml BPW en gehomogeniseerd. Dit homogenaat werd tienvoudig verdund en vervolgens werden monsters van 500 µl (in duplo) van de verdunningen 10^{-1} - 10^{-3} geënt op MacC+ agar. Dit resulteerde in detectielimieten van 10 - 100 KVE/g monster, afhankelijk van de verdunning die gebruikt werd om te kwantificeren.

Milieumonsters

Voor milieumonsters werden identieke kweekmethoden gebruikt waar mogelijk (i.e. voor bodemonsters en gefiltreerde watermonsters). Daarnaast werd onderzocht of standaardmedia voor water en selectievere media voor bodem de specificiteit verbeteren. In luchtmonsters (filters) wordt kweekbaarheid van *E. coli* door de monsternamen negatief beïnvloed. Daarom worden naast een evaluatie van verschillende luchtmonstermethodieken voor kweek ook moleculaire analyses (qPCR op de meest voorkomende ESBL-genen) ingezet. Deze hebben echter een hogere detectielimiet dan kweekmethoden. Om de prevalentie in monsters met lage aantallen vast te stellen, werden MPN-technieken (kiemtellingen) ingezet op TBX medium.

Moleculaire methodes:

Gendetectie kon op verschillende manieren worden uitgevoerd.

1. PCR gericht op CTX-M familie. Deze komt het meest frequent voor. Negatieve isolaten breed screenen op voorkomende beta-lactamasen met multiplex PCR of met een commerciële micro-array (Check-Points CP101 - 103)
2. Direct screenen met multiplex PCR op de genoemde genfamilies
3. Direct screenen met een commerciële array (Check-Points CP101 - 103).

Identificatie van de ESBL-variant tot op enzym niveau (bv CTX-M1, of CTX-M-15) is altijd uitgevoerd met specifieke primers en sequentie-analyse. Een tabel met primers voor verschillende genen is tussen de partijen uitgewisseld ter harmonisatie van de resultaten.

Aanvullende typering voor moleculair epidemiologisch onderzoek:

In selecties van isolaten met identieke ESBL/AmpC-genen op enzym niveau zijn de plasmiden waarop de ESBL/AmpCs zijn gelegen getypeerd. De grootte en het replicontype werd vastgesteld na transformatie in competente cellen. Aanvullende typering waren afhankelijk van het plasmid type: pMLST, RST, sequentie analyse, eventueel als onderdeel van whole genome sequencing. Standaardprotocollen voor plasmid typering en nadere karakterisering zijn gedeeld tussen de betrokken laboratoria. Selecties van bacteriële isolaten uit verschillende reservoirs zijn vergeleken met sequence based genotyperingstechnieken zoals MLST en deels ook door whole genome sequencing.

5.2 ESBLs in mensen in Nederland

ESBL producerende bacteriën vormen een bedreiging voor mensen wanneer er sprake is van een infectie. Om die reden is het belangrijk om te weten hoe hoog de prevalentie van deze bacterie is bij mensen, zowel wanneer ze opgenomen zijn in een ziekenhuis, een huisarts bezoeken, als ook de mensen die (schijnbaar) gezond in de gemeenschap leven.

5.2.1 Gezin & Gezondheid studie

Van april 2013 tot januari 2015 zijn er maandelijks 2000 kinderen onder de leeftijd van vier jaar oud random geselecteerd vanuit de Nederlandse Basisregistratie Personen (BRP) en werden ouders gevraagd om mee te doen met het invullen van een vragenlijst en het versturen van een feces monster van het geselecteerde kind en één van de ouders. Deze monsters werden onderzocht op de aanwezigheid van ESBL/AmpC producerende bacteriën en vervolgens werden er risicofactoren bepaald en is er gekeken naar co-dragerschap in ouders en kinderen die tot hetzelfde huishouden behoorden. In totaal zijn er 1016 families geïncludeerd en waren er 80 positieve individuen. De prevalentie voor de groep als geheel was 4,0% (95% CI: 3,2%–5,0%). Er waren 35 kinderen positief (3,5%, 95% CI: 2,5%–4,8 en 45 ouders (4,5%, 95% CI: 3,4%–6,0%). De gecorrigeerde prevalentie per groep is te vinden in Tabel 5.2.1. Het meest prevalentie genotype was CTX-M-15 in beide groepen (zie Tabel 5.2.2.).

Tabel 5.2.1. De gecorrigeerde prevalentie in kinderen en ouders

Kinderen		Ouders	
Variabele	Prevalentie (95% CI)	Variabele	Prevalentie (95% CI)
Sociaal Economische Status (SES)		Sociaal Economische Status (SES)	
laag	4,9 (2,7-7,2)	laag	4,0 (2,0-6,1)
gemiddeld	2,7 (0,9-4,5)	gemiddeld	4,5 (2,2-6,8)
hoog	2,5 (0,6-0,4)	hoog	5,0 (2,4-7,5)
Urbanisatiegraad		Urbanisatiegraad	
stedelijk	3,0 (0,3-0,6)	stedelijk	3,8 (0,7-6,7)
gemiddeld	3,5 (2,1-5,0)	gemiddeld	4,8 (3,1-6,5)
landelijk	3,8 (0,9-6,6)	landelijk	4,0 (1,4-6,7)
Leeftijd		leeftijd	
≤12 maanden	3,0 (0,4-5,6)	≤30	3,5 (0,5-6,5)
13-36 maanden	4,0 (2,4-5,6)	31-34	5,1 (2,6-7,7)
37-48 maanden	2,4 (0,5-4,5)	35-37	4,4 (1,9-7,0)
>48 maanden	5,0 (0,0-14,6)	>38	4,3 (2,0-6,6)
Gaat naar kinderdagverblijf		Kinderen die een kinderdagverblijf bezoeken	
ja	4,5 (2,8-6,4)	Nee	2,8 (1,2-4,4)
nee	2,2 (0,8-3,6)	1 of meer	5,8 (3,8-7,7)
Geboorteland		Geboorteland	
Niet Nederland	9,1 (0,0-19,1)	Niet Nederland	8,8 (0,0-18,4)
Nederland	3,3 (2,2-4,4)	Nederland	4,3 (3,0-5,6)

Tabel 5.2.2. De ESBL-genotypen (%) gevonden in kinderen en hun ouders

ESBL-genotypen gevonden in kinderen en hun ouders		
Genotype	Kinderen (%)	Ouders (%)
CTX-M-15	27,8	34,0
SHV-12	13,9	6,4
CMY-2	11,1	4,3
CTX-M-14	11,1	12,8
CTX-M-1	8,3	17,0
CTX-M-3	8,3	6,4
CTX-M-14b	5,6	2,1
CTX-M-24	2,8	
CTX-M-27	2,8	8,5
TEM-52var	2,8	
TEM-52c	2,8	2,1
DHA-1	2,8	2,1
CTX-M-14var		2,1
CTX-M-2		2,1

Naar een kinderdagverblijf gaan was een risicofactor voor dragerschap bij kinderen en het hebben van één of meer kinderen die een kinderdagverblijf bezochten in het huishouden was een risicofactor voor de ouders. Co-dragerschap van ESBL producerende bacteriën kwam vaker voor dan verwacht op basis van kans.

Literatuur

- van den Bunt G, Liakopoulos A, Mevius DJ, Geurts Y, Fluit AC, Bonten MJ, Mughini-Gras L, van Pelt W. ESBL/AmpC-producing Enterobacteriaceae in households with children of preschool age: prevalence, risk factors and co-carriage. *J. Antimicrob. Chemother.* 72, 589–595 (2017) doi: 10.1093/jac/dkw443.

5.2.2 ESBLAT populatiestudie

Van November 2014 tot November 2016 zijn er in Nederland maandelijks vanuit het BRP random ~2000 participanten uit alle leeftijdsgroepen geselecteerd en uitgenodigd om een online vragenlijst in te vullen. In deze vragenlijst werd ook gevraagd of de deelnemer een feces monster in zou willen sturen, en zo ja, werd er een verzamelingskit opgestuurd samen met een extra aanvullende vragenlijst. Wanneer de participant ook een hond of kat had, werd gevraagd of men ook een feces monster in zou willen sturen van één van deze honden of katten. Een deel van de mensen werd gevraagd om na 1 maand en na 6 maanden ten opzichte van de eerste meting nogmaals mee te doen aan de studie, om zo iets te kunnen zeggen over dragerschap over tijd (Zie figuur 5.2.1). Daarnaast werden, om het type ESBL en de verwantschap tussen isolaten van dragers in de open populatie vast te stellen, van alle isolaten de complete genetische samenstelling bepaald.

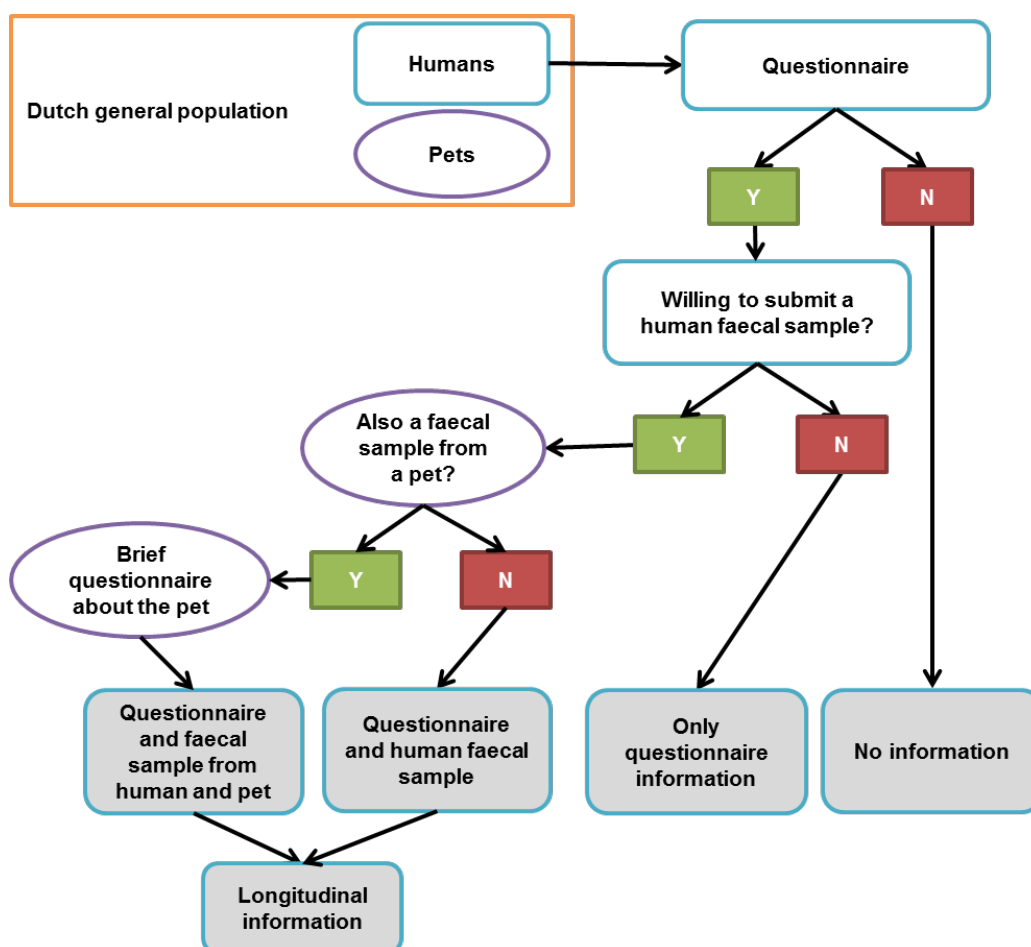
Er werden gedurende twee jaar tijd 4177 fecale monsters van mensen verzameld (vanuit de dwarsdoorsnede van deze studie). Hiervan bleken er 186 positief te zijn voor ESBL producerende bacteriën (4,5%, 95%CI: 3,9%-5,2%). We vonden geen significant verschil in prevalentie tussen de verschillende Nederlandse provincies. Een selectie van de beschrijvende statistiek is te vinden in Tabel 5.2.3.

Vanuit univariate analyses blijkt dat de volgende karakteristieke risicofactoren zijn (zie Tabel 5.2.3):

- 1) het niet dagelijks verwisselen van de keukenhanddoek,
- 2) vaker dan 20 keer per jaar uit eten gaan,
- 3) het zwemmen in open zout (zee/oceaan) water,
- 4) antibioticagebruik in het afgelopen half jaar,

5) niet in Nederland geboren zijn,
 6) in het buitenland geweest zijn in de afgelopen 4 weken,
 Van deze zes risicofactoren zijn alleen het gebruik van antibiotica en reizen bekende risicofactoren vanuit de literatuur. De overige risicofactoren zijn nieuw, maar moeten nog wel verder onderzocht worden in multivariate modellen.

Figuur 5.2.1. Flowchart van de dataverzameling van de ESBLAT populatiestudie. Mensen werden random geselecteerd vanuit het BRP en ook gevraagd deel te nemen met een hond of kat (indien aanwezig in het huishouden). Een deel van de mensen werd ook gevraagd deel te nemen aan een longitudinale studie.



Tabel 5.2.3. Selectie van de beschrijvende statistiek

Variabele	categorieën	ESBL negatief 3991; n (%)	ESBL positief 186; n (%)
geslacht	man	1805 (45,2)	94 (50,8)
	vrouw	2186 (54,8)	91 (49,2)
geboorteland	Nederland	3865 (96,8)	172 (93,0)
	niet Nederland	126 (3,2)	13 (7,0)
leeftijd	0-4	173 (4,3)	7 (3,8)
	5-12	274 (6,9)	9 (4,9)
	13-19	136 (3,4)	7 (3,8)
	20-39	501 (12,6)	20 (10,9)
	40-64	1738 (43,5)	90 (48,9)
	65-79	1025 (25,7)	46 (25,0)
	80-Inf	144 (3,6)	5 (2,7)
Sociaal Economische Status	hoog	874 (22,0)	51 (27,9)
	gemiddeld	2231 (56,2)	94 (51,4)
	laag	865 (21,8)	38 (20,8)
urbanisatiegraad	1	214 (5,4)	11 (5,9)
	2	591 (14,8)	34 (18,4)
	3	771 (19,3)	43 (23,2)
	4	1120 (28,1)	46 (24,9)
	5	1295 (32,4)	51 (27,6)
opleidingsniveau	hoog	1448 (37,1)	84 (47,2)
	laag	610 (15,6)	27 (15,2)
	gemiddeld	1850 (47,3)	67 (37,6)
vervangen van keukenhanddoek	elke dag	947 (24,2)	23 (12,6)
	niet iedere dag	2973 (75,8)	159 (87,4)
in een restaurant eten	meer dan 20 keer	398 (10,1)	33 (18,0)
	minder dan 20 keer	3548 (89,9)	150 (82,0)
gezwommen in zout (zee/oceaan) water in de afgelopen 12 maanden	ja	1353 (37,6)	80 (48,5)
	nee	2243 (62,4)	85 (51,5)
antibioticagebruik	<6 maanden	422 (11,2)	28 (16,5)
	>12 maanden	2511 (66,6)	114 (67,1)
	6-12 maanden	291 (7,7)	13 (7,6)
opname in een ziekenhuis in de afgelopen 12 maanden	nooit	549 (14,6)	15 (8,8)
	ja	315 (8,0)	19 (10,4)
gebruik van maagbeschermers (Proton Pump Inhibitors (PPIs) in de afgelopen 6 maanden	nee	3635 (92,0)	163 (89,6)
	ja	614 (15,7)	36 (20,0)
	nee	3305 (84,3)	144 (80,0)

In het buitenland geweest in de afgelopen 4 weken	Ja	720 (20,3)	45 (27,8)
	Nee	2831 (79,7)	117 (72,2)
Minstens 1 kind in het huishouden gaat naar een kinderdagverblijf	Ja	243 (7,6)	14 (9,5)
	Nee	2942 (92,4)	134 (90,5)

Tabel 5.2.4. Univariate analyses (logistische regressie)

	Odd Ratio (OR)	95% Confidence Interval (95% CI)
geslacht (man)	1,25	0,93 – 1,68
geboorteland (niet Nederland)	2,32	1,23 – 4,04
leeftijd		
0-4	ref	
5-12	0,81	0,30 – 2,31
13-19	1,3	0,43 – 3,80
20-39	1	0,43 – 2,55
40-64	1,28	0,63 – 3,08
65-79	1,11	0,52 – 2,73
>80	0,86	0,25 – 2,75
Sociaal Economische Status (SES)		
laag	ref	
gemiddeld	0,96	0,66 – 1,42
hoog	1,33	0,87 – 2,10
urbanisatiegraad		
1	ref	
2	1,12	0,57 – 2,35
3	1,09	0,57 – 2,25
4	0,8	0,42 – 1,65
5	0,77	0,41 – 1,57
opleidingsniveau		
laag	ref	
gemiddeld	0,82	0,52 – 1,31
hoog	1,31	0,85 – 2,08
vervangen van keukenhanddoek (niet iedere dag)	2,2	1,44 – 3,52
in een restaurant eten	1,96	1,31 – 2,86
gezwommen in zout (zee/oceaan) water in de afgelopen 12 maanden	1,56	1,14 – 2,13
antibioticagebruik		
nooit	ref	
<6 maanden	2,43	1,30 – 4,72
6-12 maanden	1,64	0,76 – 3,49

> 12 maanden	1,66	0,99	–	2,99
opname in een ziekenhuis in de afgelopen 12 maanden	1,35	0,80	–	2,14
gebruik van maagbeschermers (Proton Pump Inhibitors (PPIs) in de afgelopen 6 maanden	1,35	0,91	–	1,94
In het buitenland geweest in de afgelopen 4 weken	1,51	1,05	–	2,14
Minstens 1 kind in het huishouden gaat naar een kinderdagverblijf	1,26	0,69	–	2,15

De complete genetische samenstelling van alle isolaten (voornamelijk *E. coli*) werd bepaald en bijna de helft van de isolaten codeerde voor een CTX-M-15 ESBL (n=86; 45%) waaronder negen van de tien *Klebsiella pneumoniae* isolaten en beide isolaten die tot het *Enterobacter cloacae* complex behoren. Andere veel voorkomende typen zijn CTX-M-1, CTX-M-14 (beide n=30; 16%), CTX-M-27 (n=28; 15%). Er werden verder nog drie andere CTX-M-type ESBLs gevonden: CTX-M-3 (n=7), CTX-M-32 (n=1) en CTX-M-55 (n=4). Bij respectievelijk vier en twee isolaten was SHV-12 en TEM-52c aanwezig. Eén isolaat codeerde voor twee ESBLs CTX-M14 en CTX-M-27). Vastgesteld kan worden dat het aantal ESBL typen in de open populatie beperkt is en dat slechts vier typen verantwoordelijk zijn voor meer dan 90% van de ESBL positieve isolaten.

De *E. coli* isolaten behoorden tot 75 verschillende Sequence Typen (STs). ST131 kwam het meest frequent voor (n=40; 21%), gevolgd door ST38 (n=22; 12%), en ST10 (n=13; 7%). Vijf en vijftig STs werden vertegenwoordigd door slechts één isolaat en de STs van zes isolaten waren nog niet eerder beschreven. Opvallend is dat slechts drie STs 40% van de isolaten vertegenwoordigen en dat 55 STs maar met één isolaat vertegenwoordigd zijn. ST131 is een type dat ook veel voorkomt in ziekenhuizen en waarvan gedacht wordt dat dit type *E. coli* meer pathogeen voor de mens is, maar de bewijzen zijn tegenstrijdig. Wel kan geconcludeerd worden dat dit type een uitstekende kolonisator van de mens is.

Verder ontvingen we 551 fecale monsters afkomstig van honden, waarvan er 59 ESBL positief bleken te zijn (10,7%, 95%CI: 8,3%-13,7%). Met name het eten van rauw vlees is een risicofactor voor ESBL dragerschap in honden en ook of de hond in een dierenkliniek is geweest in de 4 weken voor de afname van het monster. Co-dragerschap in mens en hond behorend tot hetzelfde huishouden werd geobserveerd in 9 huishoudens. Daarnaast werden er 283 monsters van katten verzameld, waarvan 4 positief getest werden (1,4%, 95%CI: 0,5%-3,8%). Doordat er weinig katten positief waren, was het niet mogelijk om naar risicofactoren te kijken.

Literatuur

-Preliminair onderzoek (Bunt, G. van den *et al.*)

5.2.3 Omwonenden van veehouderijbedrijven

In Nederland is als onderdeel van het zogenaamde Veehouderij en Gezondheid Omwonenden (VGO)-onderzoek van RIVM, IRAS, WBVR en NIVEL een studie uitgevoerd naar de prevalentie van ESBLs in de open bevolking in een vee-dicht gebied. Veehouders en hun gezinsleden waren uitgesloten van deelname. De doelstelling was om te onderzoeken of mensen die in de omgeving van veehouderijen wonen vaker drager zijn van ESBLs ten opzichte van de algemene bevolking in Nederland., hetgeen een indicatie zou kunnen zijn voor overdracht via het milieu. Daartoe werd een cross-sectionele studie werd uitgevoerd onder 2432 volwassenen (in de leeftijd van 20-72 jaar) in 12 tijdelijke onderzoekscentra in het zuiden van Nederland. Deelnemers kregen een vragenlijst toegestuurd en aan hen werd gevraagd om een ontlastingsmonster op te sturen. Risicofactoren werden geanalyseerd met behulp van logistische regressie.

De prevalentie van ESBLs was 4,5% (109/2432; 95% CI 3,7-5,4), variërend van 1,4% tot 10,9% tussen de onderzochte centra. In de meeste gevallen werd er een ESBL/pAmpC-producerende *E. coli* gevonden, maar zeven keer betrof het een *K. pneumoniae*. De meest voorkomende ESBL soorten waren CTX-M-15 (gevonden bij 46 personen), CTX-M-14/17 (19 personen) en CTX-M-1 (13 personen). In de multivariate logistische regressieanalyse werden de volgende risicofactoren gevonden voor ESBL-dragerschap: reizen in de voorafgaande 12 maanden naar Afrika, Azië of Latijns-Amerika (OR 2,82, 95% BI 1,71-4,63), het hobbymatig houden van koeien in de voorafgaande 5 jaar (OR 3,77, 95% CI 1,22-11,64), het gebruik van maagzuurremmers (OR 1,84, 95% CI 1,05-3,23) en woonachtig zijn binnen 1000 m van een nertsenboerderij

(OR 2,26, 95% CI 1,28-3,98) .Er werd geen consistent verband gevonden voor de relatie tussen ESBL-dragerschap en de aanwezigheid van vee (inclusief pluimvee) en veehouderijen.

De algemene conclusie was dat leven in de nabijheid van veehouderijbedrijven geen risicofactor is voor het dragerschap van ESBLs bij omwonenden.

Literatuur

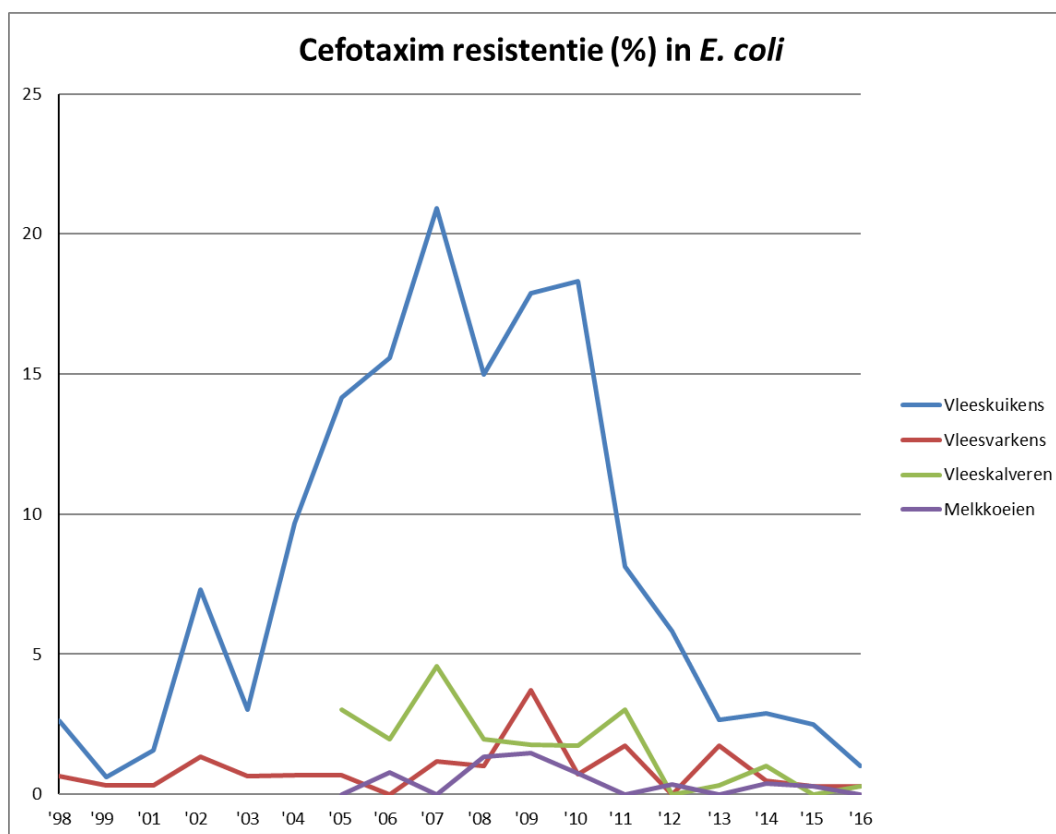
- Wielders CCH, van Hoek AHAM, Hengeveld PD, Veenman C, Dierikx CM, Zomer TP, Smit LAM, van der Hoek W, Heederik DJ, de Greeff SC, Maassen CBM, van Duijkeren E. Extended-spectrum β -lactamase- and pAmpC-producing Enterobacteriaceae among the general population in a livestock-dense area. Clin Microbiol Infect. 2017 Feb;23(2):120.e1-120.e8.

5.3 ESBLs in landbouwhuisdieren en vlees (gegevens uit MARAN-2017).

5.3.1 Percentage ESBLs als deel van willekeurig gekweekte *E. coli*

AMR monitoring in willekeurig gekweekte *E. coli* levert informatie op over het percentage van deze stammen dat resistent is tegen antibiotica, waaronder de cefalosporines. In Nederland worden conform de richtlijnen van het Europese VoedselAgentschap (EFSA) jaarlijks minimaal 170 *E. coli*'s gekweekt uit de mest per diersoort (melkkoeien, vleeskalveren, vleesvarkens en vleeskuikens en soms andere diersoorten als legkippen, eenden en kalkoenen). Iedere *E. coli* komt uit een dier van een verschillende koppel aangevoerd op het slachthuis of bedrijf. Deze isolaten worden getest op gevoeligheid voor de cefalosporines: cefotaxim en ceftazidim. Het resistentiepercentage van deze stammen worden bepaald op basis van door de European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) vastgestelde criteria (ECOFFs). Sinds 1998, werd cefotaxim resistentie in alle diersoorten incidenteel waargenomen. Figuur 5.3.1 geeft het percentage cefotaxim resistentie weer van willekeurige gekweekte *E. coli* uit de mest van vleeskuikens, vleesvarkens (1998 – 2016), vleeskalveren en melkkoeien (2005-2016). In vleeskuikens werd na 2003 een duidelijke toename gezien van resistentie tegen cefotaxim tot een niveau van 15 – 20%, met een piek in 2007. Dit percentage daalde snel naar 2,7% in 2013 en 1% in 2016. De waarschijnlijke reden is dat het gebruik van cefalosporines in een deel van de broederijen in 2010 is gestopt en ook door de totale afname in antibioticumgebruik bij vleeskuikens.

Figuur 5.3.1. Percentages cefotaxim-resistentie *E. coli* uit de mest van landbouwhuisdieren van 1998 – 2016 (MARAN-2017).



Uit een totaal van 1492 in 2016 willekeurig gekweekte *E. coli*'s, waren er nog slechts vijf die minder gevoelig (MIC > 0,25 mg/L) waren voor cefotaxim. Drie kwamen uit vleeskuikens, één uit een vleesvarken en één uit een vleeskalf (tabel 5.3.1). Cefotaxim resistente isolaten werden gescreend op bèta-lactamase genen met behulp van PCR of de CT101-microarray (Check-Points, Wageningen). Vervolgens werden de genen geïdentificeerd door specifieke PCR en sequentieanalyse. Alle stammen die negatief waren in deze testen werden onderzocht op mutaties in de promotor van het chromosomale *ampC*-gen. In vleeskuikens werden drie

ESBL/AmpC's aangetoond, t.w.: CTX-M-1, TEM-52c en CMY-2. CTX-M-1 werd ook aangetroffen in een stam uit een rosé vleeskalf. Een mutatie in het chromosomale *ampC*-gen werd aangetoond in één van de varkens isolaten (*ampC*-type 18). Geconcludeerd kan worden dat na willekeurige *E. coli* kweek, slechts vier plasmide gemedieerde ESBL/AmpC genen werden gevonden in vijf van de 1492 onderzochte isolaten in 2016 (0,3%), het laagste percentage sinds 2007.

Tabel 5.3.1. ESBLs als percentage van het aantal willekeurig geïsoleerde *E. coli* (MARAN-2017).

Jaar	ESBLs uit					Gedetecteerde ESBL-genen												Totaal <i>E. coli</i> (n)	% ESBLs
	Vleeskuikens	Vleeskalveren	Vleesvarkens	Melkkoeien	Kalkoenen	CTX-M-1-groep#	CTX-M-2	CTX-M-9-groep	TEM-52c	TEM-20	SHV-12	SHV-2	CMY-2	chromosomaal <i>ampC</i> geen ESBL aangetoond					
2007	9	6	2	0	<i>n.t.</i>	3	1		3				1	2	7	539	1.9		
2008	66	4	3	2	<i>n.t.</i>	38	5	1	9			2	12	3	5	1026	6.8		
2009	53	2	11	2	<i>n.t.</i>	34	7		2	1	8	1	12	3		894	7.6		
2010	52	3	2	2	<i>n.t.</i>	21	6		5	1	9	4	5	3	5	1002	5.4		
2011	23	5	5	0	6	9			8		9	2	3	3	5	1096	3.1		
2012	26	2	0	1	<i>n.t.</i>	8			4		8		5		4	1328	1.9		
2013	13	1	4	0	<i>n.t.</i>	7			4		3		3	1		1371	1.3		
2014	11	3	2	0	<i>n.t.</i>	8			1		4			1	2	1519	0.9		
2015	10	0	1	1	<i>n.t.</i>	3		2	1		1		2	3		1283	0.9		
2016	3	1	1	0	<i>n.t.</i>	2			1				1	1		1492	0.3		
Totaal	266	27	31	8	6	133	19	3	38	2	42	9	44	20	28	11550	2.7		

5.3.2 Prevalentie van ESBLs in dieren

Vanaf 2014 werden mestmonsters verzameld van vleeskuikens en melkkoeien, selectief gekweekt op ESBLs. In varkens en kalveren liep dit al sinds in 2011. Screening werd gedaan door overnachting op verrijking door een kweek van 1 gram mest in 9 ml gebufferd pepton Water (BPW). Dit werd gevolgd door selectieve isolatie op MacConkey agar met 1 mg/L cefotaxim conform het EURL-AR protocol: <http://www.eurl-ar.eu/233-protocols.htm>. Dit resulteerde in 2016 in het screenen van 1500 mestmonsters.

Tabel 5.3.2. ESBL-prevalentie (%) in landbouwhuisdieren in 2016 (MARAN-2017)

	Aantal mestmonsters	Aantal ESBL verdachte stammen	Aantal ESBL bevestigde stammen	ESBL prevalentie (%)
Vleeskuikens	300	151	151	50.3
Legkippen	193	60	54	28.0
Eenden	100	13	13	13.0
Vleesvarkens	300	61	49	16.3
Vleeskalveren				
Blank	183	64	62	33.9
Rosé	122	35	35	28.7
Melkkoeien	302	46	40	13.2
Totaal	1500	430	404	26.9

Tabel 5.3.3. ESBLs gedetecteerd in de mest van landbouwhuisdieren in 2016 (MARAN-2017).

		Vleeskuikens	Legkippen	Eenden	Vleesvarkens	Vleeskalveren		Melk koeien	Totaal
						Blank	Rose		
CTX-M-1 groep	CTX-M-1	66	33	4	35	31	14	19	202
	CTX-M-15	3				15	5	7	30
	CTX-M-32					1	4	5	10
	CTX-M-55	2	2			1	1	1	7
CTX-M-2 groep	CTX-M-2				1	1		2	4
CTX-M-8/25 groep	CTX-M-8				1				1
	CTX-M-9						1		1
CTX-M-9 groep	CTX-M-14		3		3	2	6	2	16
	CTX-M-27					1			1
	CTX-M-65			1		3	1	2	7
TEM	TEM-52c	19		1	5	3	1	1	30
	TEM-52cVar	6	3		2				12
	TEM-225		1						1
SHV	SHV-12	27				2	1	1	31
CMY	CMY-2	28	12	7	2	2	1		52
Chromosomal ampC	ampC-type-3		6		12	2		4	24
	ampC-type-3-like							2	
Totaal		151	60	13	61	64	35	46	430

De prevalentie van ESBLs in mestmonsters wordt weergegeven in Tabel 5.3.2. Van de 1500 onderzochte mestmonsters waren 26,9% positief op een ESBL. De hoogste prevalentie werd gevonden in vleeskuikens (50,3%). In witte en rosé vleeskalveren was de prevalentie 33,9% en 28,7%, respectievelijk. In witvleeskalveren komen al jaren meer ESBLs voor dan in rosé kalveren. Dat heeft te maken met verschillen en antibioticumgebruik en levensduur van de dieren. In legkippen was de prevalentie 28% in 2016, in vleesvarkens 16,3% en in melkkoeien 13,2%. In 2016 werden ook eenden onderzocht en de prevalentie was 13%.

De variatie in ESBL en AmpC genen die in dierlijke mest zijn gevonden staan in Tabel 5.3.3. Vanaf 2014 is een toename in diversiteit van de gevonden ESBLs waargenomen als gevolg van de nieuwe methode die in 2014 is geïmplementeerd. Net als in eerdere jaren werd CTX-M-1 het vaakst gevonden in alle diersoorten tezamen (n=202 uit een totaal van 430 ESBL/AmpCs), gevolgd door CMY-2 (n=52), SHV-12 (n=31) en TEM-52c (n=30). Twee CTX-M-2's werden voor de eerste keer gevonden in een vleesvarken en vleeskalf. In vleeskalveren werd de grootste diversiteit in ESBLs waargenomen (12 varianten). De meer met de mens geassocieerde CTX-M-9, CTX-M-14 en CTX-M-15 werden in 2016 in vleeskalveren gevonden, terwijl die daarvoor incidenteel in kippen werden gevonden. In melkkoeien werd vooral CTX-M-1 gezien met in 2016 voor de eerste keer CTX-M-55. Chromosomale ampC types worden in varkens, legkippen, melkkoeien (19%, 10%, en 13%, respectievelijk) vaker gezien als plasmid overdraagbare ESBLs afnemen in mate van voorkomen.

5.3.3 Prevalentie van ESBLs in vlees

In 2016, werden ook 1395 vleesmonsters (Tabel 5.3.4) met deze selectieve methode onderzocht op ESBLs. Vleesmonsters (25 gram) waren vooraf verrijkt met 225 ml BPW gevolgd door selectieve isolatie op MacConkey agar met 1 mg/L cefotaxim en na incubatie afenting op ESBL Agar (Thermo Fischer Scientific UK). Van elke plaat werden kolonies met een typische morfologie van Enterobacteriaceae geselecteerd voor bacteriesoort identificatie, en bevestigde E. coli werden onderzocht op aanwezigheid van ESBLs, zoals hierboven beschreven. Van 1395 verse en geïmporteerde (ingevroren) vleesmonsters, waren 133 positief (9,5%). In pluimveevlees werd een afname in prevalentie gezien sinds 2012 (83% positief) naar 67% en 60% in 2014 en 2015, respectievelijk. In 2016 was dit verder gedaald naar 24% wat laag is in vergelijking met importkipvlees (61,2%). In kalkoenvlees werd ook een daling gezien van 22,5% in 2015 naar 15% in 2016, dit in vergelijking met 62,5% in importvlees. In rund en lamsvlees was de prevalentie laag en vergelijkbaar met 2015 (2,0% en 2,7%), in kalfsvlees varieerde de prevalentie in 2014 en 2015 van 0% tot 4,4%. In vlees van geiten was de prevalentie 7,7%.

De meeste ESBL-varianten in rund-, en kalfsvlees werden ook in de mest van die dieren gevonden (CTX-M-1, CTX-M-15, CTX-M-55 en CMY-2) was suggereert dat dierlijke mest de bron voor besmetting van het vlees is. In kipvlees werden ook CTX-M-2 en CTX-M-8 gevonden welke in de mest van kippen niet zijn aangetoond. De bij

de mens meest voorkomende variant CTX-M-15 werd niet in vlees gevonden. Andere veel voorkomende varianten waren CMY-2 en SHV-12.

Tabel 5.3.4. ESBL-prevalentie (%) in vlees in 2016 (MARAN-2017)

Vleessoort	al onderzocht	Aantal ESBL-verdacht	Aantal ESBL-bevestigd	Prevalentie (%)
Rundvlees	299	7	5	2.0
Kalfsvlees	205	11	9	4.4
Varkensvlees	273	1	0	n.d.
Kip				
vers vlees	208	55	50	24.0
import	49	32	30	61.2
Kalkoen				
vers vlees	187	35	28	15.0
import	8	5	5	62.5
Lamsvlees	112	3	3	2.7
Schapenvlees	28	1	1	3.6
Geitenvlees	26	2	2	7.7
Totaal	1395	152	133	9.5

Conclusie

Kortom, ESBLs zijn wijdverspreid in Nederlands voedselproducerende dieren en in rauwe vleesproducten. Ze komen het meest voor bij pluimvee. De ESBLs in de willekeurig gekweekte *E. coli* (0.3%), was het laagste waargenomen percentage sinds 2007. Selectief kweken in mest toonde aan dat ESBLs in alle diersoorten voorkomen met een prevalentie die altijd hoger was dan 10% (dus dat 10% of meer van de dieren drager waren). De hoogste prevalentie werd gevonden in vleeskuikens (50.3%), wat wel beduidend lager was als de jaren ervoor. In alle diersoorten waren de meest voorkomende ESBL/AmpC's CTX-M-1 en CMY-2 in zowel *E. coli* als *Salmonella*. De bij de mens vaak voorkomende ESBL-variant CTX-M-15 werd het vaakst aangetroffen in mest en vlees van vleeskalveren en melkkoeien. CTX-M-15 werd slechts zelden gevonden in vleeskuikens en het was afwezig in kipproducten, zoals reeds opgemerkt in voorgaande jaren.

Literatuur

- MARAN-2017. Monitoring of Antimicrobial Resistance and Antibiotic Usage in 2016. Veldman et al.

5.4 ESBLs in Nederlandse melkveebedrijven

5.4.1 Doorsnede studie in Nederlandse melkveebedrijven

In 2011 is door de Gezondheidsdienst voor Dieren een doorsnede studie uitgevoerd om het voorkomen van ESBL-producerende *E. coli* (ESBLs) te bepalen op conventionele melkveebedrijven in Nederland. Honderd melkveebedrijven zijn aselekt geselecteerd en op elk bedrijf is een mengmest-monster van de roosters genomen. Met behulp van selectieve media is vervolgens in de verzamelde monsters de aanwezigheid van ESBLs bepaald. Op 41 van de 100 bedrijven (41%; 95% betrouwbaarheidsinterval (BI): 31-51%) werd ESBL aangetoond in de mengmest. Vervolgens zijn 37 isolaten verder getypeerd en werden zeven verschillende types ESBL-varianten (CTXM-1, -2, -14, -15, -32, -55 en TEM-52), één plasmide gemedieerde AmpC (CMY-2) en één chromosomale AmpC (AmpC type 3) gevonden.

Na zes maanden zijn 10 bedrijven waar tijdens de eerste bemonstering ESBLs werden aangetoond en 10 bedrijven waar deze bacteriën niet werden aangetoond, opnieuw bemonsterd. Op elk bedrijf is opnieuw een monster van de mengmest genomen en zijn daarnaast ook mestmonsters van 24 individuele melkkoeien verzameld om een beeld te krijgen van de mate van voorkomen binnen een bedrijf. De monsters van vijf van de 10 bedrijven waar tijdens de eerste bemonstering ESBLs werden aangetoond waren tijdens de tweede bemonstering allemaal negatief. Omgekeerd was tenminste één van de verzamelde monsters op vier van de 10 bedrijven waar tijdens de eerste bemonstering géén ESBLs werden aangetoond, tijdens de tweede bemonstering wel positief. De mate van voorkomen binnen een bedrijf waar in mengmest tijdens de tweede bemonstering ESBLs werden aangetoond ($n=6$) liep uiteen van 0% tot 100% met een mediaan van 10%. De mate van voorkomen binnen waar tijdens de tweede bemonstering géén ESBLs werden aangetoond in de mengmest ($n=14$) liep uiteen van 0% tot 13% met een mediaan van 0%.

In 2013 is wederom een doorsnede studie uitgevoerd om het voorkomen van ESBLs te bepalen en daarnaast ook het aantal dieren dat drager is onder kalveren, pinken en melkkoeien vast te stellen. Op 196 aselekt geselecteerde melkveebedrijven zijn mestmonsters verzameld van kalveren (leeftijd 0-21 dagen), pinken (leeftijd 1-2 jaar), melkkoeien (ouder dan 2 jaar) en de roosters. Op 113 van de 196 bedrijven (58% (95% betrouwbaarheidsinterval: 50-65%)) werden in één of meerdere monsters, van de verschillende diercategorieën of roosters, ESBLs aangetoond. Wanneer de bedrijfsprevalentie alleen op de uitslagen van de monsters van de roosters werd berekend, net als in de studie van 2011, was de bedrijfsprevalentie van ESBLs 18% (95% BI: 13-24%). Dit percentage is significant lager dan in 2011 ($P < 0,001$). De dierprevalentie onder kalveren was 33% (95% BI: 30-36%). De dierprevalentie onder pinken en melkkoeien, bepaald aan de hand van gepoolde monsters, liep uit een van respectievelijk 3-15% en 2-14%. In Tabel 5.4.1. zijn alle verschillende ESBL en AmpC types weergegeven die in deze studie bij de verschillende diercategorieën zijn aangetoond. Vervolgens zijn in een longitudinale studie 10 van de 196 bedrijven gedurende één jaar elke drie maanden bemonsterd om de binnen-bedrijfsdynamiek van ESBLs te bestuderen. Uit deze studie bleek dat bij vier (op drie bedrijven) van de 40 bedrijfsbemonsteringen bij alle diercategorieën tegelijkertijd dezelfde ESBL werden aangetoond. Dit wijst erop dat er af en toe kleine 'uitbraken' van ESBL voorkomen op een bedrijf, die niet leiden tot blijvende kolonisaties met deze bacteriën. Verder leek op deze tien bedrijven geen sprake te zijn van een eenduidig verspreidingspatroon tussen de verschillende diercategorieën, maar meer op een komen en gaan van ESBL typen.

Tabel 5.4.1. ESBL en AmpC types aangetoond op Nederlandse melkveebedrijven (naar Gonggrijp et al, 2016).

ESBL type	N kalveren	N pinken	N koeien	AmpC type	N kalveren	N pinken	N koeien
CTX-M-1	26	10	9	ACT*	83	10	15
CTX-M-2	10			ACC*	62	7	5
CTX-M-32	5		1	CMY-9*	52	3	3
CTX-M-15	4		2	AmpC type 3***	20	2	
CTX-M-3	3		2	AmpC type 11***	18		
CTX-M-14	3		1	AmpC type 18***	10	1	2
CTX-M-55	3			CMY-2**	8	2	1
TEM-52c	1		1	FOX*	4		1
CTX-M-22	1			AmpC type 5***	3		
CTX-M-65	1			AmpC type 14***	2		
SHV-12			1	AmpC type 54***	1		

*: plasmide gemedieerde AmpC, niet bevestigd met PCR; **: plasmide gemedieerde AmpC, bevestigd met PCR; ***: chromosomale *ampC*, bepaald met sequentie analyses.

Literatuur

- Gonggrijp, M.A., Santman-Berends, I.M.G.A., Heuvelink, A.E., Hage, J.J., Buter, G.J., van Schaik, G., and Lam, T.J.G.M. Prevalence and risk factors of extended spectrum beta-lactamase- and AmpC-producing *E. coli* in dairy farms. (J. Dairy Sci. 2016; 99: 9001–9013

5.4.2 Longitudinale studie naar ESBLs in Nederlandse melkveebedrijven

In de periode maart 2014 tot april 2015 is een longitudinale studie uitgevoerd op conventionele melkveebedrijven in de regio Utrecht (Hordijk et al.). Deze studie bestond uit een initiële cross-sectionele meting (fase 1) op 20 bedrijven, gevolgd door een longitudinaal gedeelte (fase 2), waarin 10 van deze bedrijven gedurende 12 maanden elke 2 maanden zijn bemonsterd. Het doel van deze studie was 1) het in kaart brengen van de dynamiek in uitscheiding van ESBL/AmpC-producerende *E. coli* bij individuele dieren op een bedrijf, 2) bepalen van de mogelijke correlatie tussen het vóórkomen van ESBL/AmpC's en het gebruik van antimicrobiële middelen, 3) bepalen van de correlatie tussen het vóórkomen van ESBL/AmpC's en het vóórkomen van ESBL/AmpC's bij mensen die wonen en werken op de boerderij, dan wel het vóórkomen van ESBL/AmpC's in omgevingsmonsters binnen de stallen.

Voor fase 1 zijn vanuit het klantenbestand van de ULP (Universitaire Landbouwhuisdieren Praktijk) bedrijven geselecteerd waarvan het antibioticumgebruik in de 2 voorgaande jaren relatief hoog was. De dieren werden in leeftijdsgroepen ingedeeld conform het MediRund registratiesysteem, zijnde groep 1: 0-8 wkn, groep 2: 8 wkn – 1 jr, groep 3: 1 – 2 jr en groep 4: ouder dan 2 jr. Alle monsters zijn gekweekt op selectief medium om de aanwezigheid van ESBL/AmpC aan te tonen. Afhankelijk van de bedrijfsgrootte zijn er 64 tot 105 monsters genomen per bedrijf (mediaan = 92). Van de 20 geselecteerde bedrijven waren 8 bedrijven positief. Bij 5 bedrijven was de prevalentie laag, met 1 of 2 positieve dier- of mestputmonsters. Op 3 bedrijven was de prevalentie relatief hoog, variërend van 11 tot 27% van de monsters.

Voor fase 2 zijn alle 8 positieve bedrijven geselecteerd, aangevuld met 2 negatieve bedrijven uit fase 1. Naast de 2-maandelijke diermonsters en monsters uit de mestput, zijn op respectievelijk 4 (T4) en 12 (T12) maanden na aanvang ook fecesmonsters van mensen die wonen en/of werken op het bedrijf onderzocht. Tevens zijn stofmonsters in de stallen genomen.

De algemene trend was dat op alle bedrijven 1 á 2 specifieke ESBL/AmpC varianten dominant aanwezig waren. Met name op de bedrijven met een hoog aantal positieve monsters, waren dieren naast de dominant aanwezige varianten veelal positief voor meerdere ESBL/AmpC varianten tegelijk. Bij opeenvolgende metingen waren dit veelal andere dominante varianten, wat aangeeft dat de dynamiek binnen bedrijven gekenmerkt wordt door een opeenvolging van kleine 'uitbraken' van verschillende ESBL/AmpC-producerende *E. coli*. Ter aanvulling, van de in totaal 340 dieren die in de eerste 10 maanden positief waren op alle bedrijven, waren er 24 (7%) positief voor precies dezelfde ESBL/AmpC-variant bij de eerstvolgende meting. De meest frequent voorkomende ESBL/AmpC-varianten waren CTX-M-1, CTX-M-14, CTX-M-15, CTX-M-32 en CMY-2. Minder frequent voorkomende varianten waren CTX-M-2, CTX-M-3, TEM-52c en één TEM-79 (inhibitor resistent).

Op meetpunten T4 en T12 zijn respectievelijk 38 en 25 humane fecesmonsters geanalyseerd. Op beide momenten waren 9 van de 10 bedrijven vertegenwoordigd. Op T4 was 1 monster positief voor CTX-M-14. Dit gen was gedurende de studie verder niet op het betreffende bedrijf aangetroffen. Op T12 was 1 monster positief voor CTX-M-1, echter op een ander bedrijf. Dit gen was op het betreffende bedrijf niet gevonden bij dieren op T12, Wel op T0, T2, T8 en T10 (op T10 in combinatie met TEM-1b). Er lijkt geen direct verband tussen de humane positieve monsters en de aanwezigheid van ESBL/AmpC bij dieren op de bedrijven. De humane positieve monsters lijken een normale afspiegeling te zijn van de Nederlandse bevolking.

Bij antibioticumgebruik is onderscheid gemaakt tussen 1^e en 2^e keus middelen, conform de richtlijn opgesteld door de Werkgroep Veterinair Antibiotica Beleid (WVAB). In alle gevallen waarbij een 2^e keus middel is ingezet, is deze behandeling voorafgegaan door een kuur met een 1^e keus middel. De odds ratio voor 1^e middelen was 11,4 (BI: 1,6-87,3). De odds ratio voor 1^e + 2^e keus middelen was 21,8 (BI: 1,9-299,4). Indien geen onderscheid werd gemaakt tussen 1^e en 2^e keus middelen betrof de odds ratio 14,6 (BI: 3,0-80,4). Middels een 'population attributable fraction' kon 22% met onderscheid tussen 1^e en 2^e keus middelen, of 36% zonder dit onderscheid, van het voorkomen van ESBL/AmpC verklaard worden.

Er kon geen onderscheid worden gemaakt in voorkomen van ESBL/AmpC bij kalveren die werden gevoed met colostrum afkomstig van koeien die werden drooggezet met of zonder antibiotica (odds ratio 1,7 (BI 0,7-4,9; p = 0,28).

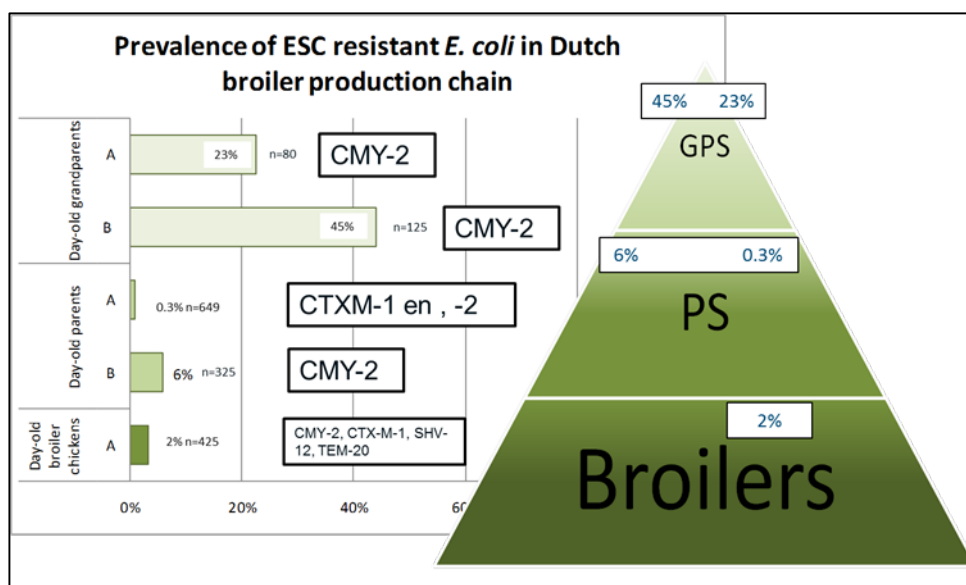
Literatuur

- Hordijk J, Fischer EAJ, Van Werven T, Sietsma S, Van Gompel L, Timmerman AJ, Spaninks MP, Heederik DJJ, Nielen M, Wagenaar JA, Stegeman A. 2017. *Ingediend voor publicatie*

5.5 ESBLs in Pluimvee

Nadat in de nationale monitoring naar resistentie in isolaten van landbouwhuisdieren een toename in cefotaxime resistentie was waargenomen tussen 2003 en 2007 (zie paragraaf 5.3.1) bestond er een vermoeden, dat dit te maken had met de aanwezigheid van ESBLs in vleeskuikens (MARAN 2009). In 2009 is toen gestart met het in kaart brengen van het vóórkomen van ESBLs in vleeskuikens. Studies op vleeskuikenbedrijven uit 2009 – 2011 laten zien dat op dat moment op alle vleeskuikenbedrijven ESBL-positieve dieren aanwezig waren en dat de prevalentie op bijna alle bedrijven boven 80% lag (Dierikx et al, 2013, Huijbers et al, 2014). In vervolgstudies tussen 2009 en 2011 naar het voorkomen van ESBLs in de vleeskuikenproductieketen werd duidelijk dat in alle lagen van de vleeskuikenproductieketen ESBLs teruggevonden konden worden in eendagskuikens. In eendagskuikens van grootouder- en ouderdieren was zelfs een hogere besmettingsgraad (tussen de 0.3 – 45%) te zien dan op de vleeskuikenproductiebedrijven (2%) (Dierikx et al, 2013). (zie figuur 5.5.1)

Figuur 5.5.1. Prevalentie van ESBLs bij eendagskuikens in verschillende lagen van de vleeskuikenproductieketen in de periode 2009-2011. De gevonden ESBLs zijn in de figuur aangegeven (naar Dierikx et al, 2013).



GPS=Overgrootouderdieren, PS=ouderdieren. A=vleeskuikenras A, B=vleeskuikenras B.

Een longitudinale studie op ouderdierniveau (eendagskuikens, op opfokbedrijf en op productiebedrijf) liet zien dat de besmettingsgraad over het algemeen lager was dan op vleeskuikenproductieniveau. Echter de besmettingsgraad kon per stal erg variëren en antibioticumgebruik met een beta-lactam antibioticum leidde tot 100% prevalentie in de stal (Dierikx et al. 2013)..

Uit longitudinale studies op vleeskuikenbedrijven (biologisch en niet-biologisch) bleek dat de ESBL prevalentie op deze bedrijven binnen één week naar nagenoeg 100% steeg en hoog bleef tot aan de slachtleeftijd (Dierikx et al, 2013, Huijbers et al, 2016), ongeacht of er antibiotica was gebruikt of niet.

In 2016 is een studie uit 2009 herhaald. In 2009 waren 26 bedrijven geïncludeerd voor ESBL onderzoek. Op alle bedrijven werden ESBLs aangetoond. In 2016 deden 20 van deze 26 bedrijven opnieuw mee. Opvallend was dat nog steeds bijna alle bedrijven ESBL-positief waren, maar de prevalentie op de bedrijven was significant lager. In 2009 was 66% van alle kuikens positief in 2016 was dit 38%. In 2016 waren ook op vleeskuikenproductieniveau duidelijke verschillen in prevalentie tussen stallen te zien (ref: rapport ESBL prevalentie op vleeskuikenbedrijven in 2016, Haitske Graveland, Joost Hordijk, Cindy Dierikx, Jeanet van der Goot, Dick Heederik, Alejandro Dorado Garcia, Dik Mevius, Jaap Wagenaar).

Er werden in alle genoemde studies verschillende typen ESBLs aangetroffen, waarvan een deel overeenkwam met die van mensen werkzaam op het vleeskuikenbedrijf (Dierikx et al., 2013, Huijbers et al., 2014). In de laatste studie in 2016 zijn verschillende plasmid gemedieerde ESBL-types gevonden op het tijdstip vlak voor de slacht (Tabel 5.5.1). Zoals ook in recente MARAN-rapporten wordt gerapporteerd, werden in 2016 ook “typische” humane ESBLs in vleeskuikens gezien (CTX-M-15), waarbij dit op één bedrijf de meest voorkomende variant was.

Tabel 5.5.1. ESBLs gevonden in 2016 op 20 vleeskuikenbedrijven in een selectie van 110 isolaten geïsoleerd vlak voor de slacht (data niet opgenomen in de ESBLAT-studie).

	n (N=110)	%
CMY-2	16	15
CTX-M-1	35	32
CTX-M-15	3	3
SHV-12	33	30
SHV-2a	1	1
TEM-52(a, c, cVar)	22	20

Literatuur

- Dierikx CM, van der Goot JA, Smith HE, Kant A, Mevius DJ. Presence of ESBL/AmpC-producing Escherichia coli in the broiler production pyramid: a descriptive study. PLoS One. 2013 Nov 7;8(11):e79005.
- Dierikx C, van der Goot J, Fabri T, van Essen-Zandbergen A, Smith H, Mevius D. Extended-spectrum- β -lactamase- and AmpC- β -lactamase-producing Escherichia coli in Dutch broilers and broiler farmers. J Antimicrob Chemother. 2013 Jan;68(1):60-7.
- Huijbers PM, Graat EA, Haenen AP, van Santen MG, van Essen-Zandbergen A, Mevius DJ, van Duijkeren E, van Hoek AH. Extended-spectrum and AmpC β -lactamase-producing Escherichia coli in broilers and people living and/or working on broiler farms: prevalence, risk factors and molecular characteristics. J Antimicrob Chemother. 2014 Oct;69(10):2669-75.

5.6 ESBLs in vleeskalverbedrijven

Om de opkomst en dynamiek van ESBL/AmpC-producerende *E. coli* in vleeskalveren in Nederland in kaart te brengen zijn 2 studies uitgevoerd. De eerste betreft een retrospectieve studie waarbij gebruik is gemaakt van fecesmonsters die zijn genomen door de NVWA voor de monitoring van zoonosen in voedselproducerende dieren (Hordijk, Wagenaar, et al., 2013). Fecesmonsters die zijn genomen van 1997 t/m 2005 waren opgeslagen bij -80°C in een 1:1 suspensie in TSB (+30% glycerol). De monsters van 2006 t/m 2010 waren opgeslagen bij -20°C in een 1:10 suspensie in pepton (+30% glycerol). Ieder fecesmonster was een gepoold monsters van 1 bedrijf, genomen van de stalvloer. Alle monsters zijn gescreend op selectieve media voor de aanwezigheid van ESBL/AmpC-producerende *E. coli*. Beide set monsters ('97-'05 en '06-'10) zijn op verschillende manieren opgeslagen, waardoor een sampling bias niet is uit te sluiten, echter beide sets laten een stijging in prevalentie van ESBL/AmpC zien (Tabel 5.6.1). Ook het aantal verschillende ESBL/AmpC varianten per jaar laat een toenemende trend zien. Van 1997 tot 1999 waren er alleen chromosomale *ampC* mutanten waargenomen. In het jaar 2000 is het eerste plasmide gemedieerde ESBL-gen gevonden. Vanaf 2005 vormen de plasmide gemedieerde genen het grootste aandeel (Tabel 5.6.1; %ESBL/pAmpC), waarvan verschillende varianten behorend tot de CTX-M-familie het meest voorkomen.

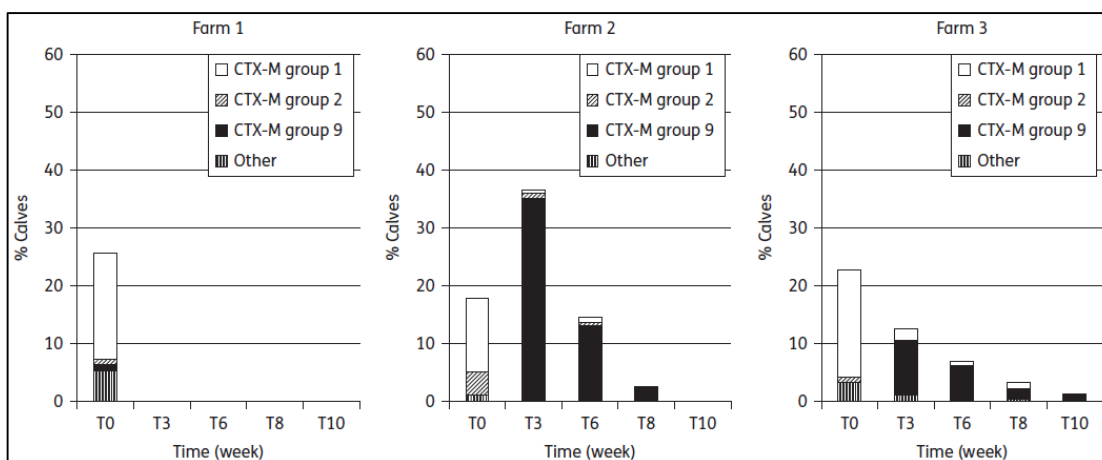
Tabel 5.6.1. Prevalentie van ESBLs in vleeskalveren van 1997 – 2010 (naar Hordijk et al, 2013)

	Jaar													
	'97	'98	'99	'00	'01	'02	'03	'04	'05	'06	'07	'08	'09	'10
<i>n</i> monsters	49	49	49	47	51	50	23	50	50	152	170	160	180	182
<i>n</i> positief (%)	3 (6)	2 (4)	2 (4)	6 (13)	7 (14)	13 (26)	2 (9)	14 (28)	18 (36)	16 (11)	33 (19)	16 (10)	44 (24)	71 (39)
<i>n</i> varianten ¹	3	1	2	5	1	5	1	6	9	6	10	7	9	10
% ESBL/pAmpC ²	0	0	0	67	0	46	0	36	72	69	70	87	75	72

¹: Aantal ESBL/AmpC allelvarianten. Dit betreft zowel plasmide gemedieerde varianten als chromosomale *ampC* mutanten. ²: Percentage van het aantal positieve monsters met plasmide gemedieerde ESBL/AmpC coderende genen.

Naast de retrospectieve studie is ook een longitudinale studie uitgevoerd op 3 kalverbedrijven (Hordijk, Mevius, et al., 2013). Alle 3 bedrijven hanteerden een all-in all-out systeem en huisvestten blank vleeskalveren. Alle dieren zijn individueel bemonsterd bij aankomst op het bedrijf (T0) en na respectievelijk 3, 6, 8 en 10 weken (T3-T10). Van T0 t/m T6 stonden de dieren in individuele boxen, na T6 zijn ze verdeeld in groepen van gemiddeld 6 dieren per box. In Figuur 5.6.1 is te zien dat bij aankomst op het bedrijf (T0) 18 tot 26% van de dieren drager waren verschillende ESBL/AmpC varianten. Op bedrijf 1 is daarna geen ESBL/AmpC meer waargenomen. Op bedrijf 2 steeg de prevalentie naar 37% op T3 en daalde vervolgens tot onder detectieniveau op T10. Op bedrijf 3 daalde de prevalentie gestaag tot 1.4% op T10.

Figuur 5.6.1. Dynamiek in ESBLs in drie vleeskalverbedrijven (Hordijk, Mevius et al, 2013)



In figuur 5.6.1 is te zien dat de diversiteit in waargenomen ESBL/AmpC-varianten bij binnenkomst het grootst is. Een verklaring kan zijn dat de dieren afkomstig zijn van verschillende melkveebedrijven en dit in hun fecale flora meenemen. Op bedrijf 2 en 3 overheerst vervolgens 1 ESBL-variant. Subtypering laat zien dat op beide bedrijven het ogenschijnlijk op zowel ESBL-, plasmide- en bacterieniveau om een gelijke variant gaat, namelijk CTX-M-14, gelegen op een F2:A-;B- plasmide, in een *E. coli* ST57. Ook het resistentiepatroon, gemeten met het panel zoals gebruikt in MARAN, is identiek. De dominant aanwezige variant was resistent tegen middelen waar de dieren op het moment van meten op bedrijf 2 en 3 mee werden behandeld. Desalniettemin daalde het aantal positieve dieren.

Literatuur

- Hordijk J, Wagenaar JA, van de Giessen A, Dierikx C, van Essen-Zandbergen A, Veldman K, Kant A, Mevius D. J Antimicrob Chemother. 2013 Sep;68(9):1970-3
- Hordijk J, Mevius DJ, Kant A, Bos ME, Graveland H, Bosman AB, Hartskeerl CM, Heederik DJ, Wagenaar JA. J Antimicrob Chemother. 2013 Nov;68(11):2468-76

5.7 ESBLs in varkensbedrijven

In een longitudinale studie zijn op 40 varkensbedrijven gedurende 4 meetmomenten met een tijdsinterval van 6 maanden (T0, T6, T12, T18) ontlastingmonsters van 147 varkenshouders, familieleden en medewerkers verzameld. Daarnaast zijn tijdens elk meetmoment op elk bedrijf rectumswabs van 60 varkens (in 10 pools van 6 varkens) genomen. Alle monsters van varkens en mensen zijn gescreend op aanwezigheid van ESBL-producerende *E. coli* door middel van selectieve kweek. ESBL-genen zijn bepaald met PCR, microarray en sequentie analyse.

Bij 17 humane deelnemers is tijdens één of meerdere meetmomenten ESBL gedetecteerd. Dit waren voornamelijk varkenshouders op bedrijven waar ook ESBLs bij varkens zijn gevonden. De prevalentie van ESBL-producerende *E. coli* bij mensen varieerde van 6% tijdens het eerste meetmoment tot 2% tijdens het laatste meetmoment. Aan het begin van de studie is op 43% van de bedrijven ESBL gevonden in varkensmonsters, dit is afgenomen tot 28% aan het eind (Tabel 5.7.1). Van de 39 bedrijven waren er 18 bedrijven ESBL-positief tijdens één of meer meetmomenten, waarvan 9 gedurende alle meetmomenten. Op meer dan de helft van de bedrijven (n=21) werden geen ESBLs gedetecteerd bij de varkens. De meest voorkomende ESBL was CTX-M-1 bij zowel mens als varken. Daarnaast is CTX-M-14, CTX-M-15, CTX-M-2 en TEM-52 gedetecteerd (Tabel 5.7.2).

Tabel 5.7.1. ESBL bij mensen en op varkensbedrijven (naar Dohmen et al, 2017).

Meetmoment	Humane prevalentie	Bedrijfsprevalentie
T0	8/142 (6%)	18/40 (43%)
T6	7/137 (5%)	13/39 (33%)
T12	5/135 (4%)	12/39 (31%)
T18	3/130 (2%)	11/39 (28%)

Tabel 5.7.2. Overzicht van ESBLs in humane isolaten en varkens isolaten (naar Dohmen et al, 2015).

Meetmoment	Varkens isolaten					Humane isolaten				
	CTX-M-1	TEM-52	CTX-M-14	CTX-M-15	Andere	CTX-M-1	TEM-52	CTX-M-14	CTX-M-15	CTX-M-2
T0	81	24	18	11	5	8	2	2		
T6	57	15	3	3	2	8			2	
T12	53	15	3			6	1			
T18	42	20	3		1	3		1		1

Andere = CTX-M-2 (n = 7), CTX-M-32 (n = 1)

Varkensslachthuis

In een dwarsdoorsnedestudie zijn op een slachthuis in Boxtel bij 334 productiemedewerkers ontlastingsmonsters verzameld. De monsters zijn gescreend op de aanwezigheid van ESBL-producerende bacteriën met selectieve kweek. ESBL-genen zijn bepaald met microarray en sequentie analyse. De prevalentie van ESBL-dragerschap onder slachthuismedewerkers was 4.9%. De gedetecteerde ESBLs waren CTX-M-1 (n=8), CTX-M-15 (n=3), CTX-M-27 (n=2), CTX-M-24 (n=1), CTX-M-55 (n=1), en SHV-12 (n=1).

Literatuur

- Dohmen W, Bonten MJ, Bos ME, van Marm S, Scharringa J, Wagenaar JA, et al. Carriage of extended-spectrum beta-lactamases in pig farmers is associated with occurrence in pigs. *Clin Microbiol Infect.* 2015 Oct;21(10):917-23.
- Dohmen W*, Dorado-Garcia A*, MJM Bonten, JA Wagenaar, Mevius D, Heederik DJJ. Farm management practices associated with ESBL-producing *Escherichia coli* in pigs: a longitudinal study in the context of reduced use of antimicrobials. *PLoS ONE.* 2017 12(3): e0174094.
- Dohmen W, Van Gompel L, Schmitt H, Mevius D, Heederik DJJ. ESBL carriage in pig slaughterhouse workers is associated with occupational exposure. *Epidemiol Infect.* 2017 Jul;145(10):2003-2010.
- Dohmen W, Schmitt H, Mevius D, Bonten MJM, Heederik DJJ. Air exposure as a possible route for ESBL in pig farmers. *Environ Res.* 2017 May;155:359-364

5.8 ESBLs bij gezelschapsdieren

Gezelschapsdieren als honden en katten hebben binnen een huishouden doorgaans nauw contact met mensen binnen hetzelfde huishouden. Om een beeld te krijgen van de ESBL/AmpC prevalentie en de mate van uitscheiding in de tijd bij honden en katten, zijn verschillende studies uitgevoerd.

In een longitudinale studie zijn 38 honden uit 24 verschillende huishoudens gedurende 6 maanden gevolgd en gescreend op de aanwezigheid van ESBL/AmpC producerende *E. coli* (Baede, Wagenaar, et al. 2015). Van alle honden is iedere maand een fecesmonster onderzocht. Om het korte termijneffect van ESBL/AmpC uitscheiding te bekijken, is van 7 honden 6 weken lang wekelijks een fecesmonster onderzocht. Gedurende de 6 maanden was bij 32 honden (84%) minimaal 1 fecesmonster positief voor ESBL/AmpC. Zes honden (16%) waren gedurende de gehele studie negatief. Negen honden (24%) waren bij alle metingen positief. In 56% van de positieve monsters werden meerdere ESBL/AmpC-varianten tegelijk gevonden. In opeenvolgende (positieve) fecesmonsters werden ook veelal verschillende ESBL/AmpC-varianten gevonden, wat duidt op een relatief hoge diversiteit van ESBL/AmpC genen en een relatief korte piekprevalentie in de darm. De meest dominant aanwezige ESBL/AmpC-varianten waren CTX-M-1, -14, -15, SHV-12 en CMY-2. In een korte vragenlijst werd gevraagd naar leefomgeving, gezondheid en voeding van de honden. Alleen bij het eten van rauw vlees, waarmee 23 honden (60%) werd (bij)gevoerd, is een positieve associatie gevonden met ESBL/AmpC dragerschap (OR = 2,08 (95%BI: 1,22-3,57)).

In navolging van de longitudinale studie bij honden is eenzelfde studie uitgevoerd bij katten. Gedurende 6 maanden zijn 23 katten uit 21 huishoudens bemonsterd, waarbij maandelijks een fecesmonster is gescreend. Bij 13 katten is daarnaast 6 weken lang wekelijks een fecesmonster gescreend. Over het algemeen was de ESBL/AmpC-prevalentie zeer laag. Er zijn 2 katten positief bevonden. Eén kat was 1 keer positief (TEM-52), de 2^e kat was bij 4 opeenvolgende maandelijks metingen positief, inclusief de tussenliggende wekelijkse metingen. Gevonden genen waren voornamelijk CMY-2, maar ook CTX-M-1, CTX-M-55 en SHV-12. Deze herhaaldelijk positieve kat was de enige die rauw vlees gevoerd werd. Bij 1 meting is naast een fecesmonster ook een rauw vleesmonster uit het betreffende huishouden meegenomen. Beiden waren positief voor CTX-M-55.

Omdat de ESBL/AmpC-prevalentie bij katten laag is, maar er wel een associatie lijkt te zijn tussen het eten van rauw vlees en ESBL/AmpC dragerschap bij honden en katten, is tenslotte een cohortstudie uitgevoerd bij katten (Baede, Broens, et al., 2017). Hierbij zijn katten onderverdeeld in 2 groepen, namelijk de katten die dagelijks werden (bij)gevoerd met rauw vlees ("exposed"-groep; $n=19$) en katten die uitsluitend brokjes of ingeblikt (niet-rauw) vlees werd gevoerd (controlegroep; $n=17$). Maximaal 1 kat per huishouden was geïncludeerd. Er zijn 3 fecesmonsters per kat geanalyseerd, met een interval van 1 week. In de controlegroep waren 3 van de 17 katten positief voor ESBL/AmpC. In alle gevallen waren ze 1 keer positief (3 van de 51 fecesmonsters positief). In de "exposed"-groep waren 17 van de 19 katten positief, waarvan de meerderheid minimaal 2 keer (37 van de 57 fecesmonsters positief). Indien in opeenvolgende metingen dezelfde ESBL/AmpC-variant werd waargenomen is ook het Sequence Type (ST) van de *E. coli* bepaald. In een ruime meerderheid van de gevallen betrof het in opeenvolgende metingen een ander ST, wat erop duidt dat positieve dieren de ESBL/AmpC producerende *E. coli* relatief snel weer kwijttraken, maar herhaaldelijk opnieuw "besmet" worden. Ondanks de relatief kleine omvang van deze screening is in deze cohortstudie een duidelijke associatie gevonden tussen

(bij)voeren van rauw vlees en het uitscheiden van ESBL/AmpC producerende *E. coli* (OR = 31,5 (95%BI: 5,2-192,1)).

Tenslotte zijn 53 voedselproducten voor katten gescreend op de aanwezigheid van ESBL/AmpC producerende *E. coli*. Deze voedselproducten bestonden uit rauw vleesproducten (n=18, waarvan 16 bevroren en 2 gedroogd; 5 verschillende merken), brokjes (n=15; 7 verschillende merken) en ingeblikt niet-rauw vlees (n=20; 8 verschillende merken). Alle monsters van brokjes en ingeblikt vlees waren negatief. In totaal waren 14 van de 18 rauw vleesproducten (78%) positief voor ESBL/AmpC.

Literatuur

- Baede VO, Wagenaar JA, Broens EM, Duim B, Dohmen W, Nijssen R, Timmerman AJ, Hordijk J. Antimicrob Agents Chemother. 2015;59(6):3117-24

- Baede VO, Broens EM, Spaninks MP, Timmerman AJ, Graveland H, Wagenaar JA, Duim B, Hordijk J. PLoS One. 2017 Nov 2;12(11):e0187239

5.9 ESBLs bij paarden

In november 2015 is een dwarsdoorsnedestudie uitgevoerd naar het vóórkomen van ESBL/AmpC producerende *E. coli* bij paarden in Nederland (Hordijk et al. publicatie in voorbereiding). De fecesmonsters zijn verzameld tijdens een 2-daags symposium voor paardeneigenaren dat werd georganiseerd door Universitaire Kliniek voor Paarden (UKP) van de Universiteit Utrecht. Alle deelnemers (n=600) zijn vooraf benaderd met de vraag om bij binnenkomst op het symposium een mestbal van zijn/haar paard in te leveren. Tevens is gevraagd naar de 4 cijfers van de postcode van de locatie van het paard. De fecesmonsters zijn direct opgeslagen bij 4°C en 1 dan wel 2 dagen later met selectieve media gescreend op de aanwezigheid van ESBL/AmpC-producerende *E. coli*.

In totaal is van 363 paarden, behorend tot 281 eigenaren, een fecesmonster verzameld. Van de 363 monsters waren 39 monsters positief voor ESBL/AmpC (10,7%; niet gecorrigeerd voor clustering van meerdere paarden per eigenaar). Eén eigenaar was woonachtig in België, 40 eigenaren hebben geen postcode opgegeven. Paarden die gehuisvest waren in de "Randstad" waren significant vaker drager van ESBL/AmpC dan in perifere regio's (referentie) en intermediaire regio's (indeling zoals gedefinieerd volgens Centraal Bureau voor Statistiek), met een odds ratio (OR) van 2,64 (95% CI: 1,00-6,98). Er was geen correlatie tussen ESBL/AmpC dragerschap bij paarden en de dichtheid van de humane populatie.

Over het algemeen was het kiental van ESBL/AmpC-producerende *E. coli* in de fecesmonsters laag. 22 van de 39 positieve monsters waren alleen positief in de ophoping, niet in de directe kweek, wat duidt op een laag kiental in de fecesmonsters.

De meest dominant voorkomende ESBL/AmpC-variant was CTX-M-1 (74%). Daarnaast zijn ook de varianten CTX-M-2, -14, -15, SHV-12 en CMY-2 waargenomen. Opvallend is dat het plasmide IncHI1 relatief veel voorkomt, namelijk in 43% van de positieve monsters, meestal in combinatie met het ESBL-gen CTX-M-1.

Tenslotte is ook naar het Sequence Type (ST) van de ESBL/AmpC-producerende *E. coli* gekeken. Opvallend was hier dat ST1250, of genetisch zeer gerelateerde ST's (ST1250-like) relatief veel voorkwamen, namelijk in 30% van de positieve monsters.

5.10 ESBLs in het milieu

5.10.1 ESBLs in recreatiewater

ESBL komen ook in het milieu voor, zoals in internationale studies bijvoorbeeld gevonden voor oppervlaktewater, maar ook bodem en lucht (Huijbers et al. 2015). Dit geldt ook voor Nederland: ESBL werden aangetroffen in oppervlaktewater, waaronder oppervlaktewater en recreatiewater onder de invloed van effluent van afvalwaterzuiveringsinstallaties (Blaak et al. 2014). Ook werd gevonden dat recreatie in de zee tot blootstelling aan ESBL kan leiden (Leonard et al. 2015). Om meer inzicht te krijgen in mogelijke blootstelling aan ESBL met recreatie in oppervlaktewater werd in het kader van ESBLAT een studie uitgevoerd naar het voorkomen en de blootstelling aan ESBL in recreatiewater. Onderzoek aan deze locaties werd aangevuld met onderzoek in een stedelijke afvalwaterketen, om inzicht in het voorkomen van ESBL in humaan afvalwater te verkrijgen.

In de periode van juni tot september 2014 werden op 66 verschillende zwemlocaties watermonsters verzameld. Dit betrof 33 plaatsen die officieel als recreatiewater zijn aangewezen en 33 niet-officiële plaatsen waar volgens informatie van gemeenten recreatie plaatsvindt, maar die niet officieel als recreatiewater zijn aangewezen. Op een officiële en een niet-officiële locatie werden herhaalde monsters genomen, om de variatie op een locatie in de tijd in kaart te brengen. Het voorkomen van ESBLs in de monsters werd gekwantificeerd en ESBL-genotypen werden gekarakteriseerd en vergeleken met genotypen in een stedelijke afvalwaterketen.

ESBLs waren aanwezig in 67% van de eenmalig geteste badplaatsen en altijd in de monsters van de twee locaties waar het onderzoek herhaald is. De concentraties waren lager op officiële zwemlocaties (gemiddelde = 0,6 kolonie vormende eenheden (kve) / 100 ml, SD = 0,5) dan op niet-officiële locaties (gemiddelde = 1,8 kve / 100 ml, SD = 1,6).

Gegevens over mogelijke risicofactoren werden verzameld via vragenlijsten, interviews met recreatieve waterkwaliteitsbeheerders en door eigen observaties. In zwemlocaties met rioolwaterzuiveringsinstallaties (RWZI's) in de nabije omgeving was de prevalentie aanzienlijk hoger (log Odds ratio=3,52, SE=1,38, $p=0,01$), terwijl juist minder ESBL voorkwamen in recreatiewater omgeven door bossen (log Odds ratio=-2,74, SE=1,20, $p=0,02$). Concentraties van ESBLs in recreatiewateren waren statistisch geassocieerd met neerslag gedurende de voorgaande dag ($p = 0,01$), zowel voor de herhaaldelijk bemonsterde locaties alsook voor de locaties die maar een keer werden bemonsterd. Regenval heeft onder ander invloed op de afspoeling van dierlijke mest van landbouwgrond naar oppervlaktewater.

Een vergelijking van de genotypes die gevonden werden in recreatiewater onder de invloed van enkele bronnen toonde een verschil in genotypes tussen locaties met en zonder invloed van rioolwater: in locaties met invloed van rioolwater werden vaker CTX-M-15 en ACC-1 gevonden, en in locaties zonder invloed van rioolwater werden vaker SHV-12 en CTX-M-32 gevonden. Dit stemt overeen met de resultaten beschreven in 4.1: CTX-M-15 wordt daarin vaker in humane isolaten gevonden, en SHV-12 in wilde vogels en kippen.

Gebruik makend van de ESBL-concentraties gemeten in de recreatiewateren, werd de blootstelling van mensen door zwemmen geschat. Volgens een kwantitatieve microbiële blootstellingsberekening leidt 53% of meer van de zwembegebeurtenissen niet tot menselijke blootstelling aan ESBLs. In de rest van zwembegebeurtenissen (47%) was de gemiddelde opname van ESBLs, 0,37 KVE voor kinderen, 0,18 KVE voor vrouwen en 0,27 KVE voor mannen. De opname van ESBLs door zwemmen in zoet oppervlaktewater voor de totale Nederlandse bevolking bedroeg $4,6 \times 10^6$ KVE per jaar.

Concluderend komen ESBLs vaak voor in zwemlocaties in Nederland, zelfs op plaatsen die als "goed" zijn geclassificeerd volgens de Europese zwemwaterrichtlijn (Richtlijn 2006/7 / EG). Bovendien bevestigde deze studie dat de nabijheid van RWZI's een risicofactor is voor het voorkomen van ESBLs in recreatiewater, wijzend op de rol van menselijke fecale besmetting voor de verspreiding van bacteriën die ESBLs dragen in het milieu.

Literatuur

- Huijbers, P. M., Blaak, H., de Jong, M. C., Graat, E. A., Vandenbroucke-Grauls, C. M. & de Roda Husman, A. M. 2015. Role of the Environment in the Transmission of Antimicrobial Resistance to Humans: A Review. *Environ Sci Technol*, 49, 11993-2004.
- Blaak, H., de Kruijf, P., Hamidjaja, R.A., van Hoek, A.H., de Roda Husman, Ana Maria, Schets, F.M., 2014. Prevalence and characteristics of ESBL-producing *E. coli* in Dutch recreational waters influenced by wastewater treatment plants. *Veterinary Microbiology* 171, 448-459.
- Leonard, A.F., Zhang, L., Balfour, A.J., Garside, R., Gaze, W.H., 2015. Human recreational exposure to antibiotic resistant bacteria in coastal bathing waters. *Environment International* 82, 92-100.
- Daisy de Vries, et al. Risk factors for ESBL producing *E. coli* in recreational waters and potential human exposure. Submitted

5.11 ESBLs in de voedselketen

Om de ESBLs goed te kunnen volgen van het dier dat drager is in het darmkanaal, naar het karkas tijdens het slachtproces en het uiteindelijke eindproduct was het van belang om zowel de dieren bij aankomst in het slachthuis, de karkassen als het vlees in de verschillende fasen van verwerking te bemonsteren. Hierbij werd de grootte van de steekproef bepaald door de berekende prevalenties in tabel 5.1.2.

De monsternamen zijn voor varkens en vleeskalveren verricht per slachthuis/verwerkende industrie en over het jaar verdeeld. De monsterverwerking, isolatiemethodiek en de genetische karakterisering van de ESBLs is gedaan volgens het ESBLAT-protocol waarbij 10 – 25 g vlees in een steriele plastic monsterzak 1:10 W/V is gemengd (dus 10 g met 90 ml of 25 g met 225 ml) met een selectief ophopingmedium (Luria Bertani Bouillon met 1 mg/L cefotaxim (LB+)) waarna is afgeënt op MacConkey agar met 1 mg/L cefotaxime (Mac+).

5.11.1 Vleesvarkens

In vleesvarkens varieerde het aantal dieren dat ESBL-drager was sterk tussen de twee onderzochte slachthuizen. De zeer lage prevalentie in Apeldoorn zou door een niet selectieve monsternamen kunnen komen. Het verschil lijkt te groot om door toeval verklaard te zijn. Karkascontaminatie was beperkt, mede door de broeibak en het flamberen van het karkas met als doel de haren te verwijderen. Vleesafsnijdsels, een restproduct snippers die verwerkt worden in allerlei eindproducten, waren slechts incidenteel besmet. Dit wordt o.a. verwerkt in gehakt, waarvan 2% van de monsters positief waren. De lage prevalentie in vlees komt overeen met wat in MARAN voor varkensvlees wordt gerapporteerd. Kennelijk is er tijdens het slachtproces en de verwerking een afname van het voorkomen van ESBLs, ook als de dieren zelf wel vaak drager zijn. In varkens was CTX-M-1 was de meest voorkomende ESBL-variant, wat ook voor de dieren is beschreven hoewel in MARAN in de steekproeven mest van vleesvarkens, meer diversiteit in ESBLs is gevonden dan in deze studie.

Tabel 5.11.1. Aantal onderzochte monsters op varkensslachthuizen in Apeldoorn en Boxtel en de ESBL-prevalentie (%).

Bron	Aantal onderzochte monsters	Aantal ESBL-verdachte stammen	ESBL prevalentie (%)
Apeldoorn	412	9	2,2
Mest	72	1	1,4
Karkas	170	5	2,9
Snippers	170	3	1,8
Boxtel	483	35	7,2
Mest	143	32	22,4
Karkas	170	2	1,2
Snippers	170	1	0,6
Retail	204	2	1,0
Gehakt	102	2	2,0
Karbonade	102	0	0
Totaal	1099	46	4,2

Tabel 5.11.2. ESBL en AmpC genen gevonden in varkens, op karkassen en in varkensvlees.

ESBL	Apeldoorn			Boxtel			Retail		Totaal
	Karkas	Mest	Snippers	Karkas	Mest	Snippers	Gehakt	Karbonade	
CTX-M-1	4		3		14		1		22
CTX-M-2					1				1
TEM-52c					1				1
CMY-2					2				2
Neg	1	1		2	11	1	1		17
Totaal	5	1	3	2	32	1	2	0	46

5.11.2 Vleeskalveren

Bij kalveren was het percentage dieren dat drager was aan de slachtlijn beduidend hoger dan bij varkens en blankvlees kalveren waren vaker besmet dan rosé. Het aantal karkasbesmettingen was grofweg een kwart van het dragerschap en in vleesafsnijdsels werd slechts incidenteel een besmet monster gevonden. Kalfsgehakt was in 8,2% van de onderzochte monsters besmet. Ook dit komt in order van grootte overeen met de bevindingen in MARAN.

In kalveren en kalfsvlees werden meer ESBL-varianten gevonden dan in varkens, wat bijna één-op-één overeenkomt met de gegevens uit MARAN. Ook deze studie laat zien dat in kalveren meer varianten voorkomen die geassocieerd zijn met de mens (CTX-M-15).

Tabel 5.11.3. Aantal onderzochte monsters op een groot kalverslachthuis in Apeldoorn (EKRO) en de ESBL-prevalentie (%).

Bron	Aantal onderzochte monsters	Aantal ESBL-verdachte stammen	Prevalentie (%)
Mest			
Blank	184	82	44.6
Rosé	176	56	31.8
Karkas			
Blank	175	21	12.0
Rosé	153	11	7.2
Snippers			
Blank	204	3	1.5
Rosé	193	3	1.6
Gehakt (blank)	232	19	8.2
Totaal	1317	195	14.8

Tabel 5.11.4. ESBL en AmpC genen gevonden in kalveren, op karkassen en in vlees.

ESBL	Mest		Karkas		Snipper		Gehakt (blank)	Totaal
	Blank	Rosé	Blank	Rosé	Blank	Rosé		
CTX-M-1	29	24	14	7	1	2	11	77
CTX-M-1 / CTX-M-14	1							1
CTX-M-14	2	2						4
CTX-M-15	14	6	6	2	1		4	29
CTX-M-2		1	1					2
CTX-M-24	2	1						3
CTX-M-3	1	1		1				3
CTX-M-32		1			1		2	2
CTX-M-55	1	1						2
SHV-12	1							1
SHV-12 / TEM-52c		1						1
TEM-52var		1						1
TEM-52var / CTX-M-15		1						1
TEM-52c	1	2		1			1	4
CMY-2	2	1				1		4
Totaal	54	43	21	11	3	3	18	135

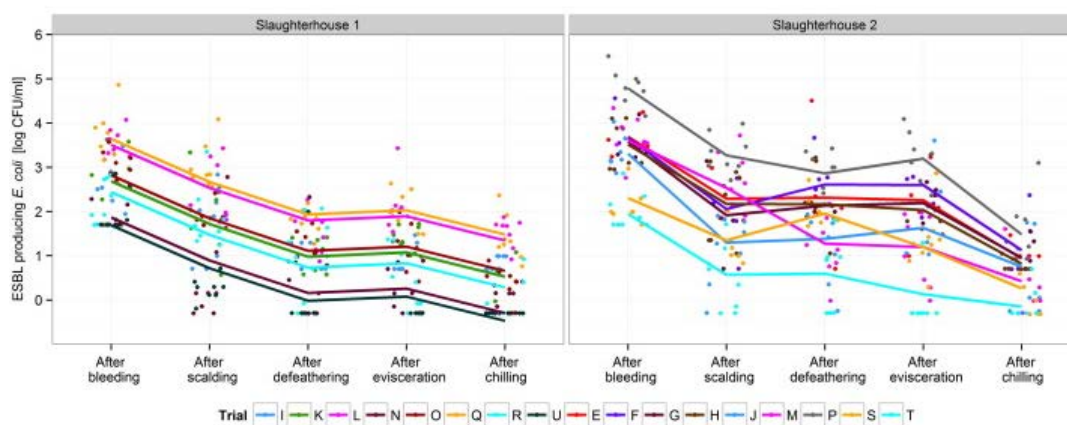
5.11.3 Vleeskuikens

Terwijl er veel bekend is over vleeskuikens als belangrijk reservoir van ESBLs, is er slechts beperkte kennis over het effect van het slachten op de concentraties van ESBLs op vlees van pluimvee. Daarom is een studie gedaan om de effecten van het slachtproces en de vleesverwerking op de concentratie van ESBLs op vleeskippenkarkassen door vast te stellen (Pacholewicz E, et al. Int J Food Microbiol. 2015).

In twee slachthuizen werd het oppervlak van de hele karkassen bemonsterd na vijf bewerkingsstappen: verbloeden, heet waterbad, ontvederen, verwijderen van de ingewanden en koelen. In totaal werden 17 batches kippen bemonsterd in twee verschillende slachthuizen tijdens de zomers van 2012 en 2013. De laboratoriummethodieken waren identiek aan de methodes bij varkens en vleeskalveren.

De ESBL-concentraties varieerden tussen de slachtbatches in beide slachthuizen (zie fig. 5.11.1). De concentraties op de karkassen van de vleeskuikens verminderden tijdens de verwerking aanzienlijk. In slachthuis 1 verminderden alle opeenvolgende verwerkingsstappen de concentraties behalve de verwijdering van de darmen, wat leidde tot een lichte toename die statistisch niet significant was. De concentratieveranderingen tussen verwerkingsstappen waren relatief vergelijkbaar voor alle bemonsterde partijen in dit slachthuis. Daarentegen was er meer variatie in concentraties in slachthuis 2, waar de algehele reductie in ESBLs door verwerking hoger was dan in slachthuis 1. Veranderingen in ESBL-producerende *E. coli* waren in beide slachthuizen vergelijkbaar met veranderingen in generieke *E. coli*. De volgende ESBL-varianten (CTX-M-1, SHV-12, CMY-2, TEM-52) werden aangetoond in beide slachthuizen, wat sterk overeenkomt met de ESBLs die in kippen zijn beschreven in MARAN. De na het koelen gevonden concentratieniveaus lagen tussen 10^2 en 10^5 CFU/karkas.

Figuur 5.11.1. Dynamiek in ESBL-concentraties op karkassen van vleeskuikens tijdens het slachtproces in twee slachthuizen (naar Pacholewicz E, et al. 2015).



De ESBL-concentraties varieerden aanzienlijk tussen de slachtbatches in beide slachthuizen (zie fig. 5.11.1). De concentraties op de karkassen van de vleeskuikens verminderden tijdens de verwerking aanzienlijk. In slachthuis 1 verminderden alle opeenvolgende verwerkingsstappen de concentraties behalve de verwijdering van de darmen, wat leidde tot een lichte toename die statistisch niet significant was. De concentratieveranderingen tussen verwerkingsstappen waren relatief vergelijkbaar voor alle bemonsterde partijen in dit slachthuis. Daarentegen was er meer variatie in concentraties in slachthuis 2, waar de algehele reductie in ESBLs door verwerking hoger was dan in slachthuis 1. Veranderingen in ESBL-producerende *E. coli* waren in beide slachthuizen vergelijkbaar met veranderingen in generieke *E. coli*. De volgende ESBL-varianten (CTX-M-1, SHV-12, CMY-2, TEM-52) werden aangetoond in beide slachthuizen, wat sterk overeenkomt met de ESBLs die in kippen zijn beschreven in MARAN. De na het koelen gevonden concentratieniveaus lagen tussen 10^2 en 10^5 CFU / karkas.

5.11.4 ESBLs in rauw vlees

De mate van voorkomen van ESBL-producerende *E. coli* is gekwantificeerd in vleesmonsters verkregen van verschillende diersoorten in slachthuizen en de detailhandel. Verder was het doel om de spreiding van de concentraties van de ESBL-producerende *E. coli* te berekenen als een input voor het modelleren van de menselijke blootstelling aan ESBLs.

De gegevens zijn verkregen van WBVR (varkensvlees en kalfsvlees) en NVWA (kip en kalkoen)

Varkensvlees

Tussen oktober 2014 en juni 2015 zijn monsters verzameld op twee slachthuizen, waarin zoals hierboven beschreven met selectieve methodes is onderzocht of ze ESBL-positief waren. Alleen in deze positieve monsters is vervolgens de concentratie ESBLs bepaald. Deze monsters omvatten: zeven huidmonsters van karkassen verzameld in de koelruimte in de slachthuizen (één monster bevatte drie stukken huid verzameld door kurkboor, dwz ongeveer 10 g per monster), vier monsters van vleesafsnijdsels (verzameld op de snijafdeling in de slachthuizen, ongeveer 25 g per monster) en 33 mestmonsters. Daarnaast werden twee monsters varkensgehakt (25 g) uit de detailhandel die ESBL-positief waren kwantitatief onderzocht.

Kalfsvlees

De kalfsvleesmonsters werden tussen november 2014 en november 2015 in één slachthuis verzameld, zoals hierboven is beschreven. Het betrof 32 ESBL-positieve monsters van karkassen, vijf monsters van garnituren en 19 monsters kalfsgehakt.

Pluimveevlees

Pluimveevlees werd verzameld in september 2015. De monsters omvatten 47 ESBL-positieve monsters kippenvlees (25 g per monster) en 3 monsters kalkoenvlees (25 g per monster).

Literatuur

- Pacholewicz E, Liakopoulos A, Swart A, Gortemaker B, Dierikx C, Havelaar A, Schmitt H. Reduction of extended-spectrum- β -lactamase- and AmpC- β -lactamase-producing *Escherichia coli* through processing in two broiler chicken slaughterhouses. *Int J Food Microbiol.* 2015 Dec 23;215:57-63.

Resultaten

Voor varkens hadden alleen 16 mestmonsters een detecteerbaar niveau van ESBL-producerende *E. coli*. De concentratie ESBLs in monsters verzameld in slachthuizen (zowel huidmonsters van karkassen en vleesafsnijdsels) en in de detailhandel (gehakt) lagen onder de detectielimiet (100 CFU/25 g). Ook in monsters van vleeskalveren kon de concentratie ESBL-producerende *E. coli* alleen in 17 van de 27 mestmonsters gekwantificeerd. In de resterende monsters die werden verzameld in het slachthuis (huid van karkassen en vleesafsnijdsels) en in de detailhandel (gehakt) lag de concentratie ESBLs onder de detectielimiet. Dit gold ook voor alle monsters van kalkoen-, en kipvlees waarin ESBLs zijn aangetoond.

Conclusie

In zowel varkens, kalveren als vleeskuikens vindt er tijdens het slachtproces een duidelijke afname in besmettingsgraad met ESBLs plaats. Besmetting van dieren lijkt de belangrijkste bron te zijn van besmetting van karkassen en het vlees. De waargenomen afname in ESBLs wordt tijdens de verwerking beïnvloed door zowel de batch dieren als door het slachthuis. Dit wijst erop dat zowel primaire productie als procescontrole belangrijk zijn voor het verminderen van ESBL-niveaus in eindproducten. Dit betekent dat naast een goede hygiëne tijdens het slachtproces en de verwerking, vooral het verlagen van dragerschap van dieren belangrijk is als maatregel om ESBLs in de voedselketen te controleren.

De ESBL-concentraties in al het onderzochte vlees lagen altijd onder de detectielimiet van de kwantitatieve bepaling. Deze was of 100 of 1000 CFU/monster van 25 g. Dit betekent dat ten behoeve van een analyse van de blootstelling van mensen, naast de prevalentie (% vlees dat positief is op ESBLs), voor de concentratie het getal 1000 CFU/25 g dient te worden aangehouden.

5.12 Introductie en verspreiding van ESBLs in veehouderijketens

De gegevens in dit hoofdstuk zijn gebaseerd op opinies van experts uit de verschillende diersectoren.

5.12.1 Rundvee

Rundvee is onder te verdelen in een deel melkleverende bedrijven en een deel niet-melkleverend.

Melkleverende bedrijven, N = ± 18000

De variatie binnen bedrijven wordt bepaald door bij voorbeeld door het staltype.

Voorbeelden zijn:

- Ligboxenstal
 - Met of zonder uitloop
 - Compost of droge fractie mest in ligboxen als vloerbedekking
- Stal met vast plaatsten (Hollands/Fries) met dieren op stro
- Gesloten bedrijven versus bedrijven waar regelmatig dieren worden aangekocht
- Verschillen in voerregimes
 - Maiskuil (geproduceerd met dierlijke mest)

Het wordt lastig om bij prevalentiestudies onderscheid te maken in deze beschreven variatie in bedrijfstypen, echter het is wel belangrijk om deze variatie in een steekproef in te bouwen

Binnen bedrijven zijn de volgende diercategorieën van belang:

- Jonge melkdrinkende kalveren tot een leeftijd van ongeveer 2 weken. Dit is de populatie die deels op het bedrijf blijft en de belangrijkste schakel naar de vleeskalversector omdat deze deels naar vleeskalverbedrijven worden getransporteerd. Dit is ook een diercategorie die frequent aan antibiotica wordt blootgesteld.
- Belangrijk om informatie over ESBL-prevalentie in te verzamelen
Pinken, vaarzen, melkkoeien. Deze kunnen als categorieën gescheiden of meer gemengd op bedrijven voorkomen. Op zich is het van belang om te weten hoe de dynamiek is in voorkomen van ESBLs in deze diercategorieën.

Niet-melkleverende bedrijven

Dit is een erg gevarieerde sector met ongeveer 15000 bedrijven met veel hobbyboeren met enkele zoogkoeien met weinig antibioticumgebruik anders dan een injectie na een keizersnede. Deze hebben geen prioriteit.

Als 'risico-bedrijven' voor het voorkomen van ESBLs gelden:

- **opfokbedrijven** (N = ± 1500). Deze bevatten meestal dieren van één melkveebedrijf, maar soms van meerdere. De aard van deze bedrijven met jonge vatbare dieren bepaalt dat er soms antibiotica worden ingezet. Dit kunnen dus belangrijke schakels met en tussen melkveebedrijven zijn.
- **Vetweiderij** (N = onbekend). Hier worden afgemolken dieren uit het buitenland (bv Roemenië) ingevoerd en na een periode geslacht
- **Vleesstieren** (N = ± 100). Was vroeger een grote deelsector, maar nu veelal overgegaan in rosé en minder van belang.

Producten

Zuivel

Alle producten geproduceerd met gepasteuriseerde melk moeten als vrij van ESBLs beschouwd worden

Rauwmelkse producten kunnen wel ESBLs bevatten. Deze zijn te onderscheiden in:

- Producten die door boeren zelf worden verkocht
- Importproducten

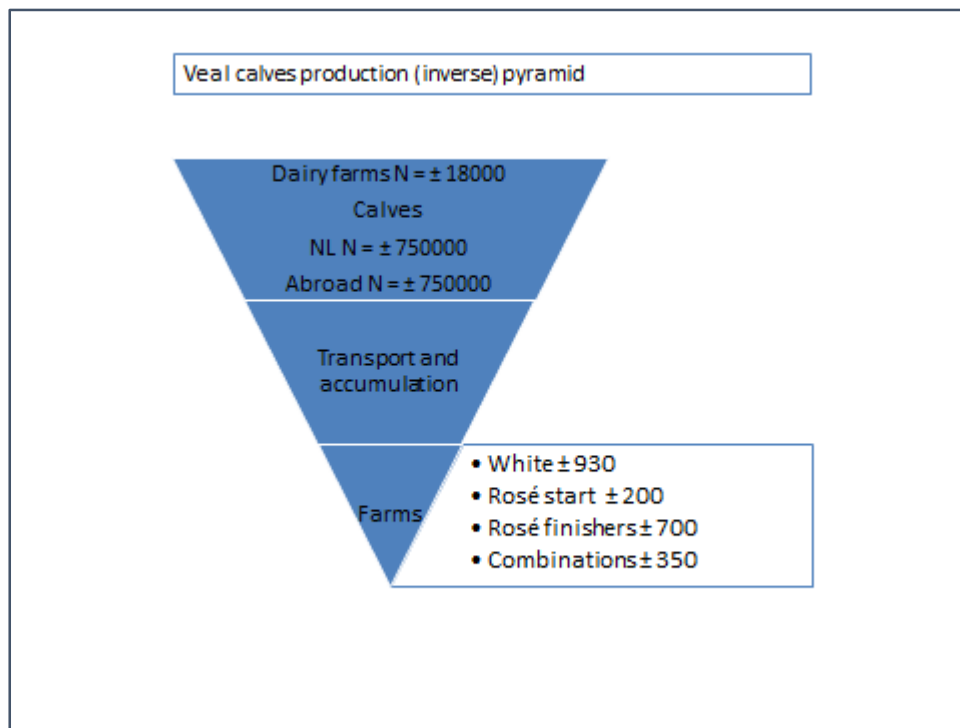
Vlees

Kan besmet zijn. Hierbij moet onderscheid gemaakt worden tussen:

- In NL geproduceerd
- Import vetweiders uit bv Roemenië
- Import luxeproducten uit bv Ierland (Greenfields) of Z-Amerika
- Gehakt (voor een groot deel geïmporteerd).

5.12.2 Vleeskalveren

Figuur 5.12.1. Vleeskalver productie pyramide



Er worden in Nederland jaarlijks ongeveer 1.5 miljoen vleeskalveren geproduceerd, die voor ongeveer de helft uit Nederlandse melkveebedrijven komen. De andere helft komt uit het buitenland waarbij Duitsland de belangrijkste bron is.

Belangrijke schakels in de keten zijn daarbij het **transport en verzamelcentra**. Deze zijn gelegen in zowel Nederland als in het buitenland.

Er zijn 3 belangrijke bedrijfstypen:

1. Blankvleesbedrijven
2. Rosé startbedrijven
3. Rosé afmestbedrijven

Binnen bedrijven is er een dynamiek in het voorkomen van ESBLs. De prevalentie is hoog bij binnenkomst, neemt daarna af en neemt weer toe rond het moment van slachten.

Kalfsvlees

Ook hier is het verstandig om uit te gaan van de prevalentie van ESBLs in het eindproduct ($\pm 7 - 20\%$)

Er zijn acht kalverslachthuizen, acht uitsnijderijen en acht proportioneerders. Dus 24 schakels in de keten van het vlees wat naar de consument gaat. Dit wordt grotendeels geëxporteerd m.u.v. een kleine Nederlandse markt en wat ambachtelijke slaggers ($< 10\%$).

Waar komen de ESBLs de schakels/ketens binnen?

1. Via dieren, Het kalf is de bron
 - a. via opfokbedrijven voor melkveesector
 - b. via transport en verzamelplaats voor vleeskalversector
2. Vanuit het milieu
 - a. Binnen het bedrijf
 - i. Fecaal besmet stof
 - b. Vanuit de omgeving van en naar andere diersoorten
 - c. Via weidegang (niet voor vleeskalveren)

3. Via het voer
 - a. Maiskuil (effect inkuilen op kiemgetal onbekend evenzo het effect van de lange tijd tussen bemesten en voeren)
 - b. Gras, of graskuil
 - c. Droogvoer
 - i. Soya/raapzaad?
 1. Pelletieren zou beschermend moeten werken
 - d. Natte bijproducten risicogroep
4. Drinkwater
 - a. Bakken in stallen
 - b. Oppervlaktewater
5. Vanuit de mens:
 - a. Veehouder
 - b. Mensen die op veel bedrijven komen zoals dierenarts, voorlichter, kalver(vee)handelaren

Waar nemen de prevalenties en/of aantallen ESBL-dragende bacteriën in deze schakel toe of af?

1. In het dier of beter in het darmkanaal i.v.m. voedingsstoffen en gunstige temperatuur voor vermeerdering van ESBL-dragende kiemen en gen-overdracht
2. In de mest(put). Dit is een verzamelbak, maar door lagere temp is uitwisseling minder efficiënt
3. Waterbak
4. Mest in grond. Of daar bacteriën zich effectief vermeerderen en hun genen overdragen is niet duidelijk
5. In het oppervlaktewater (Geofox)

Is er conjugatie of kruiscontaminatie?

Overdracht in het dier vindt plaats:

1. Als het dier ESBLs opneemt uit de omgeving
2. Tijdens opfok
3. Tijdens handel en transport
4. Op verzamelplaatsen

Overdracht in de mest zal temp afhankelijk gebeuren. Eventueel vanuit compost strooisel en dikke fractie mest als bodem ligplaats.

Waarheen verspreiden de ESBL-dragende bacteriën zich vanuit deze schakel?

- Vanuit de mest naar het milieu
- Via dieren naar andere bedrijven
- Naar de mens via
 - Direct contact
 - Milieu
 - Producten (zuivel/vlees etc)
- Via de mensen zelf en de transportmiddelen

Hoe kan transmissie naar en vanuit deze schakel beheerst worden?

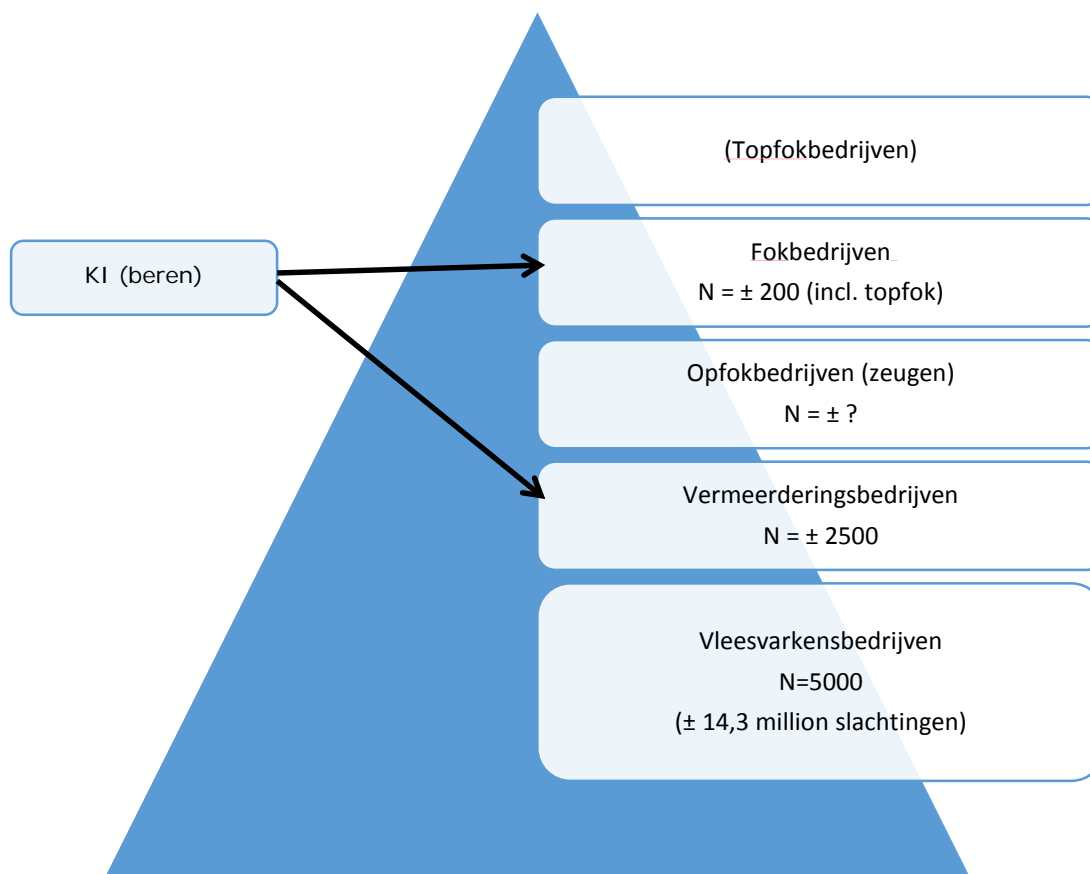
Sectoroverschrijdend wordt de slachterij als een belangrijke plek gezien om de prevalentie in vlees omlaag te krijgen.

Voor de keten geldt:

1. Het jonge kalf als cruciale bron voor verspreiding
2. Hygiëne
 - a. Binnen bedrijven
 - b. Tussen rondes op bedrijven met all-in all-out systeem (vleeskalveren, opfok, jongveeafdelingen)
3. Selectiedruk blijft een essentiële factor
 - a. Cefalosporines
 - b. Breed-spectrum penicillines
 - c. In mindere mate ook andere middelen door co-selectie

5.12.3 Varkens

Figuur 5.12.2. Structuur keten – levende varkens



Het eindproduct van fokbedrijven zijn vermeerderingsdieren (hybriden of zuivere lijn dieren). Er kan nog een top boven de fokbedrijven zitten: de zgn. topfokbedrijven. Vaak zijn deze echter gecombineerd. Het eindproduct van opfokbedrijven zijn gelten, die de zeugen op vermeerderingsbedrijven vervangen. Vermeerderingsbedrijven zou je nog kunnen opdelen in vermeerdering (waar kraambiggen tot 3 à 4 weken geproduceerd worden) en biggenopfok (waar gespeende biggen tot 25kg geproduceerd worden), maar vaak is dit op 1 bedrijf. Speenbiggen kunnen direct geslacht worden (minderheid) of naar vleesvarkensbedrijven gaan (tot ±93kg). Verder veel voorkomende combinaties van bedrijven zijn:

- Vermeerderings- en vleesvarkensbedrijven
- Fokbedrijven t/m vleesvarkensbedrijven (zgn. gesloten bedrijven)

Omdat er veel gecombineerde bedrijven zijn, is er voor een aantal afdelingen vaak sprake van een continu systeem i.p.v. een all-in-all-out systeem (dekstal en dragende zeugenstal). De vleesvarkensbedrijven werken wel met een all-in-all-out systeem.

Vermeerderingsbedrijven wisselen niet vaak van opfokker, dus er is een tamelijk constante verbinding tussen deze schakels. Vleesvarkensbedrijven wisselen wel vaker van vermeerderingsbedrijven en krijgen speenbiggen geleverd uit max. $\frac{3}{4}$ bedrijven. Hier vindt dus vermenging plaats.

Import en export

0,9 miljoen varkens worden per jaar geïmporteerd. Dit vindt plaats in alle stappen. 11.4 miljoen varkens worden per jaar geëxporteerd, waarvan 6.9 miljoen biggen en 4.4 miljoen vleesvarkens, vooral naar Duitsland (63% en 90%, respectievelijk).

Waar komen ESBL-dragende bacteriën de keten binnen?

In alle stappen kunnen ESBLs de keten binnenkomen door besmet voer. Het is onbekend wat pelleteeren met ESBLs doet maar als we naar *Salmonella* kijken dan nemen concentraties af door pelleteeren. Dit moet – als blijkt dat voer een relatief belangrijke factor kan zijn - nader uitgezocht worden maar vermoedelijk is *Salmonella* een goede indicator voor ESBLs. Gepelleteerd voer wordt verder ook bijgemengd met onbehandelde tarwe waar ook ESBLs in kunnen zitten. Verder kunnen ESBLs de keten binnenkomen door ongedierte zoals knaagdieren en vliegen. Alhoewel het meeste drinkwater van varkens leidingwater en bronwater).

Nemen prevalenties en/of aantallen ESBL-dragende bacteriën in deze schakel toe of af?

Tijdens de vermeerdering is er stress onder de biggen, waardoor biggen aan de diarree kunnen gaan, gevoeliger voor infecties zijn, enz. Dit leidt tot kruisbesmetting van de biggen, en dit in combinatie met een relatief groot antibioticagebruik, zorgt ervoor dat de prevalentie aan het einde van de vermeerdering bijna 100% is (als de analogie met MRSA opgaat). Het is moeilijk om individuele biggen te behandelen met antibiotica dus groepsbehandeling. Transport van de biggen naar de vleesvarkensbedrijven zorgt waarschijnlijk ook voor een toename van de prevalentie van ESBLs onder de dieren (stress, mengen). Op de vleesvarkensbedrijven neemt de (dier)prevalentie i.h.a. weer af (uitdoven infectie). De bedrijfsprevalentie blijft ongeveer constant.

Het is niet helemaal duidelijk wat gebeurt met ESBL-dragers in de mest, waarbij mest een belangrijke verspreiding heeft richting het milieu en de omgeving.

Is er conjugatie?

In de darmen van de dieren. Misschien in mestkelders/mestputten/silo's, maar de temperatuur is hier laag (weinig tot geen vergisting). Mest wordt <1jaar opgeslagen.

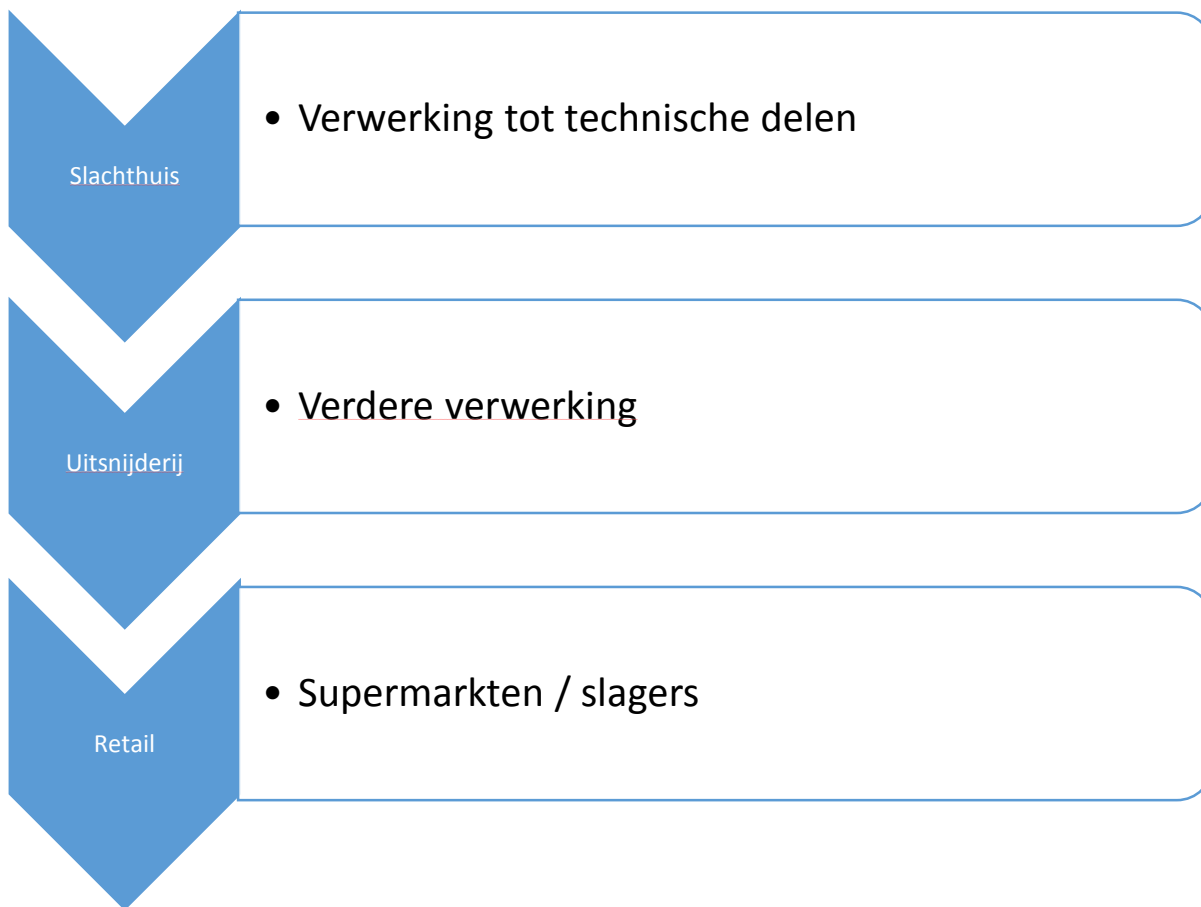
Waarheen verspreiden de ESBL-dragende bacteriën zich vanuit deze schakel?

Verspreiding via mest: de meeste mest wordt in het voorjaar uitgereden over het land en een gedeelte in de herfst, en onbehandeld geïnjecteerd. Er wordt zo'n 132 miljoen kg mest dunne varkensdrijfmest geïmporteerd en 892 miljoen kg mest dunne varkensdrijfmest geëxporteerd, vooral naar Duitsland. Het is onbekend wat de eisen voor im- en export zijn. Verder mogelijk naar stof; we moeten onderzoeken of ESBLs kunnen overleven in stof (waarschijnlijk minder lang dan bijvoorbeeld *S. aureus*). Als uit een eerste inschatting blijkt dat dit een wezenlijke bijdrage kan leveren.

Hoe kan transmissie naar en vanuit deze schakel beheerst worden?

misschien, maar onwaarschijnlijk door eisen te stellen aan het voer, meest waarschijnlijk door een reductie van het antibiotica gebruik. Wel wordt opgemerkt dat de grootste winst van het reduceren van antibiotica er al af is: verdere reducties worden steeds moeilijker waarschijnlijker omdat ESBLs wijd verspreid zijn. Eén enkele introductie van ESBLs ergens in de keten kan al leiden tot verdere verspreiding en vermenigvuldiging van ESBLs in de keten. Verder zou om ESBLs uit de dieren te houden waarschijnlijk *helemaal geen* antibiotica gebruikt moeten worden omdat de meeste antibioticagenen op dezelfde cassette zitten als de ESBL genen. Vermindering van mengen van dieren, betere gezondheid.

Figuur 5.12.3. Structuur keten –varkens slachtketen



Er zijn in Nederland 7 grote slachthuizen (elk met een slachtcapaciteit van > 1 miljoen varkens per jaar) en 11 middelgrote (elk met een slachtcapaciteit van >25.000 per jaar). Het aantal geslachte varkens in Nederland is 14.3 miljoen per jaar. Het eindproduct van de stap “slacht” zijn halve karkassen. Deze kunnen nog verder verwerkt worden tot de zgn. technische delen en i.h.a. gebeurt dit in hetzelfde bedrijf. Het verder uitsnijden van de technische delen kan gebeuren op meerdere bedrijven, afhankelijk van het te maken eindproduct en de bedrijven. Dit is een complex en erg variabel onderdeel van de keten. Uitsnijderijen krijgen technische delen geleverd vanuit verschillende slachthuizen en supermarkten krijgen producten geleverd vanuit verschillende uitsnijderijen. Ook worden grondstoffen, tussenproducten en eindproducten mogelijk ingevoerd en uitgevoerd worden. Producten zijn in principe traceerbaar tot op een grote groep van primaire bedrijven.

Import en export

Levende varkens worden vooral geïmporteerd uit België en Duitsland. Het totaal aantal ingevoerde varkens is 900.000; dit zijn deels biggen en deels slachtvarkens. Er wordt ongeveer 250.000 ton vers vlees ingevoerd, waarvan 50.000 ton verse vleeswaar. Dit betekent dat zo'n 200.000 ton buitenlands vlees verder verwerkt wordt in Nederlandse uitsnijderijen. Verse vleeswaar kan ook van buiten de EU komen. Vers varkensvlees i.h.a. in veel mindere mate.

Eigen productie van vers vlees is ongeveer 1.300.000 ton. Dit is inclusief botten etc. Er blijft dan nog grofweg 1.000.000 ton vers vlees over. Hiervan exporteren we 700.000 ton. Dit betekent 300.000 ton Nederlands vers vlees voor eigen consumptie. Zoals hierboven besproken wordt 200.000 ton buitenlands vers vlees geconsumeerd in Nederland. Dus 2/5 van het geconsumeerde verse vlees komt uit het buitenland. Bovengenoemde getallen zijn een indicatie. Ze geven het belang van import aan, en moeten daarom mogelijk nog verfijnd worden.

Waar komen ESBL-dragende bacteriën de keten binnen?

Met levende varkens en met mensen. Voor ESBLs is dat niet bekend. Voor een andere belangrijke bacterie, MRSA, is aangetoond dat ongeveer 10% van de MRSA die op vlees zit niet dier-gerelateerd (LA-MRSA) is.

Nemen prevalenties en/of aantallen ESBL-dragende bacteriën in deze schakel toe of af?

Vermeerderingen van ESBLs zijn niet te verwachten door de koele temperatuur: bij <10°C vindt geen groei plaats. Afname van ESBLs zijn een gevolg van bepaalde ketenstappen als het broeibad, afbranden en koelen. Bij invriezen vindt ook afsterving plaats. Kolonisatie van ESBLs op slachtapparatuur en de omgeving is niet aannemelijk tenzij ESBLs in biofilms kunnen zitten. Hier is weinig over bekend. Een deel van de producten in uitsnijderijen wordt verwerkt tot vleeswaar. Vleeswaar wordt i.h.a. gepasteuriseerd waardoor ESBLs afsterven. We moeten dus alleen naar vers vlees kijken.

Is er conjugatie?

Er is waarschijnlijk ook geen conjugatie op het vlees en op de slachtrobots omdat het voor de ESBLs echt overleven is: geen groei, weinig nutriënten en koele temperaturen.

Waarheen verspreiden de ESBL-dragende bacteriën zich vanuit deze schakel?

Verder de keten in, en wellicht naar het personeel.

Hoe kan transmissie naar en vanuit deze schakel beheerst worden?

Transmissie kan beheerst worden door alles dat fecale bezoedeling veroorzaakt te verminderen. Hierbij moet gedacht worden aan dezelfde maatregelen als die tegen Salmonella.

Geïnterviewd:

Lourens Heres – VION

Peter van de Wolf- GD Deventer

Overige bronnen:

http://www.pve.nl/wdocs/dbedrijfsnet/up1/Zkfdylwll_432680PVEpromoNL_LR_definitief.pdf

[http://statline.cbs.nl/StatWeb/publication/?VW=T&DM=SLNL&PA=71461ned&D1=0-7&D2=0-2,5-6,8-9&D3=0-3&D4=1,6,11,\(l-1\)-l&HD=131203-1044&HDR=T&STB=G1,G2,G3](http://statline.cbs.nl/StatWeb/publication/?VW=T&DM=SLNL&PA=71461ned&D1=0-7&D2=0-2,5-6,8-9&D3=0-3&D4=1,6,11,(l-1)-l&HD=131203-1044&HDR=T&STB=G1,G2,G3)

5.12.4 Pluimvee

In de pluimveesector wordt onderscheid gemaakt tussen legbedrijven en bedrijven met vleeskuikens. In het interview is relatief kort gesproken over de legsector en is uitgebreid ingegaan op de vleeskuikenpiramide.

Leghennen

In leghennen is de prevalentie van ESBLs vrij laag. De leghennen vormen zelf echter niet het belangrijkste eindproduct van de legbedrijven: dat zijn de eieren. Het is mogelijk dat ESBLs voorkomen op de eischaal, en tussen de eischaal en het vlies. Omdat de inhoud van een ei, dat wil zeggen het eiwit en de dooier, in feite steriel is, komen ESBLs niet voor in het ei zelf. Eventuele besmetting van de mens met ESBLs door consumptie van eieren komt daarom vanaf de eischaal.

Uitgelegde hennen worden in zeer geringe mate in Nederland verder verwerkt. Zij worden bijvoorbeeld verwerkt voor ragout; eventueel aanwezige ESBLs worden bij het verwerkingsproces effectief afgedood door verhitting en komen daarom niet in het eindproduct voor. Meestal echter worden uitgelegde hennen naar het buitenland vervoerd voor verdere verwerking.

Vleeskuikens

In de vleeskuikensector komen ESBLs in alle lagen van de piramide voor. In de onderste laag van de piramide was in 2013/14 100% van de kuikens besmet. In 2016 betrof dit ongeveer 50% van de onderzochte dieren

Hoger in de piramide neemt de besmettingsgraad steeds verder af. Binnen de piramide verloopt de overdracht van ESBLs zowel horizontaal binnen een laag, als verticaal van een bovenliggende laag naar de laag eronder.

De belangrijkste overdracht van ESBLs lijkt plaats te vinden via verticale besmetting, dat wil zeggen tussen de lagen in de piramide, via de levende dieren. De huidige hoge besmettingsgraad in de onderste laag lijkt volgens de experts terug te voeren op intensief antibioticagebruik in de hogere piramidelagen in het verleden. De horizontale overdracht van ESBLs, dat wil zeggen tussen bedrijven binnen een enkele laag in de piramide, lijkt minder prominent te zijn. Deze overdracht ontstaat voornamelijk doordat een stal voor de start van een nieuwe groep kuikens nooit helemaal steriel gemaakt kan worden, ook al wordt deze nog zo goed gedesinfecteerd; de ESBLs overleven in het stof en in faecesresten. Omdat in de onderste laag van de piramide vaker een nieuwe groep dieren start dan in de hogere lagen, is het effect van deze horizontale overdracht het sterkst in de onderste laag. In de onderste laag van de piramide kan verder overdracht van ESBLs plaatsvinden via het voer. Hoewel fabrieksvvoer hitte behandeld is, wordt in zo'n 60% van de bedrijven tarwe bijgemengd; deze tarwe is vaak afkomstig van de omgeving van het betreffende bedrijf waar het via het oppervlaktewater en mogelijk ook via bemesting besmet kan zijn geraakt met ESBLs. Omdat de dieren in de hogere lagen van de piramide voornamelijk meelvoer krijgen zonder bijmenging, vindt deze vorm van overdracht van ESBLs vrijwel alleen in de onderste laag plaats.

In de slachtketen wordt alle apparatuur goed gedesinfecteerd. In deze keten vindt daarom geen introductie of vermeerdering van ESBLs plaats. ESBLs op een vleeskuiken dat de slachtketen binnenkomt, worden door het slachtproces echter niet of nauwelijks verwijderd (dit in tegenstelling tot het onderzoek van Pacholewicz et al, zie blz 54 – 55). Met name vleesproducten met huid zijn na de plukfase niet schoon en bevatten meestal nog de ESBLs van het dier dat de keten binnenkwam. Vleesproducten zonder huid, zoals kipfilet, hebben als gevolg van de vele bewerkingsstappen in het algemeen een lagere besmettingsgraad. De bijproducten van het slachtproces, zoals bloed, veren, darmen en karkassen, worden op locatie omgewerkt tot een meelproduct dat de basis vormt voor diervoer of voedsel voor de mens. De ESBLs in deze bijproducten worden in het verwerkingsproces effectief afgedood. In de slachtketens worden niet alleen vleeskuikens uit Nederland verwerkt: zo'n 25% van de dieren die de slachtketen binnenkomen, zijn afkomstig uit Duitsland en België.

Een significant probleem voor de beheersing van ESBLs in de vleeskuikensector is het feit dat de verschillende lagen in de pyramide invoer van levende dieren uit het buitenland hebben. De dieren in de hoogste laag, dat wil zeggen de overgrootouderdieren, worden allen uit het buitenland ingevoerd. De grootouder- en ouderdieren komen deels uit Nederland en deels uit het buitenland; naar inschatting ligt het percentage dieren dat uit het buitenland wordt geïntroduceerd rond de 35%. De vleeskuikens in de onderste laag in de pyramide komen voornamelijk uit Nederland; slechts zo'n 10% van deze dieren wordt direct uit het buitenland geïmporteerd. De introductie van dieren uit het buitenland vormt daarmee een risicofactor voor de introductie van ESBLs, met name omdat in de pluimveesector in bijvoorbeeld Duitsland driemaal zoveel antibiotica wordt gebruikt dan in Nederland.

Concluderende kanttekeningen

- de introductie van dieren uit het buitenland en de bijmenging bij voer vormen belangrijke risicofactoren voor een verhoogde prevalentie van ESBLs in het rauwe consumptieproduct;
- de overdracht van ESBLs verloopt zowel horizontaal als verticaal in de pyramide van de pluimveesector, waarbij de verticale overdracht het meest prominent lijkt;
- de bewerking van consumptieproducten vormt een risico voor kruiscontaminatie.

5.13 Supplement

Tabel S1. Overzicht van de 35 geselecteerde studies van waaruit gegevens over ESBL/AmpC-E. coli collectie zijn gebruikt voor de gepoolde analyse. Type reservoir: H, human; A, animal; F, food; E, environment (met toestemming uit Dorado-Garcia et al, 2017).

Study reference (year) / sample collection years	Description of study from which samples originated	Origin of samples ^a	no. isolates / no. samples ^a	no isolates with: ESBL (2be) genes / AmpC plasmid genes / plasmid typing / MLST typing ^b	Aggregated reservoir for pooled analyses	Prevalence % (95%CL) (no. positive samples/total) ^c
Blaak et al. (2014) ²⁵ / 2012 ^d	Cross-sectional investigation in surface water from 4 regions. Samples from non-recreational sites (n=35), recreational sites (n=13) and influenced by wastewater treatment plants (n=13)	non-recreational surface water	88 / 21	88 / na / na / 21	E-surface water (non-recreational)	60.0 (16.2) (21/35) ^e
		surface water (recreational use)	22 / 5	22 / na / na / 3	E-surface water (recreational)	38.5 (26.5) (5/13) ^e
		water in waste water treatment chain	34 / 7	34 / na / na / 9	E-waste water	53.8 (27.1) (7/13) ^e
Blaak et al. (2014) ³⁵ / 2012 ^f	Cross-sectional prevalence survey. Manure (n=10) and rinse water samples (n=5) from a broiler farm, pooled samples of flies (n=11) (<i>laying hen farm results did not met inclusion criteria</i>)	manure of broiler farm	22 / 8	22 / na / na / 9	A-broiler	80.0 (24.8) (8/10) ^e
		flies in broiler farm	6 / 1	6 / na / na / 4	A-broiler	9.1 (17.0) (1/11) ^e
		rinse water from broiler farm	10 / 5	10 / na / na / 8	A-broiler	100.0 (0.0) (5/5) ^e
Blaak et al. (2015) ²⁷ / 2010-2011 ⁹	Cross sectional investigation in 30 water samples from two waste water chains: i) one consisting of a nursing home, a hospital and a municipal waste water treatment plant (mWWTP), and ii) one consisting of a hospital and a mWWTP. Influent and effluent samples also collected from WWTP. <i>Same surface water samples elsewhere</i> ²⁵	water in waste water treatment chain	53 / 30	53 / na / na / 10	E-waste water	100 (0.0) (30/30) ^e
Baede et al. (2015) ³⁶ / 2013-2014 ^f	Longitudinal faecal carriage prevalence survey. Fecal swabs from 38 dogs providing monthly (n=204) and weekly (n=55) samples during a 2 year period	healthy dogs, faeces	266 / 106	231 / 36 / na / na	A-dog	40.9 (6.0) (106/259) ^h

Study reference (year) / sample collection years	Description of study from which samples originated	Origin of samples ^a	no. isolates / no. samples ^a	no isolates with: ESBL (2be) genes / AmpC plasmid genes / plasmid typing / MLST typing ^b	Aggregated reservoir for pooled analyses	Prevalence % (95%CL) (no. positive samples/total) ^c
Day et al. (2016) ³¹ / 2006-2009 ^f	Collection of 353 ESBL/AmpC-positive isolates from Germany, the UK and the Netherlands. Only the ones of the Netherlands are used	broilers, faeces/cloaca	35 / 35	29 / 6 / 33 / na	A-broiler	nc
		dairy cattle, faeces	3 / 3	2 / 1 / 2 / na	A-dairy cattle	
		pigs, faecal	3 / 3	3 / 0 / 3 / na	A-pig	
		chicken meat at retail	47 / 47	38 / 9 / 47 / na	F-chicken meat (retail)	
		turkey meat at retail	1 / 1	1 / 0 / 1 / na	F-turkey meat (retail)	
		human, clinical urinary tract infections	59 / 59	59 / 0 / 53 / na	H-clinical (UTIs)	
Dierikx et al. (2010) ³² / 2006 ^f	Cross-sectional investigation in 153 isolates obtained from the Dutch national monitoring program (at slaughterhouse). Molecular typing on a selection from the 22 isolates with non-wild type MICs for cefotaxime	broilers at slaughterhouse, faeces/cloaca	10 / 10	8 / 2 / 10 / 5	A-broiler	14.3 (5.6) (na) ⁱ
Dierikx et al. (2012) ⁷ / 2008 ^f	Cross-sectional investigation in 38 dogs (<i>cats and horses' samples did not met inclusion criteria</i>) A diagnostic centre submitted ESBL-suspected isolates for further molecular typing	dogs, clinical samples (urine, blood, wound, respiratory tract)	21 / 21	15 / 7 / na / 21	A-dog	nc
Dierikx et al. (2013) ²¹ / 2009 ^f	Cross-sectional faecal carriage prevalence survey in 26 broiler farms. Human faecal swabs from farmers (n=18). Broiler cloacal swabs at 6 weeks of age (n=1066), molecular characterization only from farms where human carriers are found	broilers in farm, faeces/cloaca	31 / 31	20 / 12 / 8 / 16	A-broiler	85.0 (10) (na) ⁱ
		farmers in broiler farms	21 / 6	17 / 5 / 7 / 7	H-farming community (broiler)	33.3 (21.8) (6/18)

Study reference (year) / sample collection years	Description of study from which samples originated	Origin of samples ^a	no. isolates / no. samples ^a	no isolates with: ESBL (2be) genes / AmpC plasmid genes / plasmid typing / MLST typing ^b	Aggregated reservoir for pooled analyses	Prevalence % (95%CL) (no. positive samples/total) ^c
Dierikx et al. (2013) ³³ / 2009-2010 ^d	Cross sectional faecal carriage prevalence survey at different stages of the production pyramid in a breeding company. Caecal swabs from grandparent stock (n=558), parent stock (n=974) and one-day old broilers (n=425). Molecular typing in a selection of isolates	broilers at breeding, faeces/cloaca	30 / 30	8 / 22 / na / na	A-broiler	9.2 (2.9) (na) ^{i, j}
Dohmen et al. (2015) ²⁸ / 2012 ^d	Cross-sectional fecal carriage prevalence survey in 40 pig farms. Pooled fecal samples (n=398) from 2388 pigs. Fecal samples from 66 farmers or employees and 76 family members (total n=142) in 4 sampling moments (0, 6, 12, 18 months) ^k (<i>only results from t0 presented in the paper, the rest is not published, same laboratory methods apply as for t0</i>)	pigs, faecal people living and/or working in pig farms	157 / 107 31 / 23	157 / na / na / na 31 / na / na / na	A-pig H-farming community (pig)	26.9 (4.4) (107/398) ^{e, h} 4.0 (1.6) (23/142x4) ^{e, h}
Geurts Y. / 2014-2015 ¹	Cross sectional investigation in a veal calf slaughterhouse in 360 manure samples and 957 samples from meat during and after processing (<i>pig slaughterhouse samples did not met inclusion criteria</i>)	manure from veal calves' slaughterhouse veal calf carcasses skin and meat surface	97 / 97 56 / 56	94 / 3 / na / na 55 / 1 / na / na	A-veal calf F-veal calf meat (slaughterhouse)	26.9 (4.6) (97/360) 5.9 (1.5) (56/957)
Gonggrijp MA. et al. (2016) ⁴¹ / 2011 ^d	Cross sectional faecal carriage prevalence survey in dairy cattle (<i>milk samples excluded for small number of ESBL/AmpC isolates</i>)	dairy cattle, faeces	46 / 46	43 / 3 / na / na	A-dairy cattle	nc

Study reference (year) / sample collection years	Description of study from which samples originated	Origin of samples ^a	no. isolates / no. samples ^a	no isolates with: ESBL (2be) genes / AmpC plasmid genes / plasmid typing / MLST typing ^b	Aggregated reservoir for pooled analyses	Prevalence % (95%CL) (no. positive samples/total) ^c
Gonggrijp./ 2013-2014 ^l	Study in 2 phases: i) cross-sectional faecal carriage survey in 189 dairy cattle farms with all animal age groups represented; ii) longitudinal investigation in ESBL-positive animals from previous phase in 10 farms, 4 sampling times (4-month interval) ^k	dairy cattle, faeces	319 / 136	299 / 20 / na / na	A-dairy cattle	nc
Hordijk J. / 2014-2015 ^l	Study in 2 phases: i) cross-sectional faecal carriage survey in 20 dairy cattle farms with relatively high use of antimicrobials, all animal ages represented; ii) longitudinal investigation in ESBL-positive animals in the 10 farms with highest ESBL prevalence from the first phase ^k	dairy cattle, faeces manure of dairy farm	729 / 444 44 / 37	642 / 89 / na / 119 36 / 8 / na / 9	A-dairy cattle A-dairy cattle	nc
Hordijk et al. (2013) ³⁴ / 2011 ^f	Cross-sectional faecal carriage prevalence survey. Samples from 100 veal calf herds (10 animals per herd) at slaughter. Molecular typing on a selection of isolates from each of the 66 herds with non-wild type MICs for cefotaxime	veal calves, faecal	59 / 59	58 / 1 / 51 / 5	A-veal calf	59.0 (9.6) (59/100) _m
Hordijk et al. (2013) ⁹ / 2000-2009 ^f	Longitudinal faecal carriage prevalence survey. 1115 individual samples obtained from the Netherlands Consumer and Product Safety Authority (NVWA) from 1997 to 2010 (<i>only included from year 2000 for the pooled analysis</i>)	veal calves, faecal	149 / 149	143 / 6 / na / na	A-veal calf	13.4 (2.0) (149/1115)

Study reference (year) / sample collection years	Description of study from which samples originated	Origin of samples ^a	no. isolates / no. samples ^a	no isolates with: ESBL (2be) genes / AmpC plasmid genes / plasmid typing / MLST typing ^b	Aggregated reservoir for pooled analyses	Prevalence % (95%CL) (no. positive samples/total) ^c
Hordijk et al. (2013) ²² / 2009 ^f	Longitudinal fecal carriage prevalence survey in 3 farms (n=399). Samples taken upon arrival on the farm (T0) and after 3, 6, 8 and 10 weeks ^k	veal calves, faecal	143 / 117	143 / 0 / 75 / 74	A-veal calf	5.9 (1.2) (117/399x5) ^h
Hordijk et al. (2013) ²³ / 2011-2012 ^f	Cross-sectional prevalence. Samples collected from healthy dogs (n=20) and diarrheic dogs (n=20) (<i>cats' samples did not met inclusion criteria</i>)	dogs with diarrhoea, faeces healthy dogs, faeces	13 / 8 9 / 7	9 / 4 / na / na 6 / 3 / na / na	A-dog A-dog	37.5 (15.0) (15/40) combined above
Huijbers et al. (2014) ²⁶ / 2010-2011 ^f	Cross-sectional fecal carriage prevalence survey in 50 broiler farms. Pooled samples (10 pools of 2 cloacal swabs each per farm) from broiler at ~31 days of age. Individual human samples from 141 people living and/or working at the farms. Molecular characterization in a selection of isolates.	broilers, faeces/cloaca people living and/or working in broiler farms	92 / 87 41 / 25	55 / 37 / 43 / 19 27 / 14 / 27 / 17	A-broiler H-farming community (broiler)	96.4 (1.6) (482/500) ⁱ 17.7 (6.3) (25/141)
Huijbers et al. (2015) ³⁷ / 2011-2012 ^f	Longitudinal fecal carriage prevalence survey on 8 organic broiler farms. Pooled samples (10 pools of 2 cloacal swabs each per farm) in broilers at T1 (~34 days of age) and T2 (~68 days). Human: 11 farmers and employees and 16 family members at T1 and T2 ^k . Molecular characterization in a selection of isolates	broilers, faeces/cloaca people living and/or working in broiler farms	49 / 48 9 / 5	32 / 17 / 5 / 18 5 / 4 / 5 / 9	A-broiler H-farming community (broiler)	81.3 (6.0) (130/160) ^{h, i} 18.5 (14.7) (5/27) ⁱ

Study reference (year) / sample collection years	Description of study from which samples originated	Origin of samples ^a	no. isolates / no. samples ^a	no isolates with: ESBL (2be) genes / AmpC plasmid genes / plasmid typing / MLST typing ^b	Aggregated reservoir for pooled analyses	Prevalence % (95%CL) (no. positive samples/total) ^c
Kluytmans et al. (2013) ³⁹ / 2008-2009 ⁹	Cross sectional investigation on isolates from retail chicken meat (from supermarkets close to 4 hospitals) and patients in a hospital (for fecal carriage and blood cultures). Same isolates elsewhere. ⁵²	chicken meat at retail	87 / 87	87 / na / na / na	F-chicken meat (retail)	nc
		human, clinical samples, blood	15 / 15	15 / na / na / na	H-clinical (blood)	
		human, clinical samples, faeces	43 / 43	43 / na / na / na	H-clinical (faeces)	
Koningstein et al. (2015) ²⁹ / 2010-2012 ^f	Prospective cohort study in 44 day-care centres attending children. 852 stool samples taken in a 22-month period	human open population (children), faeces	29 / 29	18 / 11 / na / na	H-open population	3.4 (1.2) (29/852)
Leverstein-van Hall et al. (2011) ¹¹ / 2010 ^f	Cross-sectional prevalence survey for contamination of retail chicken meat samples (n=98) bought at 12 supermarkets from the Dutch national monitoring program. Molecular typing in a selection of isolates <i>Human samples elsewhere</i> ¹² . <i>Poultry samples elsewhere</i> ³² .	chicken meat at retail	81 / 48	81 / na / na / 14	F-chicken meat (retail)	93.8 (4.8) (na) ^{e, i}
MARAN 2012 to 2016 ⁴⁴ / 2011-2015 ^f	Cross-sectional prevalence annual report on Monitoring of Antimicrobial Resistance in Animals in the Netherlands. Random samples from slaughterhouse animals and meat at supermarkets	broilers at slaughterhouse, faeces/cloaca	512 / 461	376 / 136 / 91 / na	A-broiler	61.3 (4.8) (na) ^{i, n}
		dairy cattle at slaughterhouse, faeces	62 / 62	53 / 9 / na / na	A-dairy cattle	7.6 (3.6) (na) ^{i, n}
		laying hens at slaughterhouse, faecal	63 / 63	29 / 34 / 18 / na	A-laying hen	32.5 (6.5) (na) ^{i, n}
		pigs at slaughterhouse, faecal	228 / 221	210 / 18 / 25 / na	A-pig	24.3 (4.7) (na) ^{i, n}
		veal calves at slaughterhouse, faecal	227 / 226	213 / 15 / 60 / na	A-veal calf	24.5 (5.4) (na) ^{i, n}
		beef meat at retail	73 / 73	67 / 6 / 15 / na	F-beef meat (retail)	3.6 (1.7) (na) ^{i, n}
		chicken meat at retail	361 / 361	310 / 54 / 109 / na	F-chicken meat (retail)	61.1 (3.2) (na) ^{i, n}

Study reference (year) / sample collection years	Description of study from which samples originated	Origin of samples ^a	no. isolates / no. samples ^a	no isolates with: ESBL (2be) genes / AmpC plasmid genes / plasmid typing / MLST typing ^b	Aggregated reservoir for pooled analyses	Prevalence % (95%CL) (no. positive samples/total) ^c
		turkey meat at retail	45 / 45	43 / 2 / 15 / na	F-turkey meat (retail)	34.1 (11.2) (na) ^{i, n}
Pacholewicz et al. (2015) ³⁰ / 2012-2013 ⁹	Cross, sectional investigation in 248 samples from 17 batches of broiler carcasses at bleeding and chilling phases in 2 slaughterhouses	broilers, faeces/cloaca	165 / 165	109 / 60 / na / na	F-chicken meat (slaughter)	66.5 (5.9) (165/248)
Paltansing et al (2012) ⁴⁰ / 2008 ⁹	Cross sectional investigation on 49 <i>E. coli</i> isolates from patients in a hospital	human, clinical urinary tract infections	20 / 20	20 / na / na / 20	H-clinical (UTIs)	nc
		human, clinical samples, blood	3 / 3	3 / na / na / 3	H-clinical (blood)	nc
		human, clinical samples, faeces	2 / 2	2 / na / na / 2	H-clinical (faeces)	nc
		human, clinical samples, respiratory infections, wounds, other	4 / 4	4 / na / na / 4	H-clinical (other)	nc
Schmitt H. / 2015 ¹	Cross sectional investigation in 64 surface waters used for recreation during the summer. Additionally 2 locations were used for longitudinal weekly investigation (12 weeks) ^k	surface water (recreational use)	154 / 29	148 / 8 / na / na	E-surface water (recreational)	45.3 (12.2) (29/64)
Schmitt H. / 2015 ¹	Cross sectional investigation in waste water chain including influent and effluent water samples from two mWWTPs	water in waste water treatment chain	131 / 14	118 / 16 / na / na	E-waste water	100 (0.0) (14/14)
van den Bunt G. / 2015 ¹	Cross sectional fecal carriage prevalence survey in 1660 people (all ages) from general population	human open population (all ages), faeces	57 / 57	57 / na / na / 29	H-open population	3.4 (0.87) (57/1660)
van den Bunt G. (2017) ⁴³ / 2015 ^d	Cross sectional prevalence survey in 995 parents and 1004 children from open population	human open population (adults), faeces	46 / 44	44 / 3 / 37 / na	H-open population	4.4 (1.3) (44/995)
		human open population (children), faeces	35 / 33	30 / 6 / 25 / na	H-open population	3.3 (1.1) (33/1004)

Study reference (year) / sample collection years	Description of study from which samples originated	Origin of samples ^a	no. isolates / no. samples ^a	no isolates with: ESBL (2be) genes / AmpC plasmid genes / plasmid typing / MLST typing ^b	Aggregated reservoir for pooled analyses	Prevalence % (95%CL) (no. positive samples/total) ^c
van der Bij et al. (2011) ²⁰ / 2008-2009 ⁹	Cross sectional prevalence survey in 837 <i>E. coli</i> isolates causing bacteraemia from 3 hospitals	human, clinical samples, blood	41 / 41	41 / na / na / na	H-clinical (blood)	4.9 (1.5) (41/837) ^e
van Hoek et al. (2015) ³⁸ / 2011 ^f	Cross-sectional fecal carriage prevalence survey in 1,033 adults from areas with low and high broiler density	human open population (adults), faeces	69 / 49	65 / 4 / 38 / 55	H-open population	4.7 (1.29) (49/1033)
Veldman et al. (2013) ²⁴ / 2010-2012 ^f	Cross-sectional fecal carriage prevalence survey. Cloacal swabs from carcasses of 414 wild birds sent to diagnostic laboratory	wild birds, cloacal samples from carcasses	65 / 65	51 / 14 / 60 / na	A-wild bird	15.7 (3.5) (65/414)
Voets et al. (2012) ¹² / 2009 ^d	Cross-sectional investigation on selected human clinical isolates (hospital, long-term care facilities and GPs) screened ESBL-positive during 3 consecutive months	human, clinical UTIs human, clinical samples, blood human, clinical samples, faeces human, clinical samples, respiratory infections, wounds, other	196 / 196 6 / 6 33 / 33 36 / 36	182 / 17 / na / 43 6 / 0 / na / 1 30 / 4 / na / 3 32 / 4 / na / 3	H-clinical (UTIs) H-clinical (blood) H-clinical (faeces) H-clinical (other)	nc
Wielders et al. (2016) ⁴² / 2014-2015 ^d	Cross sectional fecal carriage prevalence survey in 2,432 adults living in communities with <30,000 inhabitants from North Brabant and Limburg (Dutch areas with high density of livestock)	human open population (adults), faeces	114 / 104	104 / 10 / na / 106	H-open population	4.3 (0.8) (104/2432)

a only the ones complying with criteria for selection in materials and methods are reported

b na, not available; most reservoirs were investigated for AmpC in more than 70% of their isolates; reservoirs with limited isolates investigated for AmpC presence (<70%) were H-clinical blood (9% of isolates investigated, no AmpC found), H-clinical faecal (42% of isolates, 12% AmpC), E-waste water (60% of isolates, 5% AmpC) and A-pigs (60% isolates, 7% AmpC); no isolates were investigated for AmpC in H-pig farming community and E-surface water non-recreational; only isolates with identified ESBL-carrying plasmids are presented as containing plasmid information (i.e. plasmid typing without transformation experiments excluded)

c prevalence calculated with ESBL (2be)/AmpC (plasmid-mediated) genotypically confirmed samples over total samples unless stated differently. Nc, non-computable. Na, not available.

d data obtained directly from partner only, publication just as reference for methods (n=7)

e based on only ESBL 2be genotypically confirmed isolates

f data obtained from partner only but entirely extractable from publication (n=17)

g data obtained entirely from publication (n=5)

h overall prevalence pooling all sampling times

i prevalence as reported in paper with phenotypically confirmed samples, not computable with the selection of samples included in pooled-analysis

j average mean prevalence weighted with categories of samples as reported in paper

k all isolates pooled for the pooled-analyses regardless the sampling time

l data obtained from partner only (n=6)

m prevalence estimated at herd level

n average mean prevalence weighted with number of samples per year in which samples were available, and prevalence and SE computable: A-broiler: 2015-2016 (total N=800); A-laying hen: 2015 (total N=200); A dairy, A-pig, A-veal calf, F-beef meat (retail), F-chicken meat (retail), F-turkey meat (retail): 2013-2016 (total N=784, 900, 782, 2642, 2782, 247 respectively)

Tabel S2. Frequenties van de verschillende ESBLs en plasmid gemedieerde AmpCs in de 22 onderzochte reservoirs (Dorado-Garcia et al, 2017).

Sources/Reservoirs	No. isolates ESBL_AmpC	No. ESBL_AmpC genes	CTX_M_1	CTX_M_3	CTX_M_15	CTX_M_22	CTX_M_32	CTX_M_36	CTX_M_52	CTX_M_55	CTX_M_64	CTX_M_79	CTX_M_2	CTX_M_8	CTX_M_9	CTX_M_14	CTX_M_17	CTX_M_24	CTX_M_27	CTX_M_51	CTX_M_65	CTX_M_104	CTX_M_120	CTX_M_134
a-H-general population	350	352	62	12	109	0	3	0	0	1	0	0	7	2	0	61	0	3	27	0	0	1	0	1
b-H-clinical UTIs	275	286	59	3	116	4	2	0	1	0	0	2	1	0	5	21	1	0	5	2	0	0	1	0
c-H-clinical blood	65	66	9	2	27	0	0	0	0	1	0	0	2	0	2	10	1	0	2	0	0	0	0	0
d-H-clinical fecal	78	83	30	0	17	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	8	0	0	0	0	0	0	0	0
e-H-clinical respiratory, woun	40	43	9	0	11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	1	0	1	0	1	0	0	0
f-H-broiler farming community	71	72	29	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
g-H-pig farming community	31	31	22	0	2	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0
h-E-waste water	218	223	41	5	106	0	4	1	0	3	0	0	1	0	4	17	0	0	10	0	0	0	0	0
i-E-surface water non-recreati	88	88	20	1	40	0	3	0	0	0	0	0	0	0	1	11	0	1	2	0	0	0	0	0
j-E-surface water recreational	176	186	42	8	48	0	28	0	0	3	0	0	0	0	2	13	0	2	3	0	0	0	0	0
k-F-chicken meat at retail	576	588	251	2	5	0	4	0	0	1	0	0	71	19	6	2	0	0	0	0	0	0	0	0
l-F-chicken meat at slaughterh	165	169	27	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
m-F-beef meat at retail	73	73	38	0	12	0	1	0	0	0	0	0	2	1	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0
n-F-veal meat at slaughterhous	56	56	35	1	13	0	3	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
o-F-turkey meat at retail	46	46	17	0	7	0	0	0	0	1	0	0	6	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0
p-A-broilers	797	803	336	1	10	0	2	0	0	0	0	0	12	0	3	4	0	0	0	0	0	0	0	0
q-A-laying hens	63	63	21	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
r-A-dairy cattle	1203	1205	630	19	77	17	88	0	0	11	0	0	64	0	1	108	0	0	2	0	4	0	0	0
s-A-veal calves	675	680	329	9	109	0	22	0	0	5	0	2	35	0	0	89	0	3	0	0	3	0	0	0
t-A-pigs	388	388	228	0	14	0	2	0	0	0	0	0	15	0	1	24	0	0	1	0	1	0	0	0
u-A-wild birds	65	66	14	8	13	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	8	0	0	0	0	0	0	0	0
v-A-dogs	309	312	128	2	33	0	8	0	0	4	0	0	15	0	0	18	0	0	0	0	0	0	0	0

Sources/Reservoirs	No. isolates ESBL_AmpC	No. ESBL_AmpC genes	SHV_2	SHV_4	SHV_5	SHV_12	SHV_31	TEM_106	TEM_3	TEM_4	TEM_12	TEM_15	TEM_17	TEM_19	TEM_20	TEM_25	TEM_28	TEM_52	ACC_1	ACT_un	ACT_1	DHA_1	MIR	CMY_2	CMY_39	CMY_4	CMY_79	CMY_42	CMY_20	CMY_3
a-H-general population	350	352	1	1	0	18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	0	0	0	4	0	28	0	1	0	0	0	0
b-H-clinical UTIs	275	286	2	0	0	12	0	0	0	0	0	0	0	5	0	0	0	27	0	0	1	0	1	15	0	0	0	0	0	
c-H-clinical blood	65	66	1	0	2	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
d-H-clinical fecal	78	83	1	0	0	3	1	0	1	1	0	0	3	0	0	0	1	11	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	
e-H-clinical respiratory, woun	40	43	0	0	0	3	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1	0	5	0	1	0	0	0	3	0	0	0	0	0	
f-H-broiler farming community	71	72	0	0	0	15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	23	0	0	0	0	0	
g-H-pig farming community	31	31	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
h-E-waste water	218	223	0	0	0	11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	8	0	0	1	0	6	0	0	0	0	0	1	
i-E-surface water non-recreati	88	88	0	0	0	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
j-E-surface water recreational	176	186	0	0	0	24	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	8	0	0	0	0	0	0	
k-F-chicken meat at retail	576	588	5	0	0	72	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	86	0	0	0	0	0	63	0	0	0	0	0	
l-F-chicken meat at slaughterh	165	169	0	0	0	49	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	32	0	0	0	0	0	60	0	0	0	0	0	0	
m-F-beef meat at retail	73	73	0	0	0	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	5	0	0	0	1	0	0	
n-F-veal meat at slaughterhous	56	56	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	
o-F-turkey meat at retail	46	46	0	0	0	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	
p-A-broilers	797	803	4	0	0	115	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	84	0	0	0	0	0	232	0	0	0	0	0	0	
q-A-laying hens	63	63	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	34	0	0	0	0	0	0	
r-A-dairy cattle	1203	1205	0	0	0	33	0	1	0	0	0	6	0	0	0	0	14	0	0	0	0	0	129	0	0	0	0	1	0	
s-A-veal calves	675	680	0	0	0	10	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	38	0	0	0	0	0	24	1	0	0	0	0	0	
t-A-pigs	388	388	0	0	0	6	0	0	1	0	0	0	0	2	0	0	75	0	0	0	0	0	17	0	0	1	0	0	0	
u-A-wild birds	65	66	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	14	0	0	0	0	0	0	
v-A-dogs	309	312	0	0	0	29	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	25	0	0	0	0	0	50	0	0	0	0	0	0	

5.14 ESBLAT geaffilieerde publicaties en promovendi

Publicaties

1. Dorado-García A, Smid JH, van Pelt W, Bonten MJM, Fluit AC, van den Bunt G, Wagenaar JA, Hordijk J, Dierikx CM, Veldman KT, de Koeijer A, Dohmen W, Schmitt H, Liakopoulos A, Pacholewicz E, Lam TJGM, Velthuis AG, Heuvelink A, Gonggrijp MA, van Duijkeren E, van Hoek AHAM, de Roda Husman AM, Blaak H, Havelaar AH, Mevius DJ, Heederik DJJ. Molecular relatedness of ESBL/AmpC-producing *Escherichia coli* from humans, animals, food and the environment: a pooled analysis. *J Antimicrob Chemother.* 2017 Nov 18.
2. Dohmen W, VAN Gompel L, Schmitt H, Liakopoulos A, Heres L, Urlings BA, Mevius D, Bonten MJM, Heederik DJJ. ESBL carriage in pig slaughterhouse workers is associated with occupational exposure. *Epidemiol Infect.* 2017 Jul;145(10):2003-2010.
3. Dohmen W, Dorado-García A, Bonten MJ, Wagenaar JA, Mevius D, Heederik DJ. Risk factors for ESBL-producing *Escherichia coli* on pig farms: A longitudinal study in the context of reduced use of antimicrobials. *PLoS One.* 2017 Mar 21;12(3):e0174094.
4. Evers EG, Pielaat A, Smid JH, van Duijkeren E, Vennemann FB, Wijnands LM, Chardon JE. Comparative Exposure Assessment of ESBL-Producing *Escherichia coli* through Meat Consumption. *PLoS One.* 2017 Jan 5;12(1):e0169589.
5. van den Bunt G, Liakopoulos A, Mevius DJ, Geurts Y, Fluit AC, Bonten MJ, Mughini-Gras L, van Pelt W. ESBL/AmpC-producing Enterobacteriaceae in households with children of preschool age: prevalence, risk factors and co-carriage. *J Antimicrob Chemother.* 2017 Feb;72(2):589-595. doi: 10.1093/jac/dkw443. Epub 2016 Oct 26.
6. Liakopoulos A, Mevius D, Ceccarelli D. A Review of SHV Extended-Spectrum β -Lactamases: Neglected Yet Ubiquitous. *Front Microbiol.* 2016 Sep 5;7:1374.
7. Koningstein M, Leenen MA, Mughini-Gras L, Scholts RM, van Huisstede-Vlaanderen KW, Enserink R, Zuidema R, Kooistra-Smid MA, Veldman K, Mevius D, van Pelt W. Prevalence and Risk Factors for Colonization With Extended-Spectrum Cephalosporin-Resistant *Escherichia coli* in Children Attending Daycare Centers: A Cohort Study in the Netherlands. *J Pediatric Infect Dis Soc.* 2015 Dec;4(4):e93-9.
8. Pacholewicz E, Liakopoulos A, Swart A, Gortemaker B, Dierikx C, Havelaar A, Schmitt H. Reduction of extended-spectrum- β -lactamase- and AmpC- β -lactamase-producing *Escherichia coli* through processing in two broiler chicken slaughterhouses. *Int J Food Microbiol.* 2015 Dec 23;215:57-63.
9. Baede VO, Broens EM, Spaninks MP, Timmerman AJ, Graveland H, Wagenaar JA, Duim B, Hordijk J. Raw pet food as a risk factor for shedding of extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in household cats. *PlosOne.* 2017 Nov 2;12(11):e0187239. Doi:10.1371/journal.pone.0187239

Promovendi

1. A. Dorado Garcia. Epidemiology of antimicrobial resistance and the effect of interventions in food-producing animals, 28-06-2016. Promoter: D. Heederik (IRAS), J. Wagenaar (I&I)
2. A. Liakopoulos. Living together in a world of extended-spectrum cephalosporin resistance: molecular snapshots of a complex epidemiology. 30-11-2017. Promoter: D. Mevius (WBVR)
3. W. Dohmen. Risk factors for ESBLs in pig production. Promoter D. Heederik (IRAS), M. Bonten (UMCU)
4. G. van den Bunt. Risk factors for ESBLs in humans. Promoter M. Bonten (UMCU)

