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

Carbapenemase-producerende Enterobacteriaceae (CPE) in het riool in Utrecht

RIVM Briefrapport 2019-0199
H. Blaak et al.

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

Carbapenemase-producerende Enterobacteriaceae (CPE) in het riool in Utrecht

RIVM Briefrapport 2019-0199
H. Blaak et al.

Colofon

© RIVM 2019
Delen uit deze publicatie mogen worden overgenomen op voorwaarde van bronvermelding: Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu (RIVM), de titel van de publicatie en het jaar van uitgave.

DOI 10.21945/RIVM-2019-0199

H. Blaak (auteur), RIVM
M.A. Kemper (auteur), RIVM
R. Schilperoort (auteur), Partners4UrbanWater
S.E. de Rijk (auteur), RIVM
A.M. de Roda Husman (auteur), RIVM
H. Schmitt (auteur), RIVM

Contact:
Hetty Blaak
Centrum Infectieziektenbestrijding\Zoönosen en Omgevingsmicrobiologie\Milieu
hetty.blaak@rivm.nl

Dit onderzoek werd verricht in opdracht van het ministerie van Volksgezondheid, Welzijn en Sport (VWS) in het kader van de aanpak antibioticaresistentie

Dit is een uitgave van:
Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu
Postbus 1 | 3720 BA Bilthoven
Nederland
www.rivm.nl

Publiekssamenvatting

Carbapenemase-producerende Enterobacteriaceae (CPE) in het riool in Utrecht

Bij metingen in het riool van zes woonwijken in Utrecht zijn bijzonder resistente bacteriën CPE (carbapenemase-producerende Enterobacteriaceae) aangetroffen. Dit betekent dat CPE voorkomen onder de bevolking, en niet alleen bij mensen in zorginstellingen. Rioolwateronderzoek blijkt een efficiënte methode om te kunnen bepalen of deze bacterie onder Nederlanders aanwezig is. Bovendien is deze methode niet belastend omdat mensen niet individueel onderzocht hoeven te worden. Dit blijkt uit onderzoek van het RIVM.

Het RIVM adviseert daarom om zeldzame resistente bacteriën ook in rioolwater te meten. Dan wordt op nationaal niveau duidelijk of en waar ongeveer mensen drager van CPE of van andere bijzonder resistente micro-organismen (BRMO) zijn.

In Nederland worden CPE nog maar af en toe bij mensen vastgesteld. Ze komen vaker voor in andere delen van de wereld, zoals Zuidoost Azië, Zuid-Europa en Noord-Afrika. Mensen die daar op reis zijn geweest, hebben de grootste kans om CPE te hebben. Dit is vooral het geval als ze daar in het ziekenhuis hebben gelegen.

Gezonde mensen worden meestal niet ziek van CPE. Kwetsbare mensen, zoals ouderen en ziekenhuispatiënten, kunnen dat wel. Ziekte door CPE is moeilijk te behandelen omdat ze resistent zijn tegen typen antibiotica die als laatste redmiddel worden gebruikt. Deze bacteriën vormen daardoor een bedreiging voor de volksgezondheid. Het is dan ook belangrijk dat deze resistente bacteriën zich niet verder verspreiden onder mensen, dieren en in het milieu.

Er bestaan verschillende typen van CPE. In afvalwater van woonwijken kwamen in dit onderzoek soms andere typen CPE voor dan in de onderzochte zorginstellingen. Door te vergelijken welke typen op verschillende plekken in het riool voorkomen, kan worden achterhaald hoe CPE zich onder mensen verspreiden. Deze informatie helpt om te voorkomen dat meer infecties optreden en de bacterie zich verspreidt.

Voor dit onderzoek heeft het RIVM rioolwater onderzocht op negen plekken in de stad Utrecht: in zes woonwijken en bij een ziekenhuis, verpleeghuis en asielzoekerscentrum. De rioolwaterzuiveringsinstallatie in Utrecht zuivert elke dag het afvalwater uit deze wijken en instellingen. Naast de 9 meetpunten zijn metingen uitgevoerd in het verzamelde rioolwater van de hele binnenstad van Utrecht dat bij de RWZI binnenkomt. Dit was nodig om te kijken of de 9 meetpunten representatief waren voor de hele stad.

Kernwoorden: antibioticaresistentie, carbapenemase-producerende Enterobacteriaceae (CPE), bijzonder resistente micro-organisme (BRMO), afvalwater, rioolwater, riool, stedelijk afvalwater, rioolwaterzuiveringsinstallatie (RWZI), algemene bevolking

Synopsis

Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae (CPE) in the sewers in Utrecht

Measurements carried out in sewage water from six residential neighbourhoods in Utrecht revealed the presence of particularly resistant CPE bacteria (carbapenemase-producing Enterobacteriaceae). This means that CPE are present in the general population, and not restricted to people in health care facilities. The analysis of sewage water has proven to be an efficient method for determining whether these bacteria are present in the general population. Also, this method is non-invasive, as people do not have to be individually examined. RIVM therefore recommends measurements in sewage water, as this makes it clear at a national level whether and where people are present who are carriers of CPE or other particularly resistant microorganisms (multi-drug-resistant organisms).

In the Netherlands, CPE are found to be present in human beings only infrequently. They are more common in other parts of the world, such as South East Asia, Southern Europe, and North Africa. People who have travelled to such countries, particularly if they have stayed in a local hospital, are more likely to be carrying CPE.

Although healthy people do not generally fall ill as a result of CPE, vulnerable persons such as the elderly and hospital patients can become sick. Diseases caused by CPE are difficult to treat because they are resistant to antibiotics that are used as last resort treatments. As a result, these resistant bacteria pose a threat to public health and it is therefore important that they do not spread any further among people, animals and in the environment.

There are various types of CPE. Different types of CPE were found in sewage from residential neighbourhoods compared to health care institutions . By comparing the CPE types found at different places in the sewer system, it is possible to determine how CPE spread within the population and how this can be prevented.

For the purposes of this study, sewage water from nine different locations in the city of Utrecht was analysed: in six residential neighbourhoods, a hospital, a nursing home, and an asylum seekers centre. The sewage treatment facility in Utrecht treats the wastewater from these neighbourhoods and institutions on a daily basis. In addition to the nine measuring points in the sewer system, RIVM also analysed the sewage water collected from the entire city centre of Utrecht that flows into the sewage treatment facility. This was done to check whether the measuring points chosen were representative for the entire city.

Keywords: antibiotic resistance, carbapenemase-producing Enterobacteriaceae (CPE), particularly resistant microorganisms (MDRO: multi-drug-resistant organisms), wastewater, sewage water, sewer system, urban wastewater, sewage treatment facility

Inhoudsopgave

Samenvatting — **9**

1 Inleiding — **11**
1.1 Aanleiding — 11
1.2 Doel — 11
1.3 Aanpak — 11
1.4 Achtergrond — 12
1.4.1 Klinische relevantie van CPE — 12
1.4.2 Prevalentie van CPE in Nederland en Europa — 12
1.4.3 Afvalwater surveillance van BRMO — 13

2 Methoden — **15**
2.1 Onderzoekslocaties — 15
2.1.1 RWZI Utrecht — 15
2.1.2 Stadswijken — 15
2.1.3 Instellingen — 19
2.1.4 Relatieve bijdrage van meetlocaties aan afvalwatervolume RWZI — 19
2.2 Monsternames — 20
2.3 Detectie en isolatie van verschillende CPE typen — 21
2.3.1 Detectie, isolatie en enumeratie van carbapanemase — producerende E. coli en K. pneumoniae — 21
2.3.2 Detectie en isolatie van overige carbapenemase — producerende Enterobacteriaceae species — 22
2.3.3 Enumeratie van totale E. coli en ESBL-producerende E. coli — 22
2.4 Enumeratie en isolatie van CPE — 22
2.5 Karakterisatie van CPE — 24
2.5.1 PCR en Sanger sequencing CPE — genen — 24
2.5.2 Hele genoom sequencing ("whole genome sequencing" of WGS) — 24
2.6 Berekenen van concentraties en vrachten — 25
2.6.1 Bepalen van concentraties — 25
2.6.2 Bacterievrachten — 26

3 Resultaten — **27**
3.1 Prevalentie en CPE typen in afvalwater — 27
3.1.1 RWZI influent — 27
3.1.2 Rioolwater in wijken en instellingen — 28
3.1.3 CPE typen in RWZI influent versus wijken en instellingen — 32
3.2 Sequentieanalyse hele genoom — 32
3.2.1 Selectie van isolaten — 33
3.2.2 "Whole genome MLST" (WG MLST) — 39
3.3 CPE concentraties in afvalwater — 43
3.4 CPE vrachten — 44

4 Discussie en conclusies — **47**

5 Conclusies en aanbevelingen — **55**

6 Dankwoord — **57**

7 Referenties — **59**

8 Bijlagen — 63
8.1 Details monstername — 63
8.2 Gebruikte primers voor moleculaire analyses — 66
8.3 CPE typen per meetpunt en meetmoment — 67

Samenvatting

Achtergrond
Carbapenems zijn belangrijke antibiotica voor de behandeling van infecties met bijzonder resistente micro-organismen (BRMO). Wanneer een infectie wordt veroorzaakt door bacteriën die resistent zijn tegen carbapenems zijn de mogelijkheden om met antibiotica te behandelen beperkt. Carbapenemresistentie komt onder andere voor bij *Enterobacteriaceae,* een groep van darmbacteriën (de carbapenemase-producerende *Enterobacteriaceae* of CPE). Verdere verspreiding van CPE onder de bevolking is niet wenselijk gezien de mogelijke dreiging voor de volksgezondheid. Daarom is onderzoek naar de verspreiding van CPE noodzakelijk.

In 2016 is het voorkomen van CPE in afvalwater van 100 gemeentelijke rioolwaterzuiveringsinstallaties (RWZI) onderzocht. Bij 89 van de 100 RWZIs werden CPE aangetroffen in het ruwe afvalwater (influent) en/of het gezuiverde afvalwater (effluent). Met het oog op maatregelen om verspreiding van CPE te verminderen is het van belang om vast te stellen wat de bijdrage is van ziekenhuizen (en andere zorginstellingen) en huishoudens aan CPE in afvalwater. Uit de studie bij RWZIs en een vervolgstudie uitgevoerd in 2017 in ziekenhuisafvalwater, bleek dat ziekenhuizen slechts een deel van de CPE in gemeentelijk afvalwater kunnen verklaren. Deze bevinding suggereert dat CPE dragerschap behalve in zorginstellingen ook in de algemene bevolking voorkomt. Metingen in afvalwater lijken een veelbelovende methode, zowel gevoelige als kosteneffectief, om CPE dragerschap in de algemene bevolking te onderzoeken.

Doel van het onderzoek
Het huidige onderzoek had als primair doel om CPE dragerschap in de algemene bevolking te bevestigen. Een tweede doel was om vast te stellen of rioolmetingen gebruikt kunnen worden om CPE dragerschap in kaart te brengen op microniveau (in dit geval wijkniveau), en daarmee om de correlatie tussen dragerschap en demografie te onderzoeken.

Aanpak
De aanwezigheid en concentraties van CPE zijn onderzocht in zes verschillende wijken in de stad Utrecht. Het afvalwater van deze wijken wordt met behulp van gemalen naar de RWZI Utrecht vervoerd, alwaar het gezuiverd wordt. Daarnaast werd het afvalwater van een ziekenhuis, een verpleeghuis en een asielzoekerscentrum bemonsterd (allen lozend op het riool in het verzamelgebied van de RWZI Utrecht). Met uitzondering van één locatie (het verpleeghuis) werd elke meetlocatie twee keer bemonsterd. Bij elke monstername werd tegelijkertijd het influent van de RWZI bemonsterd (in totaal 17 keer). In de monsters werden concentraties en vrachten CPE bepaald. De vrachten zijn de totale aantallen CPE die per etmaal op een bepaalde plek door het riool stromen. Daarnaast werden de typen CPE onderzocht met behulp van polymerasekettingreactie (PCR), sanger sequencing en hele genoom sequencing (WGS).

CPE in rioolwater
CPE werden in het riool van alle zes onderzochte wijken aangetroffen, als ook in het afvalwater van het ziekenhuis, verpleeghuis en asielzoekerscentrum. In totaal werden 28 verschillende CPE-typen gevonden gebaseerd op het carbapenemase-type en de bacteriesoort of genus: acht in de wijken, tien in het ziekenhuis, drie in het verpleeghuis, twee in het asielzoekercentrum, en 27 in de RWZI. De meest voorkomende CPE typen: OXA-48[1] *E. coli* en NDM-5 *E. coli*, werden respectievelijk in vijf en vier van de zes wijken aangetroffen.

De wijken verschilden onderling in hun relatieve bijdrage aan de verschillende CPE typen die in het stedelijk afvalwater voorkwamen. Dit verschil hangt mogelijk samen met verschillen in demografie. Sequentieanalyse van het hele genoom bevestigde dat CPE die in het stedelijk afvalwater van de RWZI werden gevonden afkomstig waren uit de diverse wijken en instellingen.

CPE met KPC-3 en GES-5 kwamen alleen in de zorginstellingen voor, terwijl CPE met NDM (NDM-1 en NDM-5) juist alleen in de wijken werden aangetroffen. CPE met carbapenemases van de OXA-48-genfamilie (OXA-48, OXA-181 en OXA-162) werden aangetroffen in verschillende wijken, het ziekenhuis en het asielzoekerscentrum. Onder de CPE waren diverse *Enterobacteriaceae*-soorten: *E. coli*, *K. pneumoniae*/*K. variicola*, *Citrobacter* spp., *Enterobacter* cloacae complex, *K. oxytoca*/*R. ornithinolytica* en *P. rettgeri*.

Conclusies
Het huidige onderzoek geeft aanvullend inzicht in de prevalentie van CPE dragerschap in Nederland. Door op wijkniveau te meten (overeenkomend met 3000 tot 15.000 inwoners) kon niet alleen worden bevestigd dat CPE voorkomen in de algemene bevolking, maar kon bovendien worden vastgesteld dat er binnen één stad meerdere CPE-dragers zijn in verschillende wijken. Tevens kon met dit onderzoek aangetoond worden dat er verschillen zijn in het voorkomen van specifieke CPE typen tussen wijken onderling en tussen wijken en zorginstellingen.

Het onderzoek toont aan dat met behulp van metingen in afvalwater het vóórkomen van CPE zowel op microschaal (door te meten in het rioolstelsel) als op macroschaal (door het meten bij RWZIs) efficiënt in kaart kan worden gebracht.

Metingen in afvalwater bieden daarmee een unieke mogelijkheid om inzicht te krijgen in de verspreiding en dynamiek van CPE-dragerschap binnen een gemeenschap. Deze kennis kan bijdragen aan het effectief inzetten van maatregelen om de verspreiding te beperken.

[1] Er bestaan verschillende families van carbapenemases waarvan KPC, NDM, GES en OXA-48 carbapenemases het meeste voorkomen bij *Enterobacteriaceae*. Binnen elke carbapenemasefamilie zijn weer verschillende typen beschreven. In Nederland zijn bij mensen eerder CPE aangetroffen met o.a. KPC-2 en KPC-3, NDM-1, NDM-5 en NDM-7, GES-5, OXA-48, OXA-181 en OXA-162.

1 Inleiding

1.1 Aanleiding

In een eerder uitgevoerd RIVM onderzoek naar carbapenemase-producerende Enterobacteriaceae (CPE) in afvalwater, bleek dat CPE voorkwamen bij 89% van 100 onderzochte rioolwaterzuiveringsinstallaties (RWZIs)(Schmitt et al. 2017). Omdat in Nederland tot dusver CPE vooral bij ziekenhuispatiënten zijn aangetroffen (Nethmap 2017, ECDC 2018), is het mogelijk dat zorginstellingen een belangrijke puntbron van deze resistente bacteriën zijn. Behalve onder mensen die recent naar Azië en Noord-Afrika hebben gereisd (Reuland et al. 2016, van Hattem et al. 2016) is CPE-dragerschap buiten gezondheidsinstellingen nog nauwelijks aangetoond bij Nederlanders (Reuland et al. 2013, van Hoek et al. 2015).

De aanwezigheid van CPE bij kleine RWZIs waar geen ziekenhuizen of andere zorginstellingen op aangesloten zijn toonde aan dat ziekenhuizen niet de enige bron van CPE zijn. Daarnaast bleken CPE concentraties in gemeentelijk afvalwater sterker gecorreleerd te zijn met de grootte van RWZIs (d.w.z. hoeveel afvalwater er verwerkt wordt en hoeveel huishoudens er op aangesloten zijn) dan met de aanwezigheid van ziekenhuizen in het RWZI gebied (Blaak et al. in voorbereiding). In overeenstemming hiermee bleek uit een vervolgstudie waarin behalve gemeentelijk afvalwater ook ziekenhuisafvalwater onderzocht werd, dat ziekenhuizen slechts een deel van de CPE in gemeentelijk afvalwater konden verklaren (Schmitt et al. 2018). Het aandeel van ziekenhuizen aan de CPE in gemeentelijk afvalwater varieerde per onderzochte plaats en voor verschillende soorten CPE typen. Deze resultaten lijken te bevestigen dat CPE inderdaad voorkomen bij mensen buiten zorginstellingen. Behalve reizigers kunnen dit mensen zijn die recent uit een ziekenhuis ontslagen zijn. Mogelijk verspreiden de CPE zich ook binnen de gemeenschap, bijvoorbeeld tussen leden van een huishouden. Dit laatste is eerder aangetoond in een studie bij reizigers (van Hattem et al. 2016).

1.2 Doel

Het huidige onderzoek had als primair doel om CPE dragerschap in de gemeenschap (huishoudens) te bevestigen. Een tweede doel was om vast te stellen of rioolmetingen gebruikt kunnen worden om CPE dragerschap in kaart te brengen op een microniveau - in dit geval wijkniveau - en daarmee om de relatie tussen dragerschap en demografie te onderzoeken.

1.3 Aanpak

Om CPE dragerschap in de gemeenschap vast te stellen werd het riool bemonsterd in zes verschillende wijken van Utrecht. Tussen de wijken onderling waren er verschillen wat betreft demografie. De exacte monsterlocaties werden geselecteerd op basis van eigenschappen van het rioolstelsel: er is bij voorkeur gekozen voor locaties die representatief zijn voor één specifieke wijk of deel van een wijk. Daarnaast is vanwege praktische overwegingen met name bemonsterd

bij rioolgemalen. Naast de zes locaties in het publieke rioolstelsel, is het afvalwater bij drie Utrechtse instellingen onderzocht: een ziekenhuis, een verpleeghuis en een asielzoekerscentrum. Bemonsterd is het punt in het afvalwatersysteem van deze instellingen vlak vóór dat het afvalwater het publieke riool instroomt. Alle meetlocaties in het riool maken deel uit van het stroomgebied van RWZI Utrecht.

Met uitzondering van het verpleeghuis dat één keer bemonsterd werd, werd elke onderzoekslocatie twee keer bemonsterd. Monsternames zijn uitgevoerd met zogenaamde automatische monsternameapparatuur. Vanuit praktische overwegingen werd er één locatie per keer bemonsterd, gedurende 48 uur (2 keer 24 uur). Bij elk tweede etmaal werd tegelijkertijd het influent van de RWZI bemonsterd (in totaal 17 keer).

Van de monsters werden de concentraties en vrachten CPE bepaald. Daarnaast werden de CPE isolaten getypeerd met behulp van polymerasekettingreactie (PCR), sanger sequencing en hele genoom sequencing (WGS).

1.4 Achtergrond

1.4.1 Klinische relevantie van CPE

Het vermogen om carbapenemases te produceren maakt bacteriën resistent tegen een hele groep van klinisch zeer relevante antibiotica, de beta-lactam antibiotica. Tot deze groep van antibiotica horen penicillinen, cefalosporinen en carbapenems. Daarnaast gaat resistentie tegen beta-lactam antibiotica ook vaak gepaard met resistentie tegen andere klassen van antibiotica. Dit maakt dat de mogelijkheden tot behandelen van infecties met CPE zeer beperkt zijn, mogelijk resulterend in sterfte (Doi and Paterson 2015, Tzouvelekis et al. 2014). Infecties met CPE worden daarom gezien als een bedreiging voor de volksgezondheid (Bell 2013, Tacconelli and Magrini 2017).

Tot de *Enterobacteriaceae* behoren bacteriesoorten die relatief onschadelijk zijn en van nature voorkomen in de darmen van mens en dier, zoals *E. coli*. De aanwezigheid van een niet-ziekteverwekkende CPE in darmen ("dragerschap") is op zich niet direct bedreigend voor iemand die dat heeft. De CPE verdwijnen vanzelf weer uit de darmen (van Hattem et al. 2016). Echter, bij mensen met een verminderde weerstand zoals ziekenhuispatiënten, kunnen ook relatief onschuldige *Enterobacteriaceae* tot infectie leiden. Daarnaast kan dragerschap bijdragen tot een verdere verspreiding van CPE binnen de gemeenschap.

1.4.2 Prevalentie van CPE in Nederland en Europa

De epidemiologische status van CPE verschilt tussen Europese landen: in sommige landen worden CPE alleen incidenteel gerapporteerd en alleen tijdens ziekenhuisuitbraken, in andere landen zijn CPE meer verspreid (Albiger et al. 2015). Nederland is een van de landen waar infecties met CPE nog sporadisch voorkomen en grotendeels beperkt zijn tot een enkele ziekenhuisuitbraak. In Nederland is dragerschap van CPE vooral geassocieerd met reizen en ziekenhuis opname in het buitenland (Nethmap/Maran 2018, Reuland et al. 2016, van Hattem et al. 2016). Dragerschap in de algemene bevolking wordt heel erg laag geschat,

gebaseerd op de afwezigheid van CPE in totaal ruim 1700 mensen die onderzocht zijn in twee bevolkingsstudies (Reuland et al. 2013, van Hattem et al. 2016, van Hoek et al. 2015). Deze studies geven mogelijk een onderschatting omdat gebruikt is gemaakt van selectieve media voor de isolatie van ESBL/AmpC-producerende *Enterobacteriaceae*, en niet alle CPE produceren ESBL (Blaak et al., in voorbereiding). Het lage dragerschap van CPE werd bevestigd door de gemeten lage CPE concentraties in het ruwe afvalwater bij RWZIs (Blaak et al. 2019, Schmitt et al. 2017). CPE concentraties in afvalwater waren namelijk ongeveer 300 keer lager dan ESBL-EC concentraties. Uitgaande van een ESBL prevalentie van 5% (ESBLAT 2018) en van een vergelijkbare uitscheiding van ESBL en CPE met ontlasting van asymptomatische dragers, werd de CPE prevalentie geschat op ongeveer 0,015% (of 1 op de 6700 personen)(Blaak et al in voorbereiding).

1.4.3 Afvalwater surveillance van BRMO

Als mensen drager zijn van CPE komen deze bacteriën, net als alle darmbacteriën, met de ontlasting in het riool terecht. Rioolwater wordt ingezameld in rioolstelsels en getransporteerd naar RWZIs waar het gezuiverd wordt. Huishoudens leveren het grootste deel van het afvalwater dat in Nederland in het riool terecht komt (71%). Het overige afvalwater (29%) komt van industrie en instellingen, waaronder gezondheidszorginstellingen (3.3%)(CBS 2011). Er zijn in Nederland verschillende typen rioleringsstelsels, die ruwweg op te delen zijn in twee varianten: gemengd (rioolwater en hemelwater komen in dezelfde leiding terecht) en gescheiden (rioolwater en hemelwater komen grotendeels in aparte leidingen terecht). Afhankelijk van het type rioleringsstelsel, is het afvalwater dus in meer of mindere mate gemengd met regenwater (en in sommige stelsels grondwater).

Naast uitwerpselen van mensen bevat rioolwater ook uitwerpselen van dieren, door lozingen vanuit landbouw, bosbouw en jacht (0.6%)(CBS 2011), van dieren die in het riool leven (bijvoorbeeld ratten) en van dieren die op straat poepen (bijvoorbeeld honden en vogels) en wat afspoelt naar het riool met regen. Hoewel er geen gegevens beschikbaar zijn van het niveau van contaminatie van rioolwater met dierlijke uitwerpselen, wordt het rioolwater verondersteld grotendeels van humane oorsprong te zijn en daarmee een mogelijkheid te bieden voor surveillance van humane darmpathogenen. Zo is afvalwater surveillance bijvoorbeeld toegevoegd als aanvullende surveillance tool om de verspreiding van poliovirus te monitoren in de wereldwijde inspanningen om het poliovirus uit te roeien (Asghar et al. 2014, WHO 2003). Het grote voordeel van afvalwater surveillance is dat het niet nodig is mensen om ontlastingsmonsters te vragen en individuele monsters te onderzoeken, wat zowel belastend als duur is. Dit is vooral een groot voordeel wanneer de gezochte organismen laag- prevalente pathogenen zijn in asymptomatische dragers.

Het eerdere RIVM onderzoek naar CPE bij RWZIs (Schmitt et al. 2017) bevestigde dat metingen in afvalwater een gevoelige methode zijn om zowel het vóórkomen als de geografische verspreiding van CPE in de populatie in kaart te brengen. Vooral grote, stedelijke RWZIs bleken meerdere typen CPE te bevatten, wat suggereert dat er in het verzamelgebied van dergelijke RWZIs meerdere CPE bronnen aanwezig

zijn. Dit werd bevestigd door metingen tegelijkertijd uit te voeren in ziekenhuisafvalwater en het afvalwater bij de ontvangende RWZI, waaruit bleek dat aangesloten ziekenhuizen slechts een deel van de CPE typen in het gemeentelijk afvalwater van de onderzochte plaatsen verklaarden (Schmitt et al. 2018). In het huidige onderzoek is met behulp van metingen in het rioolstelsel verder ingezoomd op de verspreiding van CPE, en van verschillende CPE-typen, binnen het verzamelgebied van een stedelijke RWZI.

2 Methoden

2.1 Onderzoekslocaties

2.1.1 RWZI Utrecht

De rioolwaterzuivering van Utrecht (figuur 2.1-1) ontvangt het afvalwater vanuit de stad Utrecht, ruwweg overeenkomstig met het gebied dat is ingeklemd tussen de N230 in het noorden, de A12 in het zuiden, de A2 in het westen en de A27 in het oosten (figuur 2.1-2). Bij droog weer ontvangt de RWZI gemiddeld ongeveer 38.500 m^3 afvalwater per dag (Korving et al. 2015). De maximale capaciteit van de RWZI is 12.500 m^3/uur (Korving et al. 2015). Het ruwe afvalwater (influent) wordt met behulp van een automatische sampler routinematig bemonsterd vlak na binnenkomst op de RWZI, na het punt waar grove delen mechanisch worden verwijderd.



Figuur 2.1-1. Luchtfoto van RWZI Utrecht. De foto is genomen tijdens de verbouwing die in 2017 is gestart.

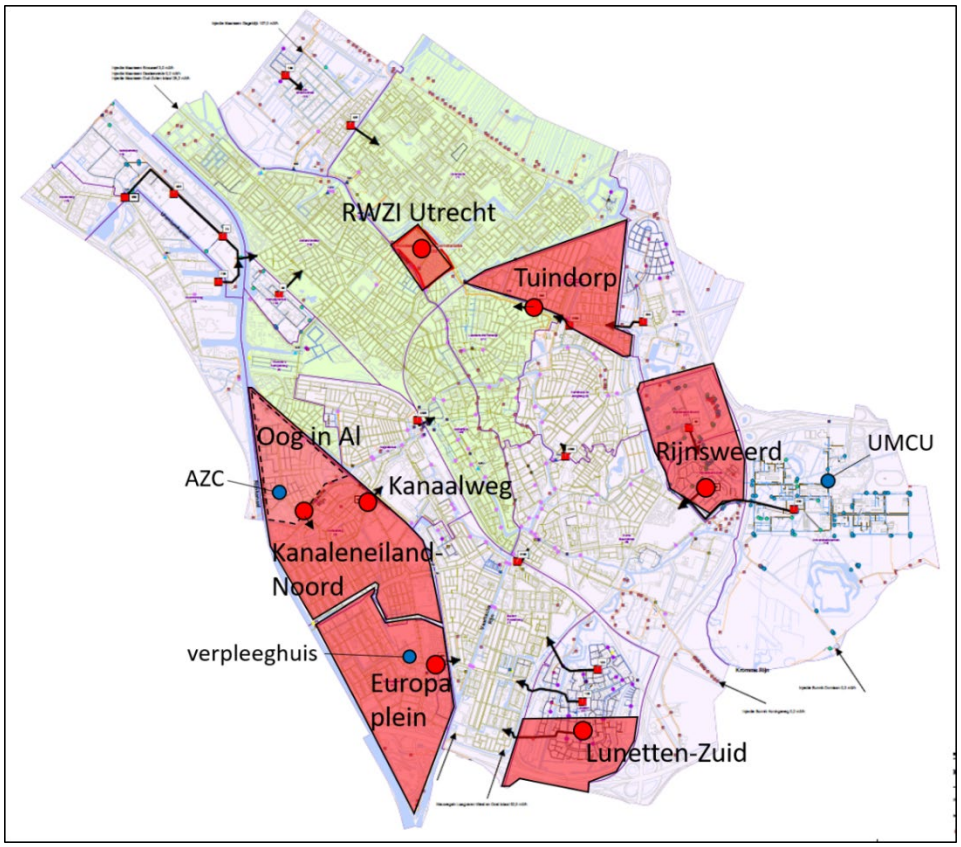
2.1.2 Stadswijken

De onderzoekslocaties werden voor deze studie geselecteerd op basis van eigenschappen van het rioolstelsel van Utrecht (figuur 2.1-2). Bij voorkeur zijn rioolgemalen gekozen als bemonsteringslocatie. De reden hiervoor is tweeledig: van deze locaties is bekend hoeveel rioolwater er dagelijks langs stroomt en het terrein is niet publiekelijk toegankelijk waardoor de gebruikte monsternameapparatuur (zie figuur 2.2-1) er relatief veilig kan staan. Daarbij is zoveel mogelijk gekozen voor locaties in de periferie van het rioolstelsel, dat wil zeggen waar het afvalwater van één of een beperkt aantal wijken wordt verzameld (zie figuur 2.1-2). Deze wijken zijn veelal demografisch homogener (ten opzichte van de gehele stad) waardoor de relatie tussen demografie en de

samenstelling van het afvalwater beter te bestuderen is. Uiteindelijk is gekozen voor vijf rioolgemalen:

1. gemaal Tuindorp: afvoer vanuit wijken Tuindorp, Tuindorp-Oost, Huizingalaan en Van Lieflandlaan-West,
2. gemaal Rijnsweerd-Zuid: afvoer uit Rijnsweerd, inclusief kantoren in Rijnsweerd-Noord,
3. gemaal Lunetten-Zuid: afvoer uit Lunetten-Zuid,
4. gemaal Europaplein: afvoer uit Kanaleneiland-Zuid en bedrijvengebied Kanaleneiland,
5. gemaal Kanaalweg: afvoer uit Kanaleneiland-Noord, Transwijk (Noord en Zuid), Welgelegen, den Hommel, Oog in Al en Halve Maan (Noord en Zuid).

De zesde onderzoekslocatie was een inspectieput in de wijk Oog en Al (afvoer van wijken Oog in Al, Halve Maan Noord en -Zuid). Dit gebied is tevens onderdeel van het stroomgebied van gemaal Kanaalweg. Deze locatie is toegevoegd om onderscheid te kunnen maken tussen de



Figuur 2.1-2. Kaart van het rioolstelsel van de stad Utrecht. Weergegeven is het deel van Utrecht wat op RWZI Utrecht (aangegeven met de rode rechthoek) loost. De bemonsterde stroomgebieden zijn in rood weergegeven, waarbij de rode cirkels de meetlocaties zijn. De bemonsterde instellingen zijn aangegeven met blauwe cirkels. Alle overige, niet bemonsterde rioolgemalen in het rioolstelsel zijn weergegeven als kleine rode vierkantjes.

demografisch sterk van elkaar verschillende gebieden Oog in Al en Kanaleneiland-Noord. In tabel 2.1-1 staan bevolkingsgegevens van de onderzochte wijken.

Tabel 2.1-1. Bevolkingsgegevens CBS van de wijken in onderzochte stroomgebieden[a]

	Tuindorp	**Rijnsweerd**	**Lunetten-Zuid**	**Europaplein**	**Kanaalweg[c]**	**Oog in Al[c]**	**Kanalen-eiland-Noord[c]**
Aantal inwoners	10900	3230	4266[b]	8870	22245	7225	15020
Leeftijdverdeling							
Personen 0 tot 15 jaar	18%	11%	17%	22%	18%	24%	15%
Personen 15 tot 25 jaar	20%	41%	14%	16%	17%	11%	20%
Personen 25 tot 45 jaar	24%	18%	32%	37%	34%	32%	35%
Personen 45 tot 65 jaar	23%	19%	29%	18%	18%	24%	15%
Personen 65 jaar en ouder	15%	11%	9%	8%	14%	10%	15%
Aantal huishoudens	5625	2220	2205 [b]	4175	11055	2915	8140
Type huishoudens							
Eenpersoonshuishoudens	54%	75%	52%	51%	54%	36%	61%
Huishoudens zonder kinderen	21%	13%	19%	18%	20%	23%	19%
Huishoudens met kinderen	25%	12%	29%	31%	25%	41%	19%
Inkomen							
Aantal inkomensontvangers	8500	2600	3420[b]	6400	16400	5000	11400
Inkomen per inkomensontvanger (x1000 euro)	41,3	36,2	30,6	22,8	30,3	45,8	23,5

	Tuindorp	Rijnsweerd	Lunetten-Zuid	Europaplein	Kanaalweg[c]	Oog in Al[c]	Kanalen-eiland-Noord[c]
Herkomst							
Westerse allochtonen	10%	16%	11%	10%	10%	10%	10%
Niet-westerse allochtonen	6,0%	6,5%	16%	64%	35%	16%	44%

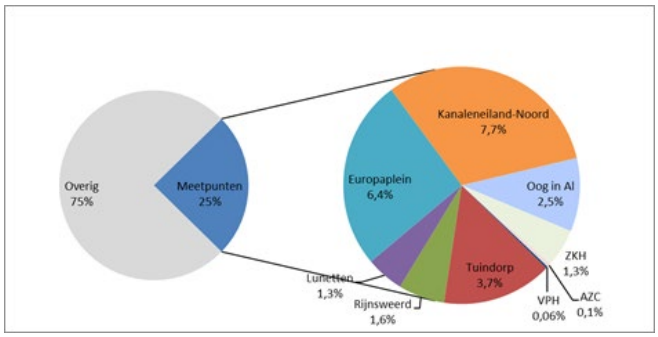
[a]Getallen afkomstig van CBS (CBS 2016). Voor rioolstroomgebieden die meerdere wijken omvatten zijn de CBS gegevens van de afzonderlijke wijken bij elkaar op geteld. De rioolstroomgebieden en indeling van wijken volgens CBS kunnen iets van elkaar afwijken. [b]Op de CBS data is een correctiefactor van 60% toegepast omdat ongeveer 60% van de wijk Lunetten-Zuid (volgens de definitie van het CBS) afvoert via gemaal Lunetten-Zuid. [c]Het gemaal Kanaalweg voert water af uit de wijken Kanaleneiland-Noord, Transwijk Welgelegen, den Hommel, Oog in Al en Halve Maan. Omdat het stroomgebied Oog in Al/Halve Maan ook apart bemonsterd is, zijn de gegevens voor Kanaleneiland-Noord/Transwijk/Welgelegen/den Hommel (verder aangegeven met Kanaleneiland-Noord) en Oog in Al/Halve Maan (verder aangegeven met Oog in Al) ook afzonderlijk weergegeven.

2.1.3 *Instellingen*

Naast de zes locaties in het publieke rioolstelsel, is het afvalwater bij drie Utrechtse instellingen onderzocht: een ziekenhuis, een verpleeghuis en een asielzoekerscentrum. In het afvalwater van dit ziekenhuis was tijdens een eerder uitgevoerd RIVM onderzoek (Schmitt et al. 2018) op meerdere tijdspunten CPE aangetoond. Verpleeghuizen zijn net als ziekenhuizen mogelijk zogenaamde "hotspots" van antibioticaresistentie, d.w.z. plekken waar relatief veel dragers van resistente bacteriën voorkomen (Rooney et al. 2009, Suetens et al. 2018). In 2018 is er een groot landelijk puntprevalentie-onderzoek uitgevoerd naar het vóórkomen van ESBL en CPE in verpleeghuizen. Bij één van de hieraan deelnemende verpleeghuizen in Utrecht is voor het huidige onderzoek afvalwater bemonsterd. Er is geen informatie beschikbaar over het vóórkomen van antibioticaresistente bacteriën bij bewoners van asielzoekerscentra (AZC). Omdat de bewoners afkomstig zijn uit landen buiten Europa en er een correlatie is tussen ESBL en CPE dragerschap en reizen naar het buitenland (Arcilla et al. 2017, Kuenzli et al. 2014, Reuland et al. 2016, Ruppe et al. 2015, van Hattem et al. 2016), is in het huidige onderzoek een AZC meegenomen bij wijze van een eerste, verkennende, meting. Bemonsterd is een punt in de afvalwaterafvoer vóórdat het afvalwater het publieke riool instroomt. Alle instellingen maken onderdeel uit van het stroomgebied van de RWZI Utrecht. Het afvalwater van twee van de instellingen stroomt uiteindelijk langs een van de monsterlocaties in het publieke riool: het afvalwater van het AZC stroomt langs de bemonsteringslocatie in Oog in Al (en vervolgens langs gemaal Kanaalweg), het afvalwater van het verpleeghuis stroomt langs het gemaal Europaplein.

2.1.4 *Relatieve bijdrage van meetlocaties aan afvalwatervolume RWZI*

Het aandeel van de verschillende meetlocaties aan de totale hoeveelheid water dat per droge dag op de RWZI binnen komt (het debiet) is weergegeven in figuur 2.1-3. De debieten zijn gebaseerd op historische metingen bij de vijf gemalen, het ziekenhuis en het AZC. Op de monsterlocatie in Oog in Al en bij het verpleeghuis waren geen debietmetingen beschikbaar. Op deze locaties zijn de debieten geschat op basis van een droogweerafvoer van 0,125 m^3 per persoon per dag en 7500 en 200 bewoners voor respectievelijk het Oog in Al stroomgebied en het verpleeghuis.



Figuur 2.1-3. Relatieve bijdrage van de meetlocaties aan de dagelijkse afvalwaterstroom dat bij RWZI binnenkomt op droge dagen. De bijdrage van meetlocatie Kanaalweg is opgesplitst in twee stroomgebieden: Kanaleneiland-Noord en Oog in Al.

De gemiddelde hoeveelheid afvalwater dat dagelijks langs de meetlocaties door het riool stroomde was gezamenlijk 25% van al het rioolwater dat op dezelfde dagen bij de RWZI binnenkwam. De meetlocaties Kanaalweg (Kanaleneiland-Noord en Oog in Al) en Europlein leverden de grootste bijdragen van de onderzochte meetlocaties. Dit is in overeenstemming met de omvang van het stroomgebied (en het aantal inwoners). De instellingen leverden een relatief kleine bijdrage aan het totale Utrechtse afvalwater.

2.2 Monsternames

Elke onderzoekslocatie werd twee keer bemonsterd, met uitzondering van het verpleeghuis dat één keer bemonsterd werd. Monsternames zijn uitgevoerd met behulp van automatische monsternameapparatuur (figuur 2.2-1). Met behulp van deze apparatuur zijn gedurende perioden van 24 uur vele 'hapjes' afvalwater genomen van het langsstromende afvalwater en verzameld in een vat. De apparatuur is geplaatst in een kast of een wagen, waarin de monsters gedurende monstername gekoeld blijven. Omdat er voor de zes wijken en het verpleeghuis één zogenaamde vacuümkast beschikbaar was, werd één locatie per keer bemonsterd, waarna de kast werd vervoerd en geïnstalleerd op een volgende plek. Per locatie is gedurende 48 uur bemonsterd: twee opeenvolgende etmalen, resulterend in twee mengmonsters van 24 uur. Na 48 uur monstername werden beide monsters overgegoten in steriele flessen en naar het laboratorium getransporteerd en binnen 24 uur verwerkt voor analyse. Bij elk tweede etmaal werd tegelijkertijd het influent van de RWZI bemonsterd met behulp van een monsterkast (in totaal 17 keer). Deze monstername werd uitgevoerd door medewerkers van de RWZI Utrecht. Ook deze monsters werden naar het lab vervoerd en binnen 24 uur verwerkt. Verdere details over de monstername zijn te vinden in bijlage 8.1.



Figuur 2.2-1. Gebruikte monsternameapparatuur: vacuümkasten (a en b) en een meetwagen (c). In figuur a en b is de binnenkant van de vacuümkasten te zien met daarin 4 tanks waarin het afvalwater werd opgevangen en gekoeld bewaard. Na 48 uur bemonsteren werden de vaten geleegd en de monsters overgegoten in flessen en naar het lab getransporteerd.

2.3 Detectie en isolatie van verschillende CPE typen

Voor de detectie en isolatie van CPE werden afvalwatermonsters binnen 24 uur na het afronden van de monstername gefiltreerd door membraanfilters met een poriegrootte van 0,45 µm. De filters werden vervolgens op selectieve kweekmedia geplaatst. De selectieve kweekmedia bevatten carbapenems, waardoor alleen carbapenem-resistente bacteriën er op kunnen groeien. Er werden drie verschillende media en twee verschillende incubatietemperaturen gebruikt om alle typen CPE te kunnen detecteren.

2.3.1 Detectie, isolatie en enumeratie van carbapanemase-producerende E. coli en K. pneumoniae

Voor de enumeratie van CPE werden ChromID CARBA agar en ChromID OXA48 agar gebruikt (beide media van Biomerieux, Amersfoort), en werd gekweekt bij een hoge incubatietemperatuur (44ºC). De hoge incubatietemperatuur is nodig om de groei van andere bacteriën dan *Enterobacteriaceae* (zogenaamde 'stoorflora') te remmen. Afvalwater bevat vaak carbapenem-resistente stoorflora, en deze bacteriën kunnen de groei van CPE remmen (concurrentie voor voedingstoffen in het medium) of CPE overgroeien (als ze in veel hogere aantallen voorkomen dan de CPE). Daarnaast kan de aanwezigheid van de zogenaamde 'stoorflora' er voor zorgen dat niet-resistente *Enterobacteriaceae* ook op

deze platen kunnen groeien (H. Blaak, niet gepubliceerde bevindingen). Door de groei van stoorflora wordt de telling van CPE minder betrouwbaar. Bij 44ºC kunnen *Enterobacteriaceae*, met name *E. coli* en *K. pneumoniae* goed groeien (Leclerc et al. 2001) in tegenstelling tot de meeste stoorflora, waardoor de methode beter geschikt is voor enumeratie. De twee typen medium: ChromID CARBA agar en ChromID OXA48 agar, verschillen in de specifieke samenstelling van carbapenem antibiotica die zijn toegevoegd. Door beide media te gebruiken kunnen alle typen CPE gedetecteerd worden.

Van elk monster werden vier verschillende volumes gefiltreerd (1, 3, 10 en 30 ml). De filters werden 4 tot 5 uur geïncubeerd bij 36±1°C, gevolgd door 21±3 uur bij 44±0.5°C.

2.3.2 Detectie en isolatie van overige carbapenemase-producerende Enterobacteriaceae species

In een eerder onderzoek werd gevonden dat de prevalentie van CPE van andere species dan *E. coli* en *K. pneumoniae* mogelijk wordt onderschat door de kweek bij 44ºC (H. Blaak, niet gepubliceerde bevindingen). Omdat de hoge temperatuur noodzakelijk is voor een betrouwbare telling is gekozen om naast de kweek bij 44ºC een aanvullende methode te gebruiken voor de detectie van overige CPE soorten. De reguliere temperatuur om darmbacteriën te kweken is 36±1ºC. Om bij deze temperatuur te kunnen kweken wordt een specifieke stof aan het medium toegevoegd dat bepaalde soorten stoorflora remt: cefsulodine. De remming van stoorflora door cefsulodine is echter minder efficiënt dan gebruik van een hoge temperatuur (H. Blaak, niet gepubliceerde bevindingen). Het gebruikte medium is, in tegenstelling tot ChromID CARBA agar en ChromID OXA48 agar, een zelf samengesteld medium en bestaat uit: Chromagar ECC (Chromagar, Parijs) met daaraan toegevoegd: 0,25 µg/ml meropenem, 70µg $ZNSO_4$, 250 µg/ml cloxacilline en 7,5 µg/ml cefsulodine. Dit medium wordt "modified SuperCARBA" genoemd, of "mSuperCarba".

Van elk monster werden vier verschillende volumes gefiltreerd (1, 3, 10 en 30 ml). De filters werden 18-24 uur geïncubeerd bij 37°C.

2.3.3 Enumeratie van totale E. coli en ESBL-producerende E. coli

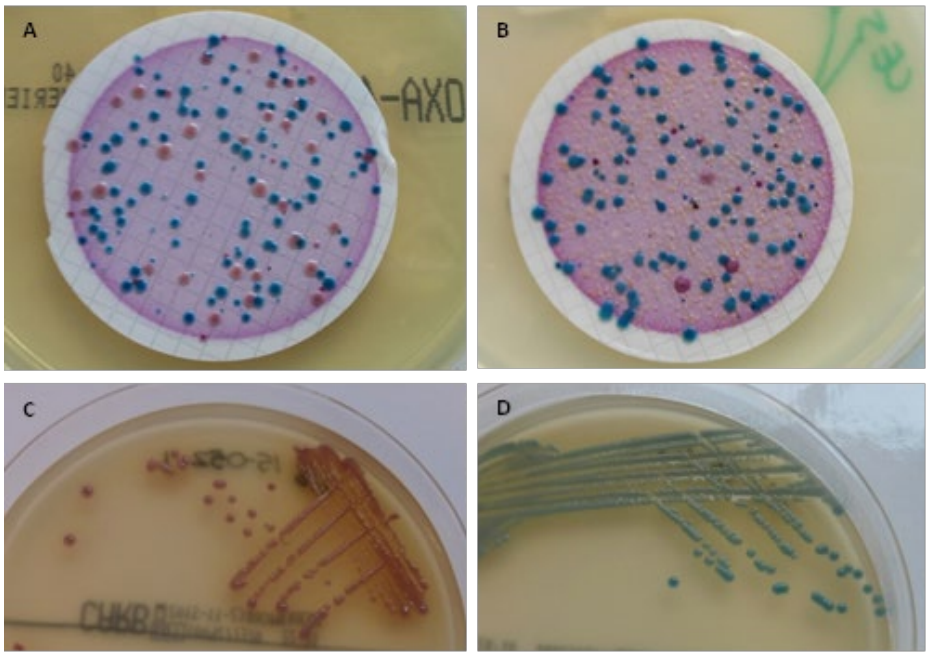
Als referentiekader voor de aantallen CPE in rioolwater werden ook de aantallen totale *E. coli* en ESBL-producerende *E. coli* bepaald. Dit werd gedaan door filters te plaatsen op respectievelijk Tryptone Bile X-glucuronide (TBX) agar en ChromID ESBL agar, en dit 4 tot 5 uur te incuberen bij 36±1°C, gevolgd door 21±3 uur bij 44±0.5°C.

2.4 Enumeratie en isolatie van CPE

Na incubatie van de filters op ChromID CARBA agar en ChromID OXA48 agar, werden de verdachte kolonies geteld. Op beide platen kleuren kolonies van *E. coli* roze en kleuren kolonies van Klebsiella, Citrobacter, Enterobacter en Serratia (KESC) blauw (figuur 2-4.1). Van beide type platen wordt een aantal van de representatieve kolonies rein gekweekt op het type plaat waarop ze geïsoleerd zijn. Isolaten met efficiënte groei

op deze platen werden gedefinieerd als resistent[2] en werden verder gekarakteriseerd. Ook op de TBX en ChromID ESBL-platen werden de kolonies geteld: *E. coli* zijn op TBX herkenbaar als groene kolonies en op ChromID ESBL agar als roze kolonies. Daarnaast werd een aantal kolonies afkomstig van mSuperCARBA reingestreken op mSuperCARBA en, indien resistentie bevestigd werd, verder gekarakteriseerd. Op mSuperCARBA zijn *E. coli* kolonies blauw en kolonies van soorten van de KESC-groep roze.

De identiteit van carbapenemase-producerende (CP) *E. coli* isolaten (n=478) is vastgesteld gebaseerd op de koloniekleur op de kweekmedia. De kleur roze wordt alleen verkregen door bacteriën die twee enzymen (beta-glucuronidase en beta-galactosidase) om kunnen zetten, wat een specifieke eigenschap is van *E. coli*. De specificiteit van deze methode werd bevestigd in eerdere studies waar 399 van 400 (99,8%) roze isolaten met behulp van MLST bevestigd werden als *E. coli*.



Figuur 2.4-1. Groei van E. coli en "KESC" kolonies op filters bebroed op ChromID OXA48 (A) en ChromID CARBA agar (B) en reincultures van een E. coli op ChromID OXA48 agar (C) en een K. pneumoniae op ChromID CARBA agar (D).

Alle CP-KESC isolaten afkomstig van ChromID OXA48 (n=98), ChromID CARBA (n=162) en mSuperCARBA (n=169) werden geïdentificeerd met behulp van Maldi-Tof. Met behulp van deze methode konden de *Enterobacteriaceae* geïdentificeerd worden tot op species of genus niveau: *C. freundii/C. youngae/C. braakii/C. gilleni* (=*Citrobacter* spp.), *E. aerogenes*, *E. asburiae*/*E. cloacae*/*E. kobei*/ *E. ludwigii* (=*Enterobacter* cloacae complex), *K. pneumoniae*/*K. variicola*, *K. oxytoca*/*R. ornithinolyitica*, *P. rettgeri*, en *S. marascens* (tabel 2.4-1).

[2] *Carbapenem-resistent wil hier zeggen "in staat om te groeien op media waaraan carbapenems zijn toegevoegd". Omdat de concentraties carbapenems in het medium niet openbaar bekend zijn, is de mate van resistentie van deze bacteriën ook niet bekend. Het is daarom ook onbekend of infecties met deze bacteriën wel of niet te behandelen zouden zijn met carbapenems, d.w.z. of deze bacteriën 'klinisch' resistent zijn.*

Tabel 2.4-1. Isolatie van KESC-CPE: opbrengst aan bacteriesoorten en genera.

	Aantal (%) op		
	ChromID OXA48/44ºC (n=98)	ChromID CARBA/44ºC (n=162)	mSuperCARBA /37ºC (n=169)
Citrobacter spp.	0 (0%)	0 (0%)	13 (7,7%)
E. aerogenes	0 (0%	10 (6,2%)	13 (7,7%)
Enterobacter cloacae complex	8 (8,2%)	23 (14,2%)	64 (37,9%)
K. pneumoniae/K. variicola	90 (91,8%)	129 (79,6%)	58 (34,3)
K. oxytoca/R. ornithinolyitica	0 (0%)	0 (0%)	3 (1,8%)
P. rettgeri	0 (0%)	0 (0%)	2 (1,2%)
S. marascens	0 (0%)	0 (0%)	1 (0,6%)
Totaal *Enterobacteriaceae*	98 (100%)	162 (100%)	154 (91%)
Non-Enterobacteriaceae	0 (0%)	0 (0%)	15 (8,9%)*****

*Alle isolaten *Aeromonas* spp.

2.5 Karakterisatie van CPE

2.5.1 PCR en Sanger sequencing CPE-genen

In totaal werden 908 carbapenem-resistente isolaten verkregen, waarvan 892 (98%) Enterobacteriaceae (CRE). Voor de CRE isolaten werd de aanwezigheid van carbapenemase-genen van de OXA-48-, NDM- en KPC-, VIM-, IMP- en GES familie onderzocht door middel van PCR (voor gebruikte primers zie bijlage 8.2). De sequenties van de carbapenemase-genen zijn bepaald door middel van sanger sequencing (voor gebruikte primers zie bijlage 8.2) en met behulp van Bionumerics software (versie 7.6.3; Applied Maths, Sint-Martens-Latum, België). Op deze manier werd voor 816 (91%) van de CRE isolaten bevestigd dat ze een carbapenemase-gen hebben: voor 475 (58%) *E. coli*, 250 (31%) *K. pneumoniae*/*K. variicola*, 74 (9,1%) *Enterobacter* cloacae complex, 13 (1,6%) *Citrobacter* spp, 2 (0,2%) *K. oxytica*/*R. ornitholytica* en 2 (0,2%) *P. rettgeri*. Carbapenem-resistente isolaten met een carbapenemase-gen werden als CPE beschouwd.

2.5.2 Hele genoom sequencing ("whole genome sequencing" of WGS)

Het belangrijkste doel van WGS analyse was om te bevestigen of isolaten van hetzelfde CPE-type (voor wat betreft species en CP-gen) afkomstig uit verschillende monsters al dan niet identiek zijn en zo ja, hoe vaak. Van de in totaal 816 verkregen CPE isolaten kon binnen het kader van dit onderzoek slechts een klein deel (<10%) geanalyseerd worden met WGS. Er is daarom in de eerste plaats gekozen de analyse te beperken tot een deel van de gevonden CPE-typen: NDM-1-, NDM-5, KPC-3-, GES-5- en OXA-181-positive *E. coli* en van NDM-1- en KPC-3-positieve *K.pneumoniae*/*K. variicola* isolaten. Uit isolaten van deze CPE-typen is vervolgens weer een selectie gemaakt. Hiervoor zijn de isolaten eerst verder onderzocht voor wat betreft aan- of afwezigheid van ESBL-genen (blaCTX-M voor *E. coli* en *Klebsiella*, blaSHV/blaTEM-gen voor *Klebsiella* isolaten) en fylogenetische groep (*E. coli*). De aan- of afwezigheid van ESBL-genen was onderzocht met behulp van de PCR beschreven door Dallenne et al. (Dallenne et al. 2010), de fylogroep PCR was uitgevoerd zoals beschreven door Doumith et al. (Doumith et al. 2012)(zie bijlage 8.2). De resultaten van deze tests gaven aan welke isolaten van eenzelfde CPE-type met grotere waarschijnlijkheid identiek waren en welke in ieder geval niet hetzelfde waren.

CPE-typen die in het huidige onderzoek bij voorbaat niet in aanmerking kwamen voor WGS waren typen die óf slechts relatief weinig voorkwamen (met name andere species dan *E. coli* en *K. pneumoniae*), of typen waar gebaseerd op resultaten uit eerder onderzoek (Schmitt et al. 2017) zodanig veel variatie verwacht werd dat ze minder geschikt waren voor het beoogde doel (OXA-48-positieve *E. coli*).

Voor de uiteindelijke selectie van 71 isolaten (54 *E. coli* en 17 *K. pneumoniae*) is het hele genoom gesequenced met behulp van een Illumina HiSeq 2500 (uitgevoerd door BaseClear, Leiden). De verkregen "reads" zijn geassembleerd met behulp van de "WGS tools plugin" in Bionumerics software 7.6.3 (Applied Maths). Met behulp van dezelfde software zijn op het hele genoom conventionele MLST (gebaseerd op 7 loci) en "whole genome" MLST (wgMLST, gebaseerd op 7572 loci en 7381 loci voor respectievelijk *E. coli* en *K. pneumoniae*) analyses uitgevoerd.

2.6 Berekenen van concentraties en vrachten

2.6.1 Bepalen van concentraties

Met behulp van de aantallen roze en blauwe kolonies die op de filters op beide typen media geteld werden, werd de concentratie berekend volgens de volgende formule:

$$C = \frac{\sum N1 \ldots N4}{\sum V1 \ldots V4} = \frac{Ntot}{Vtot}$$

Waarbij N1 t/m N4 het aantal kolonies is op filter 1 t/m 4, Ntot het totaal aantal kolonies, V1 t/m V4 het gefiltreerde volume 1 t/m 4 en Vtot het totaal gefiltreerde volume. Dit wordt voor de 4 verschillende typen kolonies apart gedaan, resulterend in vier concentraties: $C_{roze/carba}$, $C_{roze/OXA48}$, $C_{blauw/carba}$ en $C_{blauw/OXA48}$. De concentratie wordt uitgedrukt in het aantal "kolonievormende eenheden"(KVE) per volume-eenheid. De concentraties *E. coli* en ESBL-producerende *E. coli* concentraties werden op dezelfde manier uitgerekend, gebaseerd op de kolonieaantallen op TBX en ChromID ESBL agar.

Een deel van de op de filters gegroeide kolonies is gecontroleerd en bevestigd op groei op de specifieke media. Hiermee is de concentratie resistente bacteriën (C_{res}) berekend:

$$C_{res} = \frac{N_{tot} \times \%bevestigd\ resistent}{V_{tot}} = \frac{Nres}{Vtot}$$

Waarbij Nres het aantal bevestigde resistente bacteriën is.

Tenslotte is de concentratie CPE berekend, gebaseerd op het percentage isolaten met een carbapenemase-gen. De twee gebruikte kweekmedia zijn geschikt voor de isolatie van verschillende typen CPE: ChromID OXA48 voor de isolatie van CPE met een OXA-48-gen, en ChromID CARBA voor de isolatie van CPE met overige typen carbapenemase-genen (KPC, NDM, VIM, IMP, GES). Om deze reden werden de concentraties voor CPE met OXA-48 type carbapenemase-genen en van CPE met andere typen genen apart berekend, gebruikmakend van de volgende formules:

$$C_{CP\ E.\ coli} = \frac{(Nroze \times \%OXA48pos)ChromIDOXA48}{(Vtot)ChromIDOXA48} + \frac{(Nroze \times \%\ NDM,KPC,GESpos)ChromIDCARBA}{(Vtot)ChromIDCARBA}$$

$$C_{CP\ KESC} = \frac{(Nblauw \times \%OXA48pos)ChromIDOXA48}{(Vtot)ChromIDOXA48} + \frac{(Nblauw \times \%\ NDM,KPC,GESpos)ChromIDCARBA}{(Vtot)ChromIDCARBA}$$

Waarbij %OXA48pos betekent het percentage isolaten met een OXA-48-achtig carbapenemase-gen, en %NDM,KPC,GESpos betekent het percentage isolaten met een KPC-, NDM-, of GES-type carbapenemase-gen; isolaten met VIM- of IMP-genen werden niet aangetroffen. Concentraties CP *K. pneumoniae* zijn berekend, door het aantal blauwe kolonies tenslotte nog te vermenigvuldigen met het percentage isolaten dat als *K. pneumoniae/K. variicola* geïdentificeerd is.

Voor het vergelijken van concentraties tussen locaties is het geometrische gemiddelde gebruikt. Dit wil zeggen dat de waarden eerst log-getransformeerd zijn voor het berekenen van het gemiddelde. Impliciet betekent dat dat nul-waarden (negatieve monsters) niet zijn meegerekend in de gemiddelden.

2.6.2 Bacterievrachten

De bacterievracht is het totale aantal bacteriën dat per tijdseenheid op een meetlocatie aanwezig is of, in het geval van stromend water, langs stroomt. In de huidige studie is de vracht per 24 uur berekend. Dat is gedaan door de concentratie bacteriën in het afvalwater (bemonsterd gedurende 24 uur) te vermenigvuldigen met de hoeveelheid afvalwater (volume) dat in die 24 uur op de meetlocatie is langs gestroomd. Door de vrachten CPE in de rioolmonsters te vergelijken met de vrachten CPE die op dat moment bij de RWZI binnenkomen kan geschat worden in welke mate de verschillende locaties op het meetmoment bijdroegen aan de aanwezigheid van CPE in het rioolwater bij de RWZI. Deze "relatieve vrachten" zijn berekend door voor elk meetmoment de ratio tussen de vracht op de meetlocatie (het geometrisch gemiddelde van 48 uur) en de vracht bij de RWZI (24 uur) te berekenen. Vervolgens is het gemiddelde van de twee ratio's van twee meetmomenten genomen.

3 Resultaten

3.1 Prevalentie en CPE typen in afvalwater

3.1.1 RWZI influent

In het influent (ruwe afvalwater) van de RWZI werden op alle 17 monsternamedagen CPE aangetroffen. Op elke monsternamedag waren meerdere (6 tot 13) verschillende CPE-typen in het water aanwezig wat betreft het carbapenemase-gen en de bacteriesoort (tabel 3.1-1). De meest frequent gedetecteerde CPE-typen waren OXA-48-*E. coli* en OXA-48-*K. pneumoniae/variicola*; deze werden in alle monsters aangetroffen. Andere zeer frequent voorkomende typen waren GES-5- *E. coli* (in 16 monsters), NDM-5-*E. coli* (in 15 monsters) en KPC-3-*K. pneumoniae*/*variicola* (in 15 monsters).

Tabel 3.1-1. Gedetecteerde CPE-typen in RWZI influent.

CARBA gen	Monsternamedatum 5-6-2018	12-6-2018	19-6-2018	26-6-2018	3-7-2018	10-7-2018	17-7-2018	28-8-2018	25-9-2018	2-10-2018	16-10-2018	23-10-2018	24-10-2018	30-10-2018	6-11-2018	13-11-2018	20-11-2018	Totaal aantal positieve monsters	Totaal % positieve monsters
Citrobacter spp.																			
GES-5									■		■	■			■		■	5	29%
KPC-3														■				1	6%
KPC-3 & GES-5						■												1	6%
OXA-48						■	■			■		■						4	24%
E. coli																			
GES-5	■	■	■	■	■	■	■	■		■	■	■	■	■	■	■	■	16	94%
GES-5_1mm					■										■	■	■	4	24%
KPC-3			■		■	■	■					■		■	■	■		8	47%
NDM-4			■															1	6%
NDM-5	■	■	■	■	■		■		■	■	■	■	■	■	■	■	■	15	88%
OXA-162	■	■																2	12%
OXA-181		■	■	■		■	■	■		■		■		■	■			10	59%
OXA-48	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	17	100%
Enterobacter cloacae complex																			
GES-5	■		■			■	■		■	■			■	■	■	■		10	59%
KPC-3			■			■		■										3	18%
KPC-3 & GES-5			■		■	■	■			■					■	■		7	41%
KPC-3 & GES-5, GES-6																■	■	2	12%
NDM-1				■														1	6%
OXA-48		■							■	■								3	18%
K. oxytoca/R. ornithinolytica																			
KPC-3	■																	1	6%
KPC-3 & GES-5	■																	1	6%
K. pneumoniae/variicola																			
GES-5								■	■	■	■	■	■	■	■		■	9	53%
KPC-3	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■		■		■	■	■	■	15	88%
NDM-1				■	■	■												3	18%
OXA-162	■						■											2	12%
OXA-181			■	■					■							■		4	24%
OXA-48	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	17	100%
P. rettgeri																			
KPC-3												■			■			2	12%
	10	8	12	9	9	12	11	7	9	11	6	11	6	10	13	11	9		

3.1.2 Rioolwater in wijken en instellingen

In het riool van de zes onderzochte Utrechtse wijken werden frequent CPE aangetroffen: 87% (20/23) van de rioolmonsters was positief, en in elke wijk werd minstens één keer CPE gevonden (tabel 3.1-2). Per wijk

en per monsternamedag varieerde het aantal verschillende CPE-typen tussen één en zes. In de meeste gevallen werden de in het riool aanwezige CPE-typen in beide van de twee opeenvolgende 24-uurs monsters gevonden. De grootste variatie werd aangetroffen op meetlocaties Europaplein (met zes varianten in het eerste monsterpaar) en Kanaalweg (met vijf varianten in het tweede monsterpaar). Alles bij elkaar waren de meest voorkomende CPE typen in wijken OXA-48 *E. coli* (57%), gevolgd door NDM-5 *E. coli* (48%) en OXA-181 *E. coli* (35%).

Bij de drie onderzochte instellingen werd in alle tien afvalwatermonsters CPE aangetroffen. De variatie was het grootst in het ziekenhuis, waar per monster zes tot acht verschillende typen werden gevonden. De meest voorkomende CPE typen waren GES-5 en OXA-48 *E. coli* (beide in 60% van de monsters), en KPC-3 *K. pneumoniae*/*variicola* (in 50% van de monsters).

NDM-1- en NDM-5-positieve CPE werden aangetroffen in de wijken (in respectievelijk één en vier wijken), terwijl KPC-3- en GES-5-CPE bij het ziekenhuis en het verpleeghuis gevonden werden. OXA-48 en OXA-181-positieve CPE kwamen voor in zowel wijken (alle zes) als bij het ziekenhuis en het AZC.

Tabel 3.1-2. Gedetecteerde CPE typen in riool en wijken en bij instellingen.(tabel bestaat uit twee delen)

	Wijken																									
	Europaplein				Kanaalweg				Lunetten-Zuid				Oog in al				Rijns-weerd-Zuid			Tuindorp				Totaal aantal positieve monsters	Totaal % positieve monsters
CARBAgen	25-6-2018	26-6-2018	22-10-2018	23-10-2018	2-7-2018	3-7-2018	29-10-2018	30-10-2018	18-6-2018	19-6-2018	15-10-2018	16-10-2018	9-7-2018	10-7-2018	5-11-2018	6-11-2018	11-6-2018	1-10-2018	2-10-2018	4-6-2018	5-6-2018	24-9-2018	25-9-2018		
Citrobacter spp.																									
OXA-48																								0	0,0%
E. coli																									
GES-5																								0	0,0%
GES-5_1mm																								0	0,0%
KPC-3																								0	0,0%
NDM-1	■	■																						2	8,7%
NDM-5					■	■	■	■			■	■	■	■			■	■	■					11	48%
OXA-181	■	■	■				■	■					■									■	■	8	35%
OXA-48	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■						■	■		■					13	57%
Enterobacter cloacae complex																									
GES-5																								0	0,0%
KPC-3																								0	0,0%
KPC-3, GES-5																								0	0,0%
KPC-3, GES-5, ges-6																								0	0,0%
NDM-1	■	■																						2	8,7%
OXA-48							■	■					■											3	13%
K. pneumoniae/variicola																									
KPC-3																								0	0,0%
NDM-1	■	■																						2	8,7%
OXA-48	■				■	■	■	■								■								6	26%
Totaal aantal typen	6	5	2	1	3	3	5	5	1	1	1	1	3	1	0	2	2	1	2	0	0	1	1	20	87%

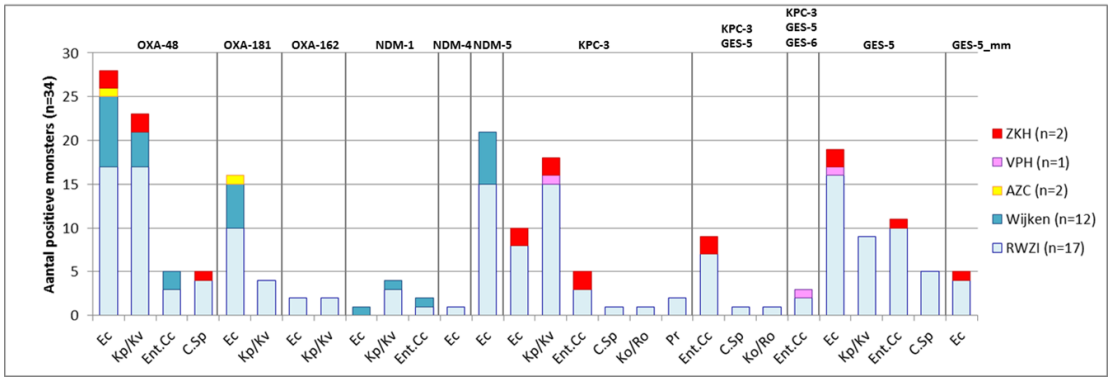
(vervolg)

CARBAgen	Instellingen: Ziekenhuis 16-7-2018	Ziekenhuis 17-7-2018	Ziekenhuis 12-11-2018	Ziekenhuis 13-11-2018	Verpleeghuis 19-11-2018	Verpleeghuis 20-11-2018	AZC 27-8-2018	AZC 28-8-2018	AZC 21-11-2018	AZC 20-11-2018	Totaal aantal positieve monsters	Totaal % positieve monsters
Citrobacter spp.												
OXA-48											1	10%
E. coli												
GES-5											6	60%
GES-5_1mm											2	20%
KPC-3											3	30%
NDM-1											0	0,0%
NDM-5											0	0,0%
OXA-181											2	20%
OXA-48											6	60%
Enterobacter cloacae complex												
GES-5											2	20%
KPC-3											2	20%
KPC-3, GES-5											4	40%
KPC-3, GES-5, ges-6											2	20%
NDM-1											0	0,0%
OXA-48											0	0,0%
K. pneumoniae/variicola												
KPC-3											5	50%
NDM-1											0	0,0%
OXA-48											4	40%
Totaal aantal typen	8	8	6	8	3	1	1	1	1	1	9	100%

3.1.3 *CPE typen in RWZI influent versus wijken en instellingen*

In totaal werden 28 verschillende CPE-typen gevonden, gebaseerd op bacteriesoort en carbapenemase-gen. Van deze 28 typen werden 27 in het ruwe RWZI afvalwater aangetroffen (tabel 3.1-1) en 17 op de onderzochte meetlocaties in de wijken en bij de instellingen (tabel 3.1-2). Van de 17 typen die op de rioollocaties werden gevonden werden er 16 ook in de RWZI gevonden (figuur 3.1-1). Eén CPE type, een NDM-1 *E. coli*, werd wel in het riool van een van de wijken (Europaplein) aangetroffen, maar niet bij de RWZI. Bij de RWZI werden echter wel *K. pneumoniae/K. variicola* en *Enterobacter cloacae* spp. met NDM-1 aangetroffen. Deze CPE waren op hetzelfde meetmoment óók in het riool van deze wijk aanwezig (bijlage 8.3).

In totaal werden 11 van de CPE typen die bij de RWZI werden aangetroffen op geen enkel moment gevonden in de onderzochte wijken en instellingen (figuur 3.1-1). Dit kan betekenen dat er in de stad nog andere bronnen van CPE zijn (geweest) dan de onderzochte locaties. Echter, vanwege de alternerende metingen in het riool is het ook mogelijk dat deze typen wel op enig moment op de onderzochte locaties aanwezig zijn geweest, maar niet op het moment dat ze bemonsterd zijn.



Figuur 3.1-1. Afvalwater CPE typen gebaseerd op het carbapenemase gen en de bacteriesoort/genus. Weergegeven is het aantal monsters of monsterparen (d.w.z. een set van twee opeenvolgende etmalen) waarin de aangegeven CPE typen werden gevonden, per type afvalwater: RWZI (lichtblauw), wijken (turquoise), ziekenhuis (rood), verpleeghuis (roze), en asielzoekerscentrum (geel). Ec = E. coli, Kp/Kv = K. pneumoniae of K. variicola, Ent. Cc = Enterobacter cloacae complex, C.Sp = Citrobacter spp., Ko/Ro = K. oxytoca/R.ornithinolytica, Pr = P. rettgeri.

3.2 Sequentieanalyse hele genoom

Wanneer het aantal verschillende CPE-typen per meetmoment en meetlocatie voor alle meetmomenten/-locaties bij elkaar werd opgeteld resulteerde dat in 50 afzonderlijke CPE-detecties in het riool van wijken en instellingen (zie bijlage 8.3). In 43 (86%) van deze gevallen werd hetzelfde CPE type op hetzelfde meetmoment ook in de RWZI aangetroffen (zie bijlage 8.3). Deze bevinding suggereert dat RWZI influent een representatief beeld geeft van CPE die op verschillende plekken in de stad naar het riool worden uitgescheiden. Om te bevestigen dat CPE varianten in het RWZI influent terug te traceren zijn naar bepaalde wijken en instellingen is een selectie van isolaten

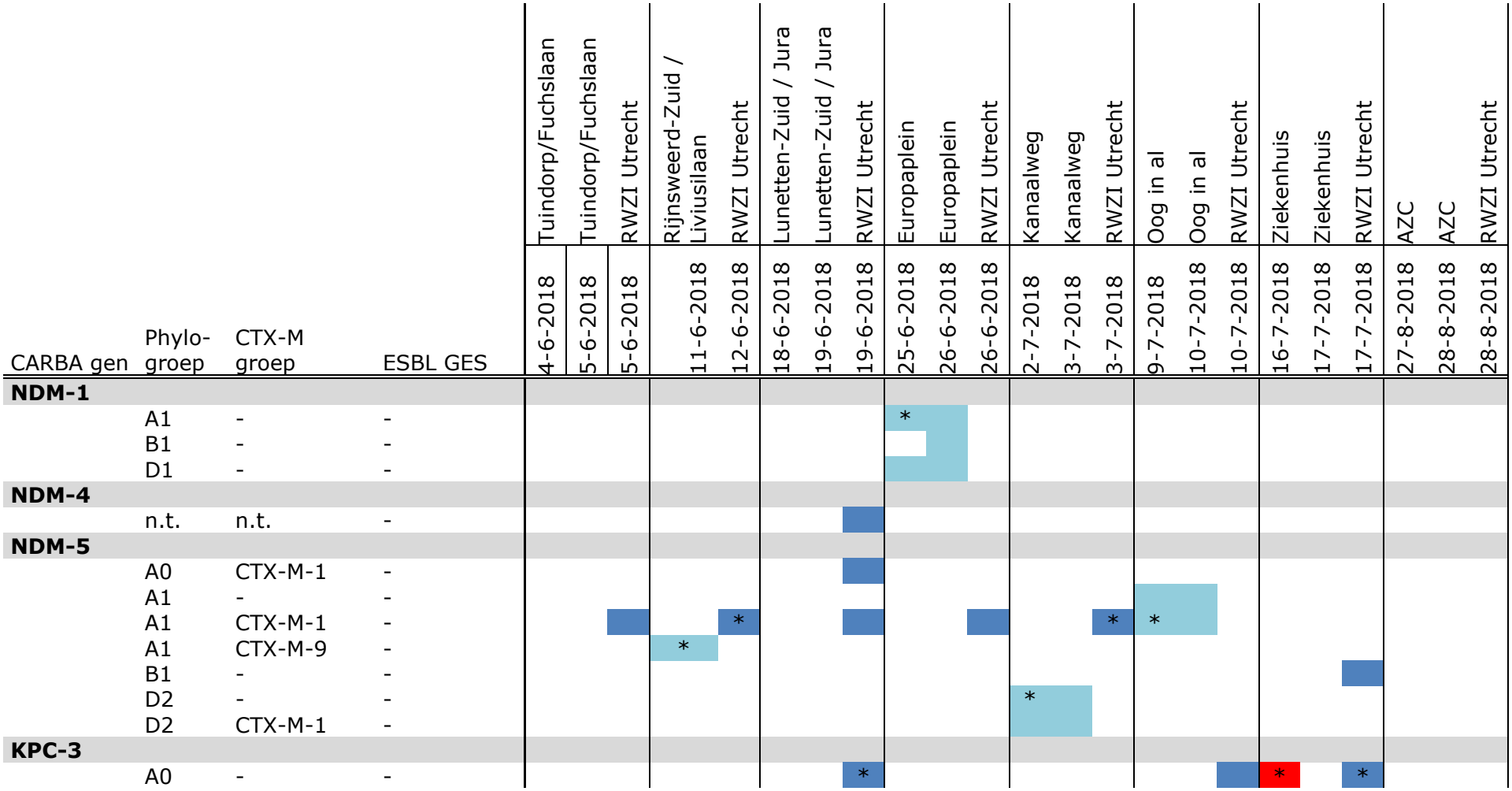
gekarakteriseerd met behulp van sequentieanalyse van het hele genoom ("whole genome sequencing" of "WGS"). Daarnaast werd WGS gebruikt om te onderzoeken of het voorkomen van eenzelfde CPE-type op één plek op verschillende meetmomenten betekent dat één variant langdurig aanwezig is in het riool, of dat er sprake is van achtereenvolgens verschillende varianten van dezelfde species met hetzelfde carbapenemase-gen.

3.2.1 Selectie van isolaten

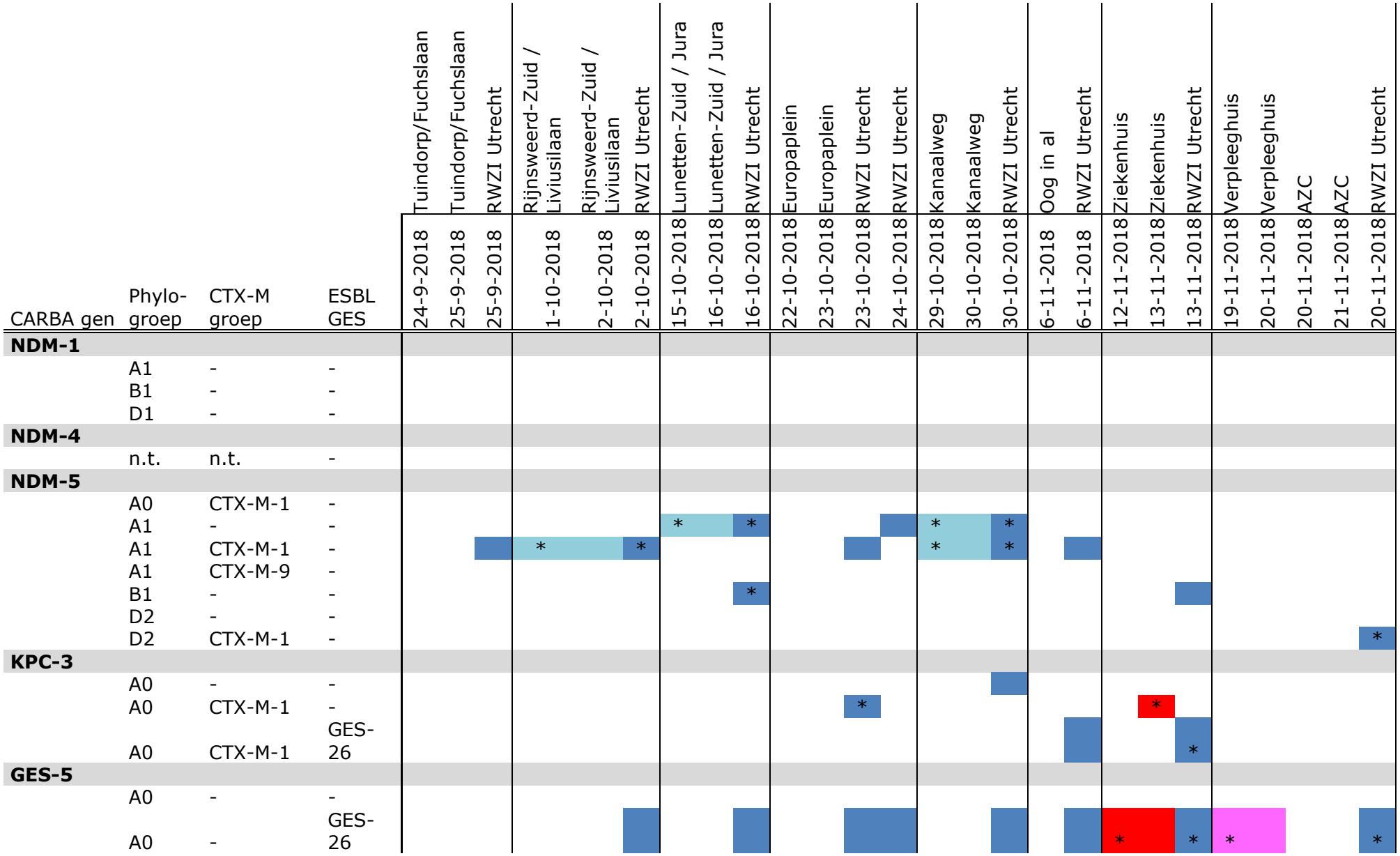
Voor de WGS analyse is een selectie gemaakt uit NDM-1-, NDM-5, KPC-3-, GES-5- en OXA-181-positive *E. coli* en NDM-1- en KPC-3-positieve *K.pneumoniae/K. variicola* isolaten. Om een weloverwogen keuze te maken zijn isolaten van te voren gedeeltelijk gekarakteriseerd: *E. coli* zijn getest op de aanwezigheid van blaCTXM-genen en op fylogroep, *K. pneumoniae* zijn getest op de aanwezigheid van blaCTXM-, blaTEM-, blaSHV- en blaOXA-genen. Hiermee werd variatie aangetoond tussen isolaten van dezelfde species en met hetzelfde CP-gen, zowel binnen één monster als tussen monsters (tabel 3-4.1 en 3-4.2). Gebaseerd op de resultaten van deze analyses zijn vervolgens overeenkomstige isolaten gekozen uit RWZI influent en uit wijk- of instellingsmonsters van hetzelfde meetmoment, of uit monsters van één locatie genomen op verschillende meetmomenten. Daarnaast is een aantal isolaten met eenzelfde CP-gen maar verschillend in andere onderzochte markers geselecteerd. In totaal zijn 54 *E. coli* stammen en 17 *K. pneumoniae* stammen gekarakteriseerd met behulp van WGS.

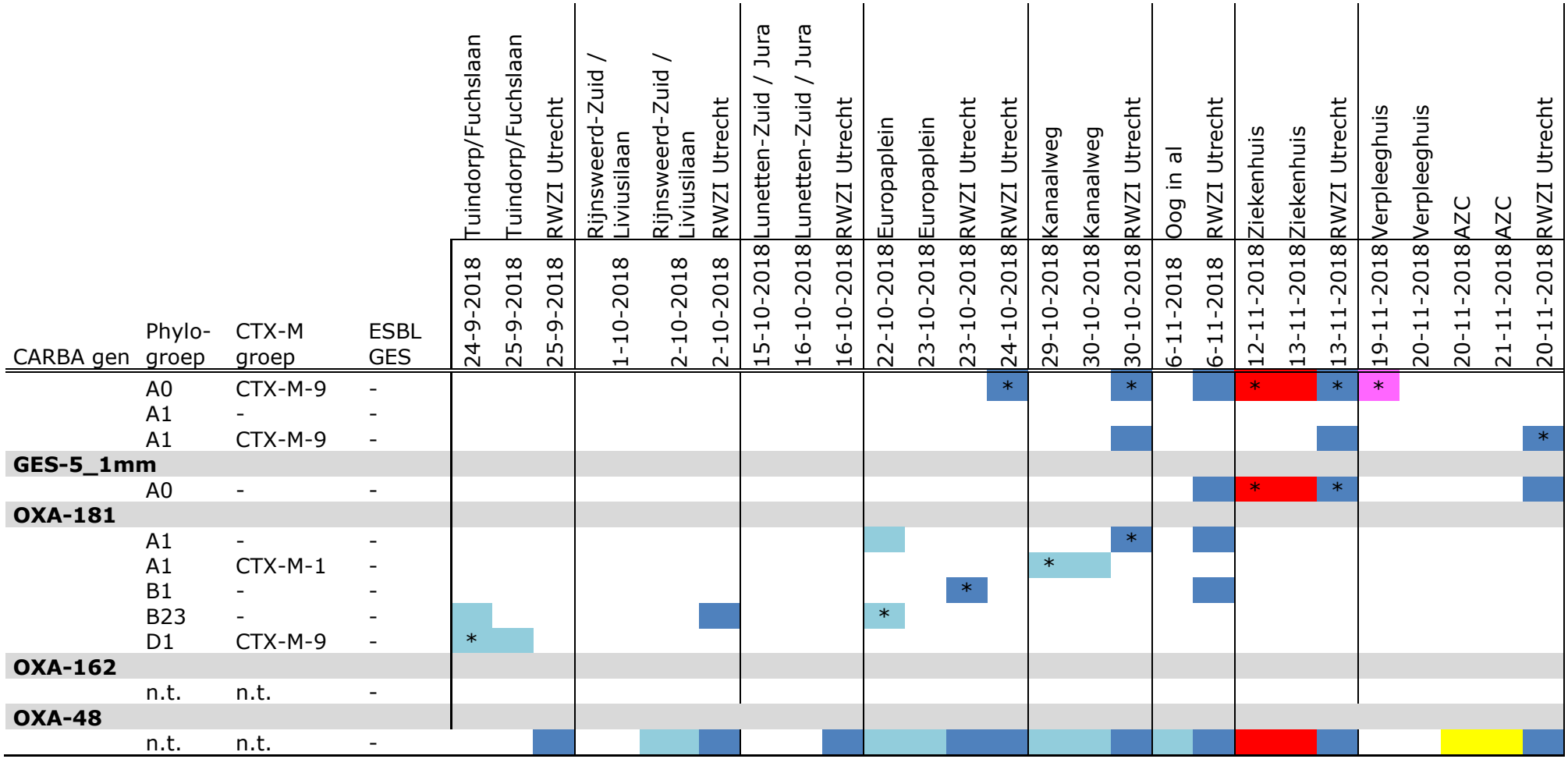
Bij de voor WGS analyses geselecteerde CPE-typen werd 20 van de 23 keer (87%) een CPE type uit een wijk of instelling op hetzelfde meetmoment ook bij de RWZI aangetroffen: 16 *E. coli* typen en 4 *K. pneumoniae/k. variicola* typen (zie bijlage 8.3). Wanneer de overige geteste markers werden meegenomen bleken de 16 CP-*E. coli* overeen te komen met in werkelijkheid 21 verschillende CPE, waarvan voor 14 (67%) een 'identieke counterpart' werd gevonden onder de RWZI stammen van hetzelfde meetmoment (tabel 3.4-1). De 4 CP-*K. pneumoniae/K. variicola* isolaten bleken overeen te komen met 6 verschillende CPE, waarvan voor 5 (83%) een 'identieke counterpart' werd gevonden tussen de RWZI stammen (tabel 3.4-2).

Tabel 3.2-1. Gevonden CP-E. coli varianten in afvalwater. Aangegeven is de variatie tussen stammen met eenzelfde carbapenemase-gen, voor wat betreft fylogroep, CTX-M-type ESBL-genen (groep 1 of groep 9 genen), en GES-type ESBL-genen aangetoond met behulp van PCR. Deze aanvullende tests zijn alleen uitgevoerd voor E. coli met NDM-1, NDM-5, KPC-3 of GES-5. De verschillende kleuren geven de verschillende typen afvalwater weer: donkerblauw = RWZI, turquoise = wijken, rood = ziekenhuis, roze = verpleeghuis, geel = AZC. Een asterisk (*) geeft aan dat een stam van het aangegeven type en uit het aangegeven monster is gekarakteriseerd d.m.v. WGS.

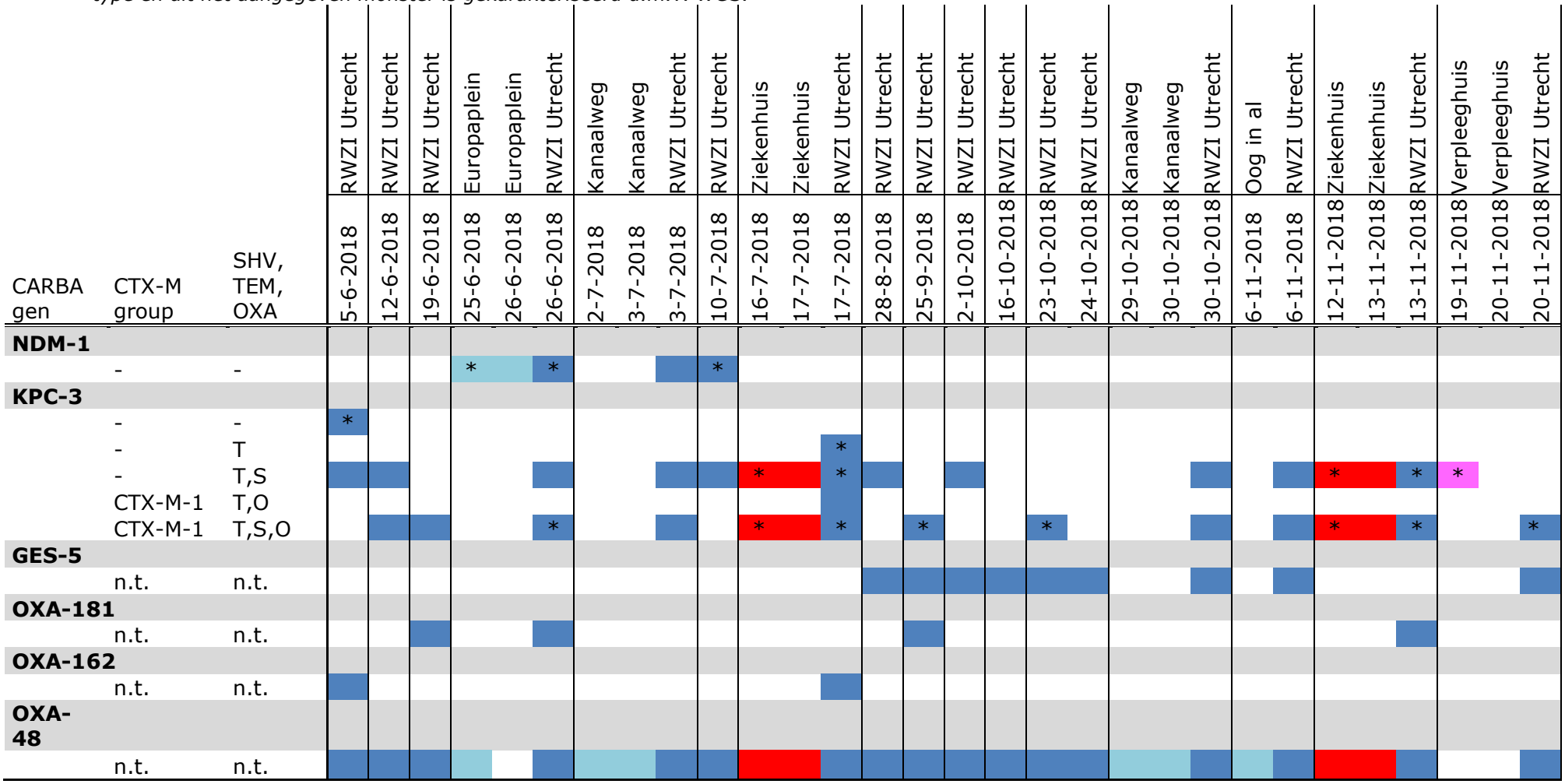


CARBA gen	Phylo-groep	CTX-M groep	ESBL GES	Tuindorp/Fuchslaan 4-6-2018	Tuindorp/Fuchslaan 5-6-2018	RWZI Utrecht 5-6-2018	Rijnsweerd-Zuid / Liviusilaan 11-6-2018	RWZI Utrecht 12-6-2018	Lunetten-Zuid / Jura 18-6-2018	Lunetten-Zuid / Jura 19-6-2018	RWZI Utrecht 19-6-2018	Europaplein 25-6-2018	Europaplein 26-6-2018	RWZI Utrecht 26-6-2018	Kanaalweg 2-7-2018	Kanaalweg 3-7-2018	RWZI Utrecht 3-7-2018	Oog in al 9-7-2018	Oog in al 10-7-2018	RWZI Utrecht 10-7-2018	Ziekenhuis 16-7-2018	Ziekenhuis 17-7-2018	RWZI Utrecht 17-7-2018	AZC 27-8-2018	AZC 28-8-2018	RWZI Utrecht 28-8-2018
	A0	CTX-M-1	-														*						*	*			
	A0	CTX-M-1	GES-26																								
GES-5																											
	A0	-	-																			*					
	A0	-	GES-26																			*		*			
	A0	CTX-M-9	-																					*			
	A1	-	-			*																					
	A1	CTX-M-9	-																								
GES-5_1mm																											
	A0	-	-																								
OXA-181																											
	A1	-	-																								
	A1	CTX-M-1	-											*													
	B1	-	-																*							*	*
	B23	-	-									*		*													
	D1	CTX-M-9	-																								
OXA-162																											
	n.t.	n.t.	-																								
OXA-48																											
	n.t.	n.t.	-																								


Tuindorp/Fuchslaan 24-9-2018
Tuindorp/Fuchslaan 25-9-2018
RWZI Utrecht 25-9-2018
Rijnsweerd-Zuid / Liviusilaan 1-10-2018
Rijnsweerd-Zuid / Liviusilaan 2-10-2018
RWZI Utrecht 2-10-2018
Lunetten-Zuid / Jura 15-10-2018
Lunetten-Zuid / Jura 16-10-2018
RWZI Utrecht 16-10-2018
Europaplein 22-10-2018
Europaplein 23-10-2018
RWZI Utrecht 23-10-2018
RWZI Utrecht 24-10-2018
Kanaalweg 29-10-2018
Kanaalweg 30-10-2018
RWZI Utrecht 30-10-2018
Oog in al 6-11-2018
RWZI Utrecht 6-11-2018
Ziekenhuis 12-11-2018
Ziekenhuis 13-11-2018
RWZI Utrecht 13-11-2018
Verpleeghuis 19-11-2018
Verpleeghuis 20-11-2018
AZC 20-11-2018
AZC 21-11-2018
RWZI Utrecht 20-11-2018
CARBA gen
Phylo-groep
CTX-M groep
ESBL GES
NDM-1
A1 - -
B1 - -
D1 - -
NDM-4
n.t. n.t. -
NDM-5
A0 CTX-M-1 -
A1 - -
A1 CTX-M-1 -
A1 CTX-M-9 -
B1 - -
D2 - -
D2 CTX-M-1 -
KPC-3
A0 - -
A0 CTX-M-1 -
A0 CTX-M-1 GES-26
GES-5
A0 - -
A0 - GES-26

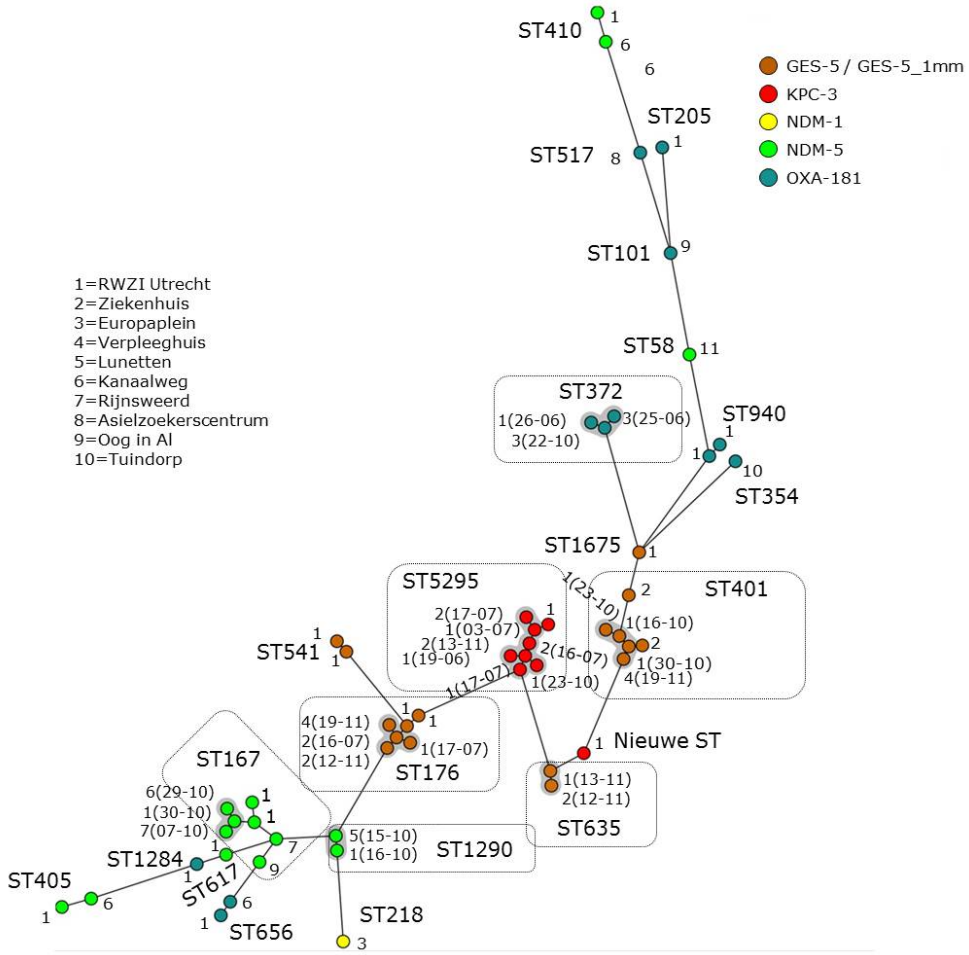

CARBA gen
Phylo-groep
CTX-M groep
ESBL GES
Tuindorp/Fuchslaan 24-9-2018
Tuindorp/Fuchslaan 25-9-2018
RWZI Utrecht 25-9-2018
Rijnsweerd-Zuid / Liviusilaan 1-10-2018
Rijnsweerd-Zuid / Liviusilaan 2-10-2018
RWZI Utrecht 2-10-2018
Lunetten-Zuid / Jura 15-10-2018
Lunetten-Zuid / Jura 16-10-2018
RWZI Utrecht 16-10-2018
Europaplein 22-10-2018
Europaplein 23-10-2018
RWZI Utrecht 23-10-2018
RWZI Utrecht 24-10-2018
Kanaalweg 29-10-2018
Kanaalweg 30-10-2018
RWZI Utrecht 30-10-2018
Oog in al 6-11-2018
RWZI Utrecht 6-11-2018
Ziekenhuis 12-11-2018
Ziekenhuis 13-11-2018
RWZI Utrecht 13-11-2018
Verpleeghuis 19-11-2018
Verpleeghuis 20-11-2018
AZC 20-11-2018
AZC 21-11-2018
RWZI Utrecht 20-11-2018
A0 CTX-M-9 -
A1 - -
A1 CTX-M-9 -
GES-5_1mm
A0 - -
OXA-181
A1 - -
A1 CTX-M-1 -
B1 - -
B23 - -
D1 CTX-M-9 -
OXA-162
n.t. n.t. -
OXA-48
n.t. n.t. -

Tabel 3.2-2. Gevonden CP K. pneumoniae/K. variicola varianten in afvalwater. Aangegeven is de variatie tussen stammen met eenzelfde carbapenemase-gen, voor wat betreft, CTX-M-type ESBL-genen (groep 1 of groep 9 genen) en TEM, SHV en OXA (OXA-1 verwante typen) beta-lactamasegenen met behulp van PCR. Deze aanvullende tests zijn alleen uitgevoerd voor K. pneumoniae/K. variicola met NDM-1 of KPC-3. De verschillende kleuren geven de verschillende typen afvalwater weer: donkerblauw = RWZI, turquoise = wijken, rood = ziekenhuis, roze = verpleeghuis, geel = AZC. Een asterisk (*) geeft aan dat een stam van het aangegeven type en uit het aangegeven monster is gekarakteriseerd d.m.v. WGS.

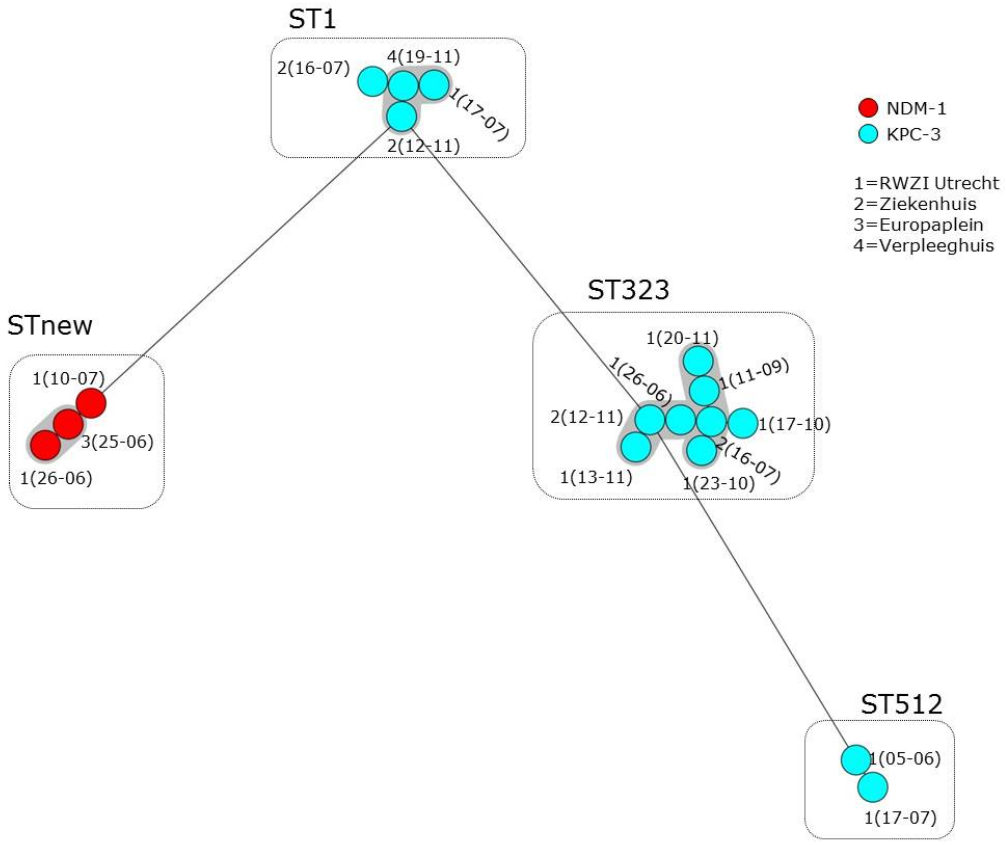


3.2.2 "Whole genome MLST" (WG MLST)

WGS analyse bevestigde de grote variatie tussen isolaten met hetzelfde CPE-type voor wat betreft species en carbapenemase-gen. Onder de CP-*E. coli* isolaten werden in totaal 22 verschillende sequentietypen gevonden (figuur 3.2-1). GES-5, KPC-3, NDM-1, NDM-5 en OXA-181 werden geassocieerd gevonden met respectievelijk 5, 2, 1, 6 en 8 verschillende STs. Onder de CP-*K. pneumoniae* isolaten werden in totaal 4 verschillende sequentietypen gevonden: KPC-3 geassocieerd met 3 verschillende STs en NDM-1 met 1 (nieuwe) ST (figuur 3.2-2). Er werden in totaal tien clusters geïdentificeerd van stammen met onderling zo weinig verschillen in het genoom (< 10 van de respectievelijk 7572 loci voor *E. coli* en 7381 loci voor *K. pneumoniae*), dat aangenomen mag worden dat het dezelfde stam betreft. In alle gevallen bevatten deze clusters minimaal één isolaat uit het RWZI influent en één isolaat uit een van de onderzochte wijken of instellingen. Tien CPE varianten uit wijken of instelling hadden op het zelfde moment een identieke counterpart in de RWZI (tabel 3.2-3). Daarnaast werden negen CPE varianten uit wijk of instelling wel in de RWZI aangetroffen, maar op een ander meetmoment.



Figuur 3.2-1. Minimal spanning tree van WG MLST profielen van carbapenemase-producerende E. coli isolaten. De knoopkleuren geven de verschillende CP-genen aan, de cijfers (1-10) bij knopen geven de locatie aan waar isolaten geïsoleerd zijn. Tevens zijn de sequentietypen (ST) weergegeven volgens Wirth et al. (Wirth et al. 2006) Met behulp van grijze schaduw zijn clusters van identieke isolaten (<10 loci verschil) aangegeven. Tussen haakjes staan monsternamedata. De kaders omvatten alle isolaten van de aangegeven ST, inclusief eventuele isolaten die op meer dan 10 loci verschillen de overige isolaten van hetzelfde ST.



Figuur 3.4-2. Minimal spanning tree van WG MLST profielen van carbapenemase-producerende Klebsiella isolaten. De knoopkleuren geven de verschillende CP-genen aan, de cijfers bij knopen geven de locatie aan waar isolaten geïsoleerd zijn. Door middel van een grijze schaduw zijn clusters weergegeven van isolaten die op minder dan 10 loci van elkaar verschillen. Bij clusters staat tussen haakjes de monsternamedatum weergegeven, en de sequentietypen (ST) gebaseerd op de conventionele methode.

Drie CPE varianten (EC ST401/GES-5, EC ST5295/KPC-3 en KP ST323/KPC-3) werden herhaaldelijk in de RWZI teruggevonden, deels op meetmomenten dat de variant ook in een instelling werd aangetroffen en deels op andere meetmomenten. In de laatste twee van deze gevallen werd hetzelfde isolaat ook op verschillende monsternamedata (tot 4 maanden later) op dezelfde locatie, in het ziekenhuis teruggevonden. Eén keer werd eenzelfde isolaat 4 maanden later (nog of weer) gedetecteerd in dezelfde wijk (EC ST372/OXA181) en één keer werd hetzelfde isolaat (EC ST167/NDM-5) op 2 verschillende momenten in twee verschillende wijken gevonden. Deze data suggereren dat CPE gedurende langere tijd op een bepaalde plek in het riool aanwezig kunnen zijn, wat wil zeggen dat ze óf langdurig op dezelfde plek worden uitgescheiden (door dezelfde drager) of dat ze in het riool persisteren.

Tabel 3.2-3. Geïdentificeerde clusters van identieke isolaten met wgMLST.

	E. coli										K. pneumoniae					
	ST 176 GES-5		ST 401 GES-5		ST 635 GES-5		ST 5295 KPC-3		ST 167 NDM-5		ST 1290 NDM-5		ST 372 OXA-181		ST 1 KPC-3		ST 323 KPC-3		Stnieuw NDM-1	
	Riool	RWZI	Riool	RWZI	Riool	RWZI	Riool	RWZI	Riool	RWZI	Riool	RWZI	Riool	RWZI	Riool	RWZI	Riool	RWZI	Riool	RWZI
18/19-6-2019								■												
25/26-jun-2019													■	■				■	■	■
2/3-jul-2019								■												
16/17-jul-2019	■	■					■	■		■						■	■			
10/11-sep-2019																		■		
7/8-okt-2019									■*											
15/16-okt-2019				■							■	■								
22/23-okt-2019				■									■					■		
29/30-okt-2019				■					■	■										
12/13-nov-2019	■				■	■	■	■							■		■	■		
19/20/nov-2019	■		■												■			■		

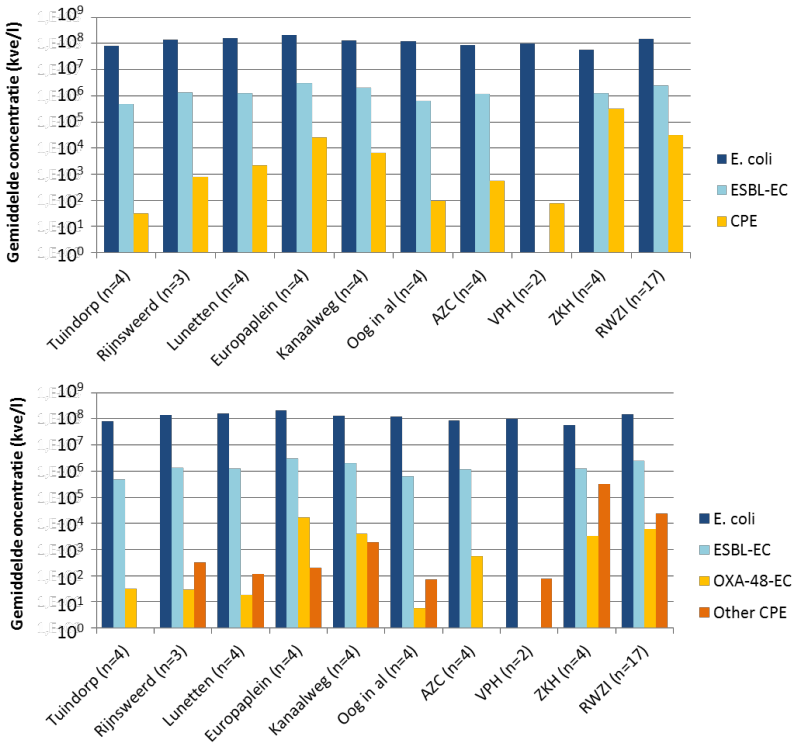
** E. coli ST167/NDM-5 werd op 2 meetmomenten in verschillende wijken aangetroffen.*

Van de 14 *E. coli* en 5 *K. pneumoniae* uit wijken/instellingen met op hetzelfde meetmoment een identieke counterpart in het RWZI influent bleken respectievelijk acht en twee (in totaal 53%) werkelijk identieke counterparts te hebben op wgMLST niveau.

3.3 CPE concentraties in afvalwater

In het ruwe afvalwater van de RWZI was de CPE concentratie gemiddeld $3{,}1\times10^4$ kve/l (variërend tussen $1{,}0\times10^4$ en $5{,}8\times10^4$ kve/l). Dit was 2-$\log_{10}$ eenheden (100x) lager dan de gemiddelde concentratie ESBL-EC ($2{,}5\times10^6$) kve/l en bijna 4-log eenheden lager (10.000x) dan de *E. coli* concentratie ($1{,}5\times10^8$)(figuur 3.3-1). In het riool in de woonwijken varieerde de gemiddelde CPE concentratie tussen $3{,}3\times10^1$ kve/l (Tuindorp) en $2{,}6\times10^4$ kve/l (Europaplein). Vergeleken met de wijken én met het RWZI influent was de CPE concentratie in het ziekenhuis relatief hoog, namelijk $3{,}3\times10^5$ kve/l. In vergelijking waren de CPE concentraties in het afvalwater van het verpleeghuis en de AZC juist relatief laag (respectievelijk $7{,}9\times10^1$ kve/l en $5{,}7\times10^2$ kve/l). Opmerkelijk was verder dat hoewel op elke locatie de concentratie ESBL-EC hoger was dan de concentratie CPE (0,6-log eenheden tot 4 log-eenheden verschil), er in het verpleeghuis geen ESBL-EC werden aangetroffen (en dus wel CPE). In het ziekenhuisafvalwater was het verschil tussen ESBL-EC en CPE concentraties het kleinst (0.6-log units verschil).

In een eerder door het RIVM uitgevoerd onderzoek naar CPE in afvalwater bleek dat *E. coli* met carbapenemase-genen behorend tot de OXA-48 familie ("OXA-48-achtige EC") wijd verspreid te zijn in Nederland: ze werden gedetecteerd bij 88 van 100 onderzochte RWZIs. Andere CPE typen bleken veel zeldzamer te zijn. In vergelijking met deze landelijke studie werden in Utrecht andere CPE typen dan OXA-48-achtige EC juist relatief vaak gevonden, namelijk op acht van de tien meetlocaties. Op zes van deze locaties was de gemiddelde concentratie zelfs iets hoger dan dat van OXA-48-achtige EC (figuur 3.3-1).

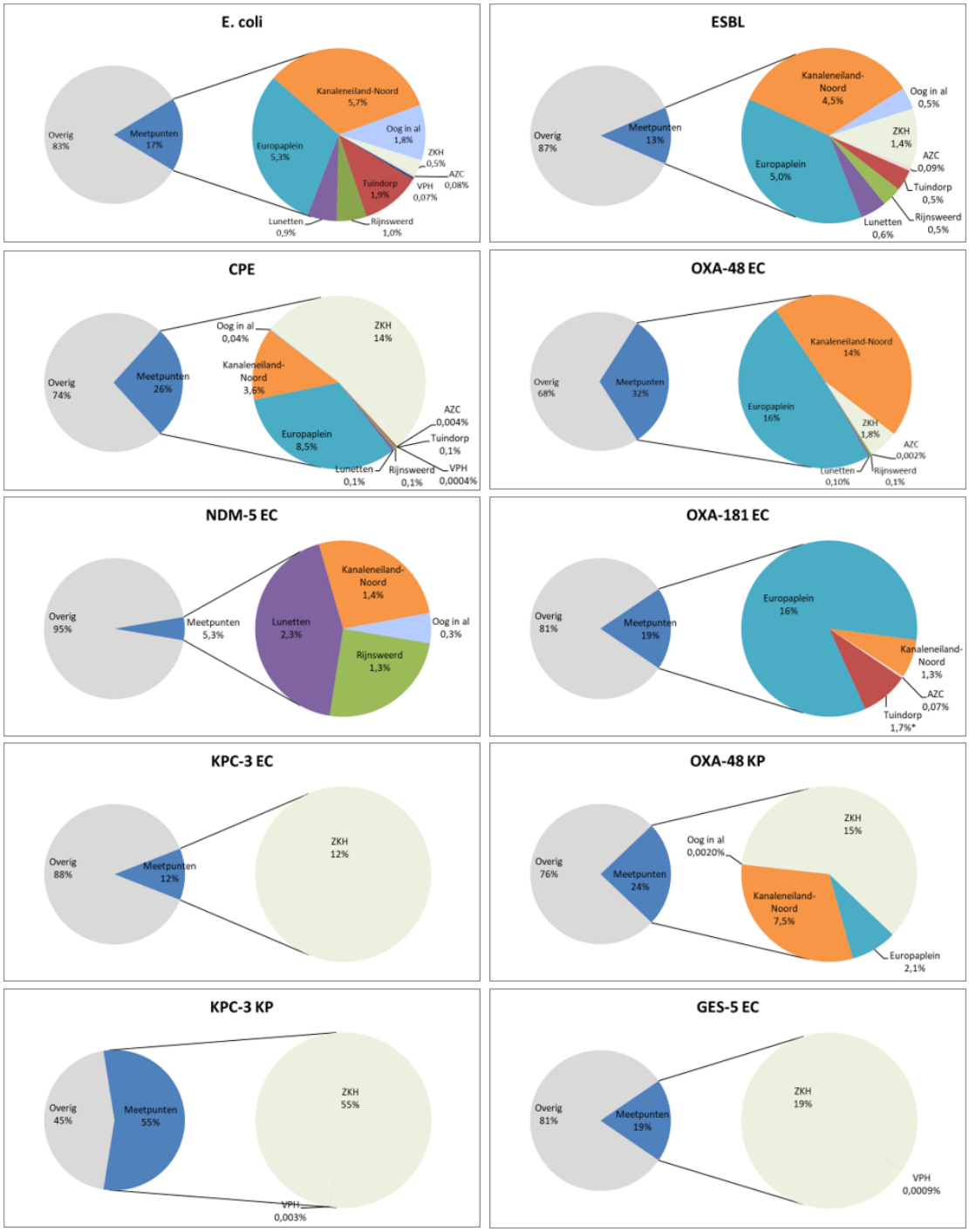


Figuur 3.3-1. Geometrisch gemiddelde E. coli, ESBL-EC en CPE concentraties per meetlocatie. CPE concentraties zijn weergegeven voor alle CPE gezamenlijk (boven) en uitgesplitst naar OXA-48-achtige EC en andere CPE typen (onder).

3.4 CPE vrachten

Het totale aantal CPE dat per etmaal op een bepaalde plek door het riool stroomt of bij de RWZI binnenkomt wordt hier de "CPE vracht" genoemd. Deze vracht wordt berekend door de in het afvalwater gemeten CPE concentratie te vermenigvuldigen met de hoeveelheid afvalwater dat gedurende 24 uur langs de meetlocatie gestroomd heeft. Met behulp van de CPE vracht kan bepaald worden wat de kwantitatieve bijdrage is van de individuele meetlocaties aan de hoeveelheden CPE die bij de RWZI binnenkomen. Hetzelfde kan gedaan worden voor ESBL-EC en totale *E. coli*.

Van te voren werd verwacht dat het aandeel van wijken en instellingen aan de *E. coli* vracht evenredig is met het aandeel aan het debiet. Dit is gebaseerd op het idee dat gemiddeld genomen de concentratie *E. coli* in ontlasting, de hoeveelheid ontlasting per stoelgang en de gebruikte hoeveelheid water per persoon hetzelfde zijn in verschillende populaties. De *E. coli* vracht op een willekeurige plek in het riool is daardoor direct gecorreleerd aan de hoeveelheid afvalwater die op die plek door het riool stroomt. Vergelijking van figuur 3.4-1 en figuur 2.1-2 laat zien dat dit bij benadering ook inderdaad het geval is.



*Figuur 3.4-1. De relatieve bijdrage van de meetlocaties in wijken en instellingen aan de totale E. coli, ESBL-EC, en diverse CPE vrachten. De eerste cirkeldiagrammen geven aan hoeveel alle meetlocaties gezamenlijk bijdroegen aan de vracht in het influent (=de som van relatieve vrachten). De tweede cirkeldiagrammen geven de relatieve bijdrage van de verschillende locaties ten opzichte van dat van alle locaties bij elkaar. EC=E. coli, KP=Klebsiella pneumoniae/variicola; *OXA-181-EC werden wel in de wijk (Tuindorp) gevonden maar op hetzelfde moment niet in het RWZI influent. De weergeven relatieve vracht is een schatting gebaseerd op de gemiddelde OXA-181-EC vracht in RWZI influent.*

Van de onderzochte wijken leverden Kanaleneiland-Noord en Europaplein behalve de grootste bijdrage aan afvalwatervolume en *E. coli* ook de grootste bijdrage aan ESBL-EC en OXA-48 EC (figuur 3.4-1). Echter, de grootste bijdrage aan de totale CPE vracht werd geleverd door het ziekenhuis.

Meetlocatie Lunetten-Zuid leverde met een relatieve vracht van 2,3% de grootste bijdrage aan de NDM-5-EC vracht van de onderzochte rioollocaties (figuur 3.4-1). Hoewel dit klinkt als een klein aandeel is het relatief veel, gezien Lunetten-Zuid slechts 0,9% van alle *E. coli* leverde en 1,2% van het totale afvalwater. Deze wijk leverde daarmee 43% van het in totaal door de onderzochte locaties bijgedragen deel aan NDM-5 EC in het RWZI influent (5,3%). Ook de wijk Rijnsweerd leverde een relatief grote bijdrage aan de NDM-5-EC vracht (1,3%) vergeleken met de bijdrage van deze wijk aan de totale *E. coli* (1,0%), ESBL-EC (0,5%) en andere typen CPE zoals OXA-48-EC (0,1%). Daarentegen was voor Kanaleneiland-Noord de bijdrage aan de totale NDM-5 EC vracht veel lager dan dat van de OXA-48 EC vracht (relatieve vracht van 1,4% vs 14%; figuur 3.4-1).

Dat de gezamenlijke rioollocaties slechts 5,3% van de NDM-5 vracht in het influent verklaarden, suggereert dat er in de stad nog andere NDM-5 bronnen zijn geweest dan de onderzochte meetlocaties. Anderzijds is het mogelijk dat de NDM-5 wel op de onderzochte locaties aanwezig waren, maar op andere tijdstippen dan het meetmoment. GES-5 EC, KPC-3 EC en KPC-3 KP werden alleen in ziekenhuis- en verpleeghuisafvalwater aangetroffen. Voor deze drie bacterietypen was de ziekenhuisafvalwatervracht respectievelijk 19%, 12% en 55% van de influentvracht, en daarmee 99,995%, 100% en 99,995% van het aandeel van alle onderzochte meetlocaties gezamenlijk (figuur 3.4-1).

4 Discussie en conclusies

Aanleiding
In een eerder onderzoek naar het voorkomen van resistente bacteriën in afvalwater werden CPE in inkomend en gezuiverd afvalwater (influent en effluent) van RWZIs aangetroffen (Schmitt et al. 2017). Ook werd gevonden dat hoewel CPE in gemeentelijk afvalwater voor een deel verklaard kunnen worden door lozingen van ziekenhuizen, ziekenhuizen niet de enige bron van CPE zijn (Schmitt et al. 2018). Deze bevinding suggereerde dat er ook CPE-dragers in de algemene bevolking zijn. In de huidige studie is onderzocht of CPE direct aangetoond konden worden in afvalwater afkomstig uit huishoudens. Dit is gedaan door te meten in het rioolstelsel in zes verschillende wijken van één stad (Utrecht). Metingen in de wijken zijn vergeleken met metingen in het riool bij een ziekenhuis, een verpleeghuis en een asielzoekerscentrum. Alle meetlocaties maakten deel uit van het verzamelgebied van dezelfde RWZI.

Vóórkomen van CPE typen in Utrechtse wijken en instellingen
In alle zes onderzochte Utrechtse wijken werden CPE aangetroffen, minstens op één van beide meetmomenten en in vijf wijken op beide meetmomenten. Hiermee werd niet alleen bevestigd dat CPE in de algemene bevolking voorkomen, maar werd bovendien vastgesteld dat er binnen de grenzen van één stad meerdere CPE-dragers voorkomen in verschillende wijken. Daarnaast werden CPE bij alle drie instellingen gevonden.

In elke wijk werden per meetmoment meerdere CPE typen tegelijk aangetroffen, voor wat betreft species en carbapenemase-gen. Woonwijken en zorginstellingen verschilden voor wat betreft de CPE typen die werden gevonden. Zo waren KPC-3 en GES-5 alleen bij de zorginstellingen aangetroffen en niet in de wijken, en NDM-1, NDM-5 en OXA-181 alleen in wijken (NDM en OXA-181) of asielzoekerscentrum (OXA-181), maar niet in zorginstellingen. OXA-48-producerende CPE werden overal aangetroffen, waarbij OXA-48 *E. coli* met name uit woonwijken afkomstig bleek en OXA-48 *K. pneumoniae* voornamelijk uit het ziekenhuis. De bevinding dat de bijdrage van het ziekenhuis CPE-type afhankelijk is, is in overeenstemming met eerder RIVM onderzoek bij meerdere ziekenhuizen (Schmitt et al. 2018)

CPE dragerschap in Nederland is geassocieerd met reizen naar het buitenland en ziekenhuisopname in het buitenland (Nethmap/Maran 2019, van Hattem et al. 2016). Hoewel er geen overlap lijkt tussen CPE-dragers in het ziekenhuis en de inwoners in de zes wijken, kan er gebaseerd op het huidige onderzoek niet geconcludeerd worden of CPE-dragers in de gemeenschap ex-patiënten uit (Nederlandse) ziekenhuizen zijn of reizigers. Het is immers niet uit te sluiten dat de CPE-dragers in andere ziekenhuizen (in Utrecht of elders) hebben gelegen. Zowel NDM-1 als NDM-5-producerende *E. coli* zijn eerder in het afvalwater van andere ziekenhuizen aangetroffen (Schmitt et al. 2018).

Representativiteit van rioolmetingen
De bijdrage van individuele meetlocaties aan de *E. coli* vracht in het RWZI influent was proportioneel aan de bijdrage van dezelfde locaties voor wat betreft het volume afvalwater. Dit bevestigt dat vanwege de correlatie met de hoeveelheid feces, de hoeveelheid *E. coli* in afvalwater een maat is voor het aantal mensen in een rioolstroomgebied. Het bevestigt daarmee tevens het idee dat afvalwatermetingen een betrouwbare weergave geven van het aantal en de verdeling van humane bronnen van fecale bacteriën. De meetlocaties dekten rioolstroomgebieden in wijken met 3.000 tot 15.000 inwoners. Het gegeven dat ook in de kleinste wijken Rijnsweerd (3230 inwoners) en Lunetten-zuid (naar schatting 4764 inwoners in het bemonsterde stroomgebied) CPE werden aangetroffen laat zien dat metingen van rioolwater een gevoelige en efficiënte methode zijn om dragers van CPE binnen een gemeenschap aan te tonen. Dit, tezamen met het hier geleverde bewijs dat er binnen één rioolstroomgebied variatie bestaat in zowel vrachten als typen CPE, toont aan dat rioolmetingen zeer geschikt zijn voor het in kaart brengen van de verspreiding van CPE dragerschap op microniveau.

Representativiteit van RWZI influent
Met behulp van WGS analyse werd aangetoond dat een groot deel van de CPE stammen die in het RWZI influent voorkomen terug te traceren zijn naar bepaalde wijken en daarmee naar enkele duizenden inwoners. Andersom beredeneerd werden ook de meeste stammen die in wijken en instellingen werden aangetoond teruggevonden in de RWZI (hoewel niet altijd op hetzelfde meetmoment). Dit suggereert dat analyse van RWZI influent een adequate weergave geeft van totale diversiteit aan CPE dragerschap binnen gemeente- of stadsgrenzen, zeker bij frequente metingen bij de RWZI.

De totale bijdrage van de meetlocaties gezamenlijk aan de totale hoeveelheid afvalwater en totale *E. coli* vracht die dagelijks bij de RWZI binnenkomen was respectievelijk 25% en 17%. Dat wil zeggen dat met dit onderzoek een aanzienlijk deel van de inwoners van de totale stad (binnen de ring) onderzocht is. Maar het wil ook zeggen dat ruim drie kwart van het afvalwater en fecale bacteriën die bij de RWZI worden aangetroffen van andere locaties afkomstig zijn dan de onderzochte locaties. Het lijkt daarmee aannemelijk dat de aanwezigheid van CPE typen in het RWZI influent die niet in het afvalwater van de onderzochte wijken en instellingen gevonden werden, verklaard wordt door het feit er nog andere CPE-dragers in de stad zijn geweest (onder de algemene bevolking in niet bemonsterde wijken of in instellingen). Het is echter niet uit te sluiten dat door het alterneren van meetlocaties een deel van de ‘onbekende’ bronnen van CPE in het RWZI influent wél dragers in de onderzochte wijken waren, maar dat niet de ‘juiste’ wijk op het ‘juiste’ moment bemonsterd is.

De overgrote meerderheid (94%) van de CPE typen voor wat betreft species en carbapenemase-gen die in wijken en instellingen werden gevonden werden ook in de RWZI gevonden. Vaak (in 86% van de gevallen) werden CPE typen ook op hetzelfde meetmoment gevonden in wijken/instellingen en de RWZI. Gedetailleerdere analyse van isolaten (d.m.v. PCR, Sanger sequencing en WGS) toonde echter ook grote

variatie aan tussen stammen van eenzelfde species met hetzelfde carbapenemase gen. Op gedetailleerder karakterisatieniveau bleek het percentage wijk/instellingsvarianten met een identieke counterpart in het gelijktijdig genomen RWZI-monster lager: 70% (19/27) wanneer variatie in ESBL-genen en fylogenetische groep werd meegenomen, en 53% (10/19) wanneer WGS resultaten werden meegenomen. Dit geeft aan dat een enkele influentmeting een onderschatting kan geven van de CPE-varianten die op hetzelfde moment in het riool aanwezig zijn. Hiervoor zijn verschillende verklaringen mogelijk. Op de eerste plaats kan de timing van de monstername in het riool ten opzichte van de monstername bij de RWZI een rol spelen. Het riool werd bemonsterd vanaf 24 uur vóór de RWZI monstername en 24 uur tegelijk met de RWZI monstername. Hoe lang de reistijd van het afvalwater van de verschillende meetlocaties naar de RWZIs was, werd niet bepaald en is onder andere afhankelijk van de hoeveelheid neerslag voorafgaand aan de monstername. Er zijn situaties denkbaar, bijvoorbeeld bij een reistijd langer dan 24 uur, of als een drager relatief laat in de monsterperiode naar de wc gaat, dat de in het riool uitgescheiden CPE nog niet bij de RWZI is aangekomen op het moment van monstername. Een andere verklaring voor discrepanties is "toeval": uit elk monster werden 10 tot 15 isolaten gekweekt en gekarakteriseerd en gezien de grote variatie aan CPE varianten is het mogelijk dat niet alle varianten die aanwezig waren ook daadwerkelijk gevonden werden. Bij influent heeft toeval waarschijnlijk een groter effect dan in de wijken, omdat de variatie in het influent groter is en omdat individuele varianten in het influent t.o.v. de plaats van uitscheiding in het riool, verder verdund zijn in meer afvalwater.

Slechts één keer werd een CPE-type op species en carbapenemase-gen niveau, een NDM-1 *E. coli*, wel in een wijk (Europaplein) en helemaal niet in de RWZI aangetroffen. Tegelijkertijd met de NDM-1 EC werd in de wijk ook een NDM-1 *K. pneumoniae* en NDM-1 *Enterobacter* spp. aangetroffen. Deze laatste twee CPE typen werden wél in de RWZI gevonden. Analyse van het hele genoom toonde tevens aan dat de NDM-1 *K. pneumoniae* in de wijk en in het influent identiek waren. Het feit dat er in de wijk een NDM-1 EC en NDM-1 KP werd gevonden maar in de RWZI alleen de laatste, kan betekenen dat er twee verschillende dragers waren met een verschillende timing in de stoelgang (en een langzame doorstroom door het riool), maar waarschijnlijker lijkt dat er sprake is geweest van toeval bij de selectie van isolaten.

CPE in verpleeghuis en asielzoekerscentrum
Hoewel in een recent uitgevoerd onderzoek bij ruim 4.000 bewoners van 159 verpleeghuizen geen CPE aangetoond zijn (van Kleef et al. 2019), zijn er in de huidige studie wel CPE gevonden in het afvalwater van een verpleeghuis. Dat geeft aan dat CPE wel in Nederlandse verpleeghuizen voor kunnen komen. Het is echter onbekend of de CPE-drager(s) een bewoner van het verpleeghuis is (zijn), of een werknemer of bezoeker. Wel is opvallend dat twee van de drie CPE-typen die in het afvalwater van het verpleeghuis werden aangetroffen (een EC ST176/GES-5 en KP ST1/KPC-3) óók zijn waargenomen in het afvalwater van het ziekenhuis, 7 dagen en 4 maanden eerder. Dit suggereert dat de CPE drager(s) in het verpleeghuis kort daarvoor nog in het ziekenhuis is (zijn) geweest, of dat er meerdere dragers met identieke CPE-stammen zijn geweest.

Van het betreffende Utrechtse verpleeghuis weten we dat het afvalwater langs een van de meetlocaties stroomt, namelijk langs meetlocatie Europaplein. Opvallend is echter dat de CPE typen die in het verpleeghuisafvalwater zijn aangetoond, niet zijn aangetoond in het afvalwater van Europaplein. Dit kan verklaard worden door 'timing' van de monsternames: Europaplein is bemonsterd op 25/26 juni en 22/23 oktober, het verpleeghuis op 19/20 november.

Bij ons weten is dit de eerste keer dat CPE bij een Nederlands asielzoekerscentrum zijn aangetoond. De concentraties in het afvalwater waren in vergelijking met het ziekenhuis en sommige Utrechtse woonwijken echter relatief laag.

CPE typen en demografie
Opvallend was de bevinding dat tussen wijken onderling verschillen werden geobserveerd in CPE-typen. In de wijken Europaplein en Kanaleneiland-Noord werden met name OXA-48-achtige *E. coli* en *K. pneumoniae* gevonden, terwijl de wijken Lunetten, Rijnsweerd en Oog in Al juist relatief grote bijdragen leverden aan de NDM-5-*E. coli*. Deze verschillen zouden kunnen samenhangen met verschillen in demografie. In Europaplein en Kanaleneiland-Noord heeft een groot deel van de bevolking een niet-westerse achtergrond (respectievelijk 64% en 44%) terwijl in de andere drie wijken het overgrote deel van de bevolking autochtoon is en gemiddeld een hoger inkomen heeft. Gezien reizen een grote risicofactor is van CPE dragerschap (van Hattem et al. 2016), zouden de geobserveerde verschillen in CPE typen samen kunnen hangen met verschillend reisgedrag en/of verschillende reisbestemmingen (bezoek aan moederland vs. "verre reis" vakanties). Uit nationale surveillance gegevens blijkt dat onder Nederlandse reizigers die CPE drager zijn, OXA-48 het meest voorkomende type is bij mensen die terugkeren uit bestemmingen in Noord-, West-, of Midden-Europa, in het Midden-Oosten en in Noord-Afrika. Daarentegen lijken bij CPE-dragers die terugkeren uit Zuid-Europa en Zuidoost-Azië respectievelijk KPC en NDM de meest voorkomende CPE-typen te zijn (2017 en 1^{e} helft 2018 data uit RIVM Type-Ned database, M. Mennen, persoonlijke communicatie). Of het risico op het oplopen van bepaalde typen CPE inderdaad samenhangt met het reizen naar specifieke bestemmingen behoeft verder onderzoek.

CPE concentraties
De hoogste concentraties CPE werden aangetroffen in het RWZI influent en het ziekenhuisafvalwater. Tussen de wijken varieerden de concentraties. De CPE concentraties in het rioolwater worden bepaald door het percentage inwoners/bewoners/patiënten die drager zijn en dus CPE uitscheiden, de concentratie CPE in de darmen van deze mensen, en de verdunning in het riool door waterverbruik en neerslag. De verschillen tussen wijken onderling en tussen wijken en instellingen kunnen dan ook met verschillende van deze factoren samenhangen. De kwantitatieve relatie tussen CPE concentraties in dragers en CPE concentraties in afvalwater is vooralsnog onbekend, maar kan wel worden bepaald in vervolgonderzoek. Met deze kennis zouden afvalwatermetingen niet alleen gebruikt kunnen worden voor het in kaart brengen van dragerschap, maar ook voor kwantitatieve analyses zoals het schatten van het aantal dragers.

Relatieve CPE vrachten
Met behulp van "relatieve bacterievrachten" (=bacterievracht op een meetlocatie gedeeld door de bacterievracht in het influent op hetzelfde meetmoment) werd de bijdrage van individuele meetlocaties aan de totale CPE- (en ESBL-) vracht in het bij de RWZI binnenkomende afvalwater weergegeven. Door individuele relatieve vrachten uit te drukken als het percentage van de som van alle relatieve vrachten, werd daarnaast inzicht verkregen in de relatieve bijdrage van de verschillende meetlocaties. Zo bleken bijvoorbeeld Europaplein en Kanaleneiland-Noord gezamenlijk 94% van de totaal door alle meetlocaties bijgedragen vracht aan OXA-48-*E. coli* te verklaren (namelijk 30% van de in totaal 32%), Lunetten-Zuid en Rijnsweerd 68% van de door alle meetlocaties bijgedragen vracht aan NDM-5 *E. coli* (3,6% van de in totaal 5,3%), en het ziekenhuis 53% van alle door de meetlocaties geleverde CPE (13,9% van de 26,5%).

Er moet hierbij wel de kanttekening geplaatst worden dat iedere locatie op een ander tijdstip is gemeten en elke locatie maar op twee verschillende momenten (met tussenpoos van 3 á 4 maanden). Bij het gebruik van de som van relatieve vrachten moet daarom de aanname worden gedaan dat er per locatie weinig variatie is in de tijd. Voor CPE is het echter juist wel aannemelijk dat er variatie is in de tijd, wat o.a. blijkt uit het voorkomen van (deels) andere CPE varianten op verschillende tijdspunten binnen een wijk. Hoe groot die variatie is, is vooralsnog niet bekend. Voor een betrouwbaardere vergelijking van meetlocaties onderling zouden alle locaties tegelijk gemeten moeten worden en/of zou elke locatie frequenter gemeten moeten worden. Dit was gezien de kosten die verbonden zijn aan de inhuur van automatische meetapparatuur binnen het huidige budget niet haalbaar. De huidige resultaten geven echter een duidelijke eerste indicatie van de verschillen tussen verschillende wijken en instellingen voor wat betreft de bijdrage aan CPE en verschillende typen daarin.

De gezamenlijke bijdrage van de meetlocaties aan de totale *E. coli* vracht was 17%. De bijdrage van de meetlocaties aan de totale ESBL-EC- en CPE-vracht was respectievelijk 13% en 26%. De vergelijking met *E. coli* suggereert dat er binnen het onderzochte rioolstroomgebied een onder-representatie was van ESBL-EC uitscheiders (d.w.z. er zijn meer, of grotere, bronnen elders in de stad), maar een over-representatie van CPE uitscheiders. In het algemeen was de bijdrage van de meetlocaties aan de vrachten van individuele CPE typen in de orde van grootte van de voor totale CPE gevonden 26%. Duidelijke uitzonderingen hierop waren NDM-5 EC (meetlocaties gezamenlijk 5,3% van de totale vracht) en KPC-3 KP (meetlocaties gezamenlijk 55% van de totale vracht en daarvan 99,99% afkomstig uit het ziekenhuis). Gezien de geringe bijdrage van de meetlocaties aan de totale NDM-5 EC vracht lijkt het aannemelijk dat er gedurende het onderzoek meer uitscheiders van NDM-5 EC aanwezig waren buiten de onderzochte wijken en instellingen. Het kan echter niet uitgesloten worden dat de geringe gezamenlijke relatieve vracht deels verklaard wordt door de alternerende monstername (d.w.z., dat een NDM-5-positieve wijk niet bemonsterd is op het moment dat er de meeste dragers en/of hoogste uitscheiders waren). Mogelijke andere CPE bronnen binnen het rioolstroomgebied van RWZI Utrecht zijn inwoners van andere dan de onderzochte wijken

en patiënten van het tweede in de stad aanwezig ziekenhuis. Voor KPC-3 KP lijkt het tegenovergestelde geconcludeerd te kunnen worden: de belangrijkste bron(nen) van dit type CPE in de stad Utrecht lag(en) blijkbaar binnen de meetlocaties.

Dynamiek van CPE binnen het riool
Door middel van analyse van het hele genoom is aangetoond dat in sommige gevallen specifieke stammen 4 maanden op dezelfde plek meetbaar blijven. Dit is aangetoond voor meerdere stammen in ziekenhuisafvalwater (KPC-3 *E. coli* ST5295, GES-5 *E. coli* ST176, KPC-3 *K. pneumoniae* ST1 en KPC-3 *K. pneumoniae* ST323) en voor één stam in het riool van één van de wijken (OXA-181 *E. coli* ST372) en suggereert persistentie in de drager(s) dan wel in het riool.

De detectie van dezelfde wijk-geassocieerde CPE typen (zoals OXA-181-, NDM-1-en NDM-5-positieve CPE) in het RWZI influent gedurende herhaaldelijke monsternames, doet vermoeden dat het persisteren van CPE stammen vaker voorkomt dan in de huidige studie is aangetoond. De beperkende factor was dat slechts voor een relatief klein deel van de stammen een hele genoomanalyse gedaan kon worden. Een hele genoomanalyse van een groter deel van de reeds geïsoleerde en deels gekarakteriseerd influent stammen zou zeker meer inzicht geven in hoe vaak er sprake is van persistentie, en of bepaalde typen langer persisteren dan andere typen. Het is daarmee echter niet duidelijk of het gaat om persisteren in mensen of persisteren in het waterige milieu. Het antwoord op deze vraag zou verkregen kunnen worden door middel van simultaan onderzoek in dragers en afvalwater binnen een rioolstroomgebied.

Extrapolatie van afvalwatermetingen naar CPE dragers
Zowel het feit dat CPE in alle wijken werden gevonden als de variatie binnen wijken op één moment zijn opvallende bevindingen. Omdat bacteriën plasmiden met carbapenemase-genen naar elkaar over kunnen dragen is het niet uit te sluiten dat één drager tegelijkertijd verschillende bacterie-species of verschillende sequentie typen van dezelfde species met hetzelfde carbapenemase-gen in de darmen heeft. Statistisch gezien is de kans echter klein dat één drager op hetzelfde moment CPE met verschillende carbapenemase-genen bij zich draagt. Elke wijk is twee keer bemonsterd, één keer in de periode 4 juni t/m 10 juli en één keer in de periode van 24 september t/m 6 november. Aannemende dat per wijk, per meetpunt en per type carbapenemase-gen er maximaal één CPE drager tegelijk aanwezig was, waren er gedurende de eerste meetreeks minimaal 12 dragers verdeeld over de zes wijken en in de tweede meetreeks minimaal 10 dragers (mogelijk deels dezelfde dragers als tijdens de eerste periode). Gezamenlijk representeerden de zes meetlocaties het afvalwater afkomstig van ongeveer 50.000 inwoners. Gegeven de aanname dat de kans klein is dat één drager twee verschillende CPE heeft voor wat betreft het carbapenemase-gen, suggereren de bevindingen daarmee dat er per meetperiode ongeveer 1 op de 4000 á 5000 inwoners CPE-drager was. Dit is in dezelfde orde van grootte als de schatting van 1 op de 6000 die eerder gedaan is gebaseerd op resultaten van metingen bij 100 RWZIs (Blaak et al. 2019).

Beperkingen van metingen in het riool
Het huishoudelijke afvalwater op de meetlocaties kan deels gemengd zijn met niet-huishoudelijk afvalwater. Met name in de wijken Europaplein en Kanaalweg zijn veel kantoren aanwezig. Een nadeel van gebruik van afvalwatermetingen is dat ontlasting van mensen die niet in het gebied wonen maar alleen daarin werken ook tot aanwezigheid van CPE kan leiden (indien CPE dragers op het werk poepen). Daarnaast zijn er in Utrecht meerdere verpleeghuizen. Of de onderzochte rioolstroomgebieden afvalwater van verpleeghuizen bevatten is voor het huidige onderzoek niet uitgezocht. Het is daarom niet met 100% zekerheid vast te stellen of CPE in het riool afkomstig waren van een drager die in de onderzochte wijken woont of werkt, en of de drager dan zelfstandig woont of bewoner is van een verpleeghuis.

5 Conclusies en aanbevelingen

Conclusies
Het huidige onderzoek geeft nieuw inzicht in de prevalentie van CPE in Nederland. Door op wijkniveau te meten (overeenkomend met 3.000 tot 15.000 inwoners) kon niet alleen worden bevestigd dat CPE voorkomen in de algemene bevolking, maar kon bovendien worden vastgesteld dat er binnen één stad meerdere CPE-dragers zijn in verschillende wijken. Tevens kon met dit onderzoek aangetoond worden dat er verschillen zijn in het voorkomen van specifieke CPE typen tussen wijken onderling en tussen wijken en zorginstellingen.

Het onderzoek bevestigt dat fecale bacteriën in afvalwater een goede indicator zijn voor het aantal bewoners in een wijk. Mede daardoor kunnen met behulp van metingen in afvalwater het vóórkomen van CPE (en andere BRMO) zowel op microschaal (door te meten in het rioolstelsel) als op macroschaal (door het meten bij RWZIs) op een gevoelige manier in kaart worden gebracht.

Metingen in afvalwater bieden daarmee een unieke, non-invasieve en kosteneffectieve mogelijkheid om inzicht te krijgen in de verspreiding en dynamiek van CPE-dragerschap binnen een gemeenschap. Deze kennis kan bijdragen aan het effectief inzetten van maatregelen om de verspreiding te beperken.

Aanbevelingen
Het dient aanbeveling om afvalwater surveillance te gebruiken om dragerschap van CPE en andere BRMO op nationaal niveau te monitoren. Het dient tevens aanbeveling om door middel van vervolgonderzoek de kwalitatieve en kwantitatieve correlatie tussen CPE dragerschap en CPE in rioolwater vast te stellen. Dit is noodzakelijk om afvalwater surveillance niet alleen in te kunnen zetten als een indicator van dragerschap en voor het onderzoeken van trends, maar om het daarnaast te kunnen gebruiken voor kwantitatieve analyses zoals het schatten van percentages dragers. Hiervoor is het nodig om de correlatie tussen concentraties in feces en afvalwater te bepalen, en om vast te stellen wat er met CPE gebeurt in het riool (i.e. overleving, persistentie in biofilms, uitwisselen van genen). Hele genoom analyse van CPE stammen afkomstig uit herhaaldelijke metingen van RWZI Utrecht die gedaan zijn binnen het kader van het huidige onderzoek maar ook van vorig onderzoek zal meer inzicht geven in de persistentie van CPE typen.

6 Dankwoord

Wij bedanken de gemeente Utrecht, in het bijzonder Jeffrie de Groot, voor het meedenken over geschikte monsterlocaties en de monsternames op deze locaties mogelijk te maken, het Hoogheemraadschap de Stichtse Rijnlanden (in het bijzonder Mark Stevens) voor de RWZI monsters, en IMD BV voor hun onvermoeibare inzet waardoor ondanks de vele uitdagingen betrouwbare composietmonsters zijn verkregen.

7 Referenties

Albiger, B., Glasner, C., Struelens, M.J., Grundmann, H., Monnet, D.L. and European Survey of Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae working group (2015) Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in Europe: assessment by national experts from 38 countries, May 2015. Euro Surveill 20(45).

Arcilla, M.S., van Hattem, J.M., Haverkate, M.R., Bootsma, M.C.J., van Genderen, P.J.J., Goorhuis, A., Grobusch, M.P., Lashof, A.M.O., Molhoek, N., Schultsz, C., Stobberingh, E.E., Verbrugh, H.A., de Jong, M.D., Melles, D.C. and Penders, J. (2017) Import and spread of extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae by international travellers (COMBAT study): a prospective, multicentre cohort study. Lancet Infect Dis 17(1), 78-85.

Asghar, H., Diop, O.M., Weldegebriel, G., Malik, F., Shetty, S., El Bassioni, L., Akande, A.O., Al Maamoun, E., Zaidi, S., Adeniji, A.J., Burns, C.C., Deshpande, J., Oberste, M.S. and Lowther, S.A. (2014) Environmental surveillance for polioviruses in the Global Polio Eradication Initiative. J Infect Dis 210 Suppl 1, S294-303.

Bell, B., Bell, M., Bowen, A., Braden, C., Brandt, M., Brown, A., Burkhardt, A. et al. (2013) Antibiotic resistance threats in the United States, 2013. US Department of Health and Human Services, Center for Disease Control and Prevention.

Blaak, H., Kemper, M., De Man, H., van Leuken, J., Hierink, F., Van Passel, M., Schmitt, H. and de Roda Husman, A.M. (2019) Nationwide surveillance reveals frequent detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in Dutch municipal wastewater. In voorbereiding.

CBS (2011) StatLine: Lozing van afvalwater door huishoudens en bedrijven. http://statline.cbs.nl/StatWeb/publication/?VW=T&DM=SLNL&PA=70223ned&D1=a,!9-10&D2=0&D3=a&HD=090624-1001&HDR=G1,G2&STB=T.

CBS (**2016**) Kerncijfers wijken en buurten 2016. http://statline.cbs.nl.

Dallenne, C., Da Costa, A., Decré, D., Favier, C. and Arlet, G. (2010) Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important β-lactamases in Enterobacteriaceae. J Antimicrob Chemother 65(3), 490-495.

Doi, Y. and Paterson, D.L. (2015) Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. Semin Respir Crit Care Med 36(1), 74-84.

Doumith, M., Day, M.J., Hope, R., Wain, J. and Woodford, N. (2012) Improved multiplex PCR strategy for rapid assignment of the four major Escherichia coli phylogenetic groups. J Clin Microbiol 50(9), 3108-3110.

ESBLAT (2018) Rapport ESBL-Attributieanalyse (ESBLAT). Op zoek naar de bronnen van antibioticaresistentie bij de mens. Projectnummer Topsector TKI-AF 12067. Mevius, D., Heederik, D. and van Duijkeren, E. (eds).

Korving, H., Langeveld, J. and van der Biezen, S. (2015) Reductie hydraulische belasting RWZI. STOWA RIONED rapport 2015-05.

Kuenzli, E., Jaeger, V.K., Frei, R., Neumayr, A., DeCrom, S., Haller, S., Blum, J., Widmer, A.F., Furrer, H., Battegay, M., Endimiani, A. and Hatz, C. (2014) High colonization rates of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing Escherichia coli in Swiss travellers to South Asia- a prospective observational multicentre cohort study looking at epidemiology, microbiology and risk factors. BMC Infect Dis 14, 528.

Leclerc, H., Mossel, D.A., Edberg, S.C. and Struijk, C.B. (2001) Advances in the bacteriology of the coliform group: their suitability as markers of microbial water safety. Annu Rev Microbiol 55, 201-234.

Nethmap/Maran (2018) Consumption of antimicrobial agents and antimicrobial resistance among medically important bacteria in the Netherlands in 2017., https://www.rivm.nl/publicaties/nethmap-2018-consumption-of-antimicrobial-agents-and-antimicrobial-resistance-among.

Nethmap/Maran (2019) Consumption of antimicrobial agents and antimicrobial resistance among medically important bacteria in the Netherlands in 2018., https://www.rivm.nl/publicaties/nethmap-2018-consumption-of-antimicrobial-agents-and-antimicrobial-resistance-among.

Reuland, E.A., Overdevest, I.T., Al Naiemi, N., Kalpoe, J.S., Rijnsburger, M.C., Raadsen, S.A., Ligtenberg-Burgman, I., van der Zwaluw, K.W., Heck, M., Savelkoul, P.H., Kluytmans, J.A. and Vandenbroucke-Grauls, C.M. (2013) High prevalence of ESBL-producing Enterobacteriaceae carriage in Dutch community patients with gastrointestinal complaints. Clin Microbiol Infect 19(6), 542-549.

Reuland, E.A., Sonder, G.J., Stolte, I., Al Naiemi, N., Koek, A., Linde, G.B., van de Laar, T.J., Vandenbroucke-Grauls, C.M. and van Dam, A.P. (2016) Travel to Asia and traveller's diarrhoea with antibiotic treatment are independent risk factors for acquiring ciprofloxacin-resistant and extended spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae-a prospective cohort study. Clin Microbiol Infect 22(8), 731 e731-737.

Rooney, P.J., O'Leary, M.C., Loughrey, A.C., McCalmont, M., Smyth, B., Donaghy, P., Badri, M., Woodford, N., Karisik, E. and Livermore, D.M. (2009) Nursing homes as a reservoir of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing ciprofloxacin-resistant Escherichia coli. J Antimicrob Chemother 64(3), 635-641.

Ruppe, E., Armand-Lefevre, L., Estellat, C., Consigny, P.H., El Mniai, A., Boussadia, Y., Goujon, C., Ralaimazava, P., Campa, P., Girard, P.M., Wyplosz, B., Vittecoq, D., Bouchaud, O., Le Loup, G., Pialoux, G., Perrier, M., Wieder, I., Moussa, N., Esposito-Farese, M., Hoffmann, I., Coignard, B., Lucet, J.C., Andremont, A. and Matheron, S. (2015) High Rate of Acquisition but Short Duration of Carriage of Multidrug-Resistant Enterobacteriaceae After Travel to the Tropics. Clin Infect Dis 61(4), 593-600.

Schmitt, H., Blaak, H., Kemper, M., de Rijk, S.E., Van de Schans, M. and De Roda Husman, A.M. (2018) Carbapenemase-producerende Enterobacteriaceae (CPE) in ziekenhuisafvalwater. RIVM Rapport 2018-0114.

Schmitt, H., Blaak, H., Kemper, M., van Passel, M., Hierink, F., van Leuken, J., De Roda Husman, A.M., van der Grinten, E., Rutgers, M., Schijven, J., De Man, H., Hoeksma, P. and Zuidema, T. (2017) Bronnen van antibioticaresistente bacterien in het milieu en mogelijke maatregelen. RIVM Rapport 2017-0085.

Suetens, C., Latour, K., Karki, T., Ricchizzi, E., Kinross, P., Moro, M.L., Jans, B., Hopkins, S., Hansen, S., Lyytikainen, O., Reilly, J., Deptula, A., Zingg, W., Plachouras, D., Monnet, D.L. and The Healthcare-Associated Infections Prevalence Study, G. (2018) Prevalence of healthcare-associated infections, estimated incidence and composite antimicrobial resistance index in acute care hospitals and long-term care facilities: results from two European point prevalence surveys, 2016 to 2017. Euro Surveill 23(46).

Tacconelli, E. and Magrini, N. (2017) Global Priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. http://www.who.int/medicines/publications/WHO-PPL-Short_Summary_25Feb-ET_NM_WHO.pdf?ua=1.

Tzouvelekis, L.S., Markogiannakis, A., Piperaki, E., Souli, M. and Daikos, G.L. (2014) Treating infections caused by carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. Clin Microbiol Infect 20(9), 862-872.

van der Zwaluw, K., de Haan, A., Pluister, G.N., Bootsma, H.J., de Neeling, A.J. and Schouls, L.M. (2015) The carbapenem inactivation method (CIM), a simple and low-cost alternative for the Carba NP test to assess phenotypic carbapenemase activity in gram-negative rods. PLoS One 10(3), e0123690.

van Hattem, J.M., Arcilla, M.S., Bootsma, M.C., van Genderen, P.J., Goorhuis, A., Grobusch, M.P., Molhoek, N., Oude Lashof, A.M., Schultsz, C., Stobberingh, E.E., Verbrugh, H.A., de Jong, M.D., Melles, D.C. and Penders, J. (2016) Prolonged carriage and potential onward transmission of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in Dutch travelers. Future Microbiol 11, 857-864.

van Hoek, A.H., Schouls, L., van Santen, M.G., Florijn, A., de Greeff, S.C. and van Duijkeren, E. (2015) Molecular characteristics of extended-spectrum cephalosporin-resistant Enterobacteriaceae from humans in the community. PLoS One 10(6), e0129085.

van Kleef, E., Wielders, L., Bijkerk, P., Beishuizen, B., Schouls, L., van der Lubben, M. and De Greeff, S. (2019) Puntprevalentieonderzoek naar antibioticaresistentie in verpleeghuizen. RIVM Briefrapport 2019-0039.

WHO (2003) Guidelines for environmental surveillance of poliovirus circulation. Available: http://polioeradication.org/wp-content/uploads/2016/07/WHO_V-B_03.03_eng.pdf.

Wirth, T., Falush, D., Lan, R., Colles, F., Mensa, P., Wieler, L.H., Karch, H., Reeves, P.R., Maiden, M.C., Ochman, H. and Achtman, M. (2006) Sex and virulence in *Escherichia coli*: an evolutionary perspective. Mol Microbiol 60(5), 1136-1151.

8 Bijlagen

8.1 Details monstername

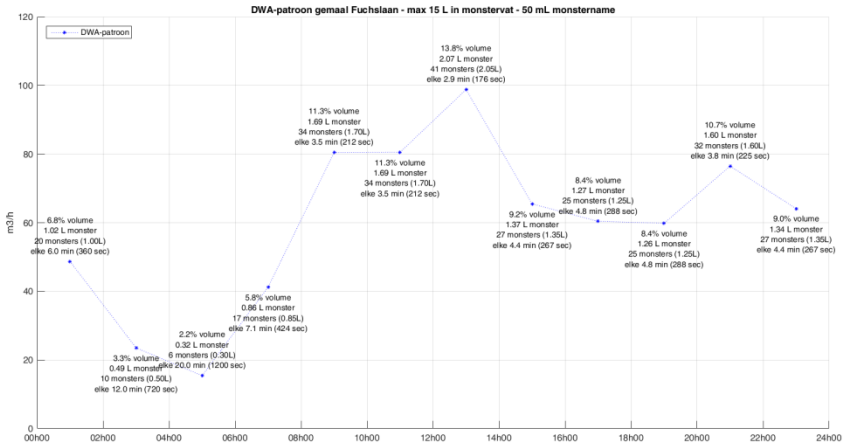
De monsters zijn genomen met automatische vacuümkasten (figuur 8.1-1) en een meetwagen (figuur 8.1-3) die zelfstandig 24-uurs monsters kunnen verzamelen. Op 8 van de 9 locaties is debietproportioneel bemonsterd op basis van eerder verzamelde debietgegevens (7 locaties) of op basis van een debietsensor (1 locatie). Op 1 locatie (verpleeghuis) waren geen debietgegevens beschikbaar en is noodgedwongen tijdproportioneel bemonsterd.

Gemalen Gemeente Utrecht
Voor de aansturing van de monstername uit de kelders van vijf gemalen van gemeente Utrecht is een "droogweerafvoer" of DWA-patroon afgeleid. Een DWA-patroon geeft de gemiddelde afvoer van een rioolgemaal als het droog weer is (en het afvalwater dus niet 'verdund' wordt met regenwater). Het patroon is afgeleid op basis van meetgegevens van de gemalen in de droogweerperiode 16-28 februari 2018.



Figuur 8.1-1. De gebruikte vacuümkast bij gemaal Tuindorp (links) en bij de meetlocatie in Oog in Al (rechts).

Om een monster te krijgen wat qua samenstelling representatief is voor het afvalwater wat gedurende een dag uit het gebied stroomt, is per blok van 2 uur bepaald welk deel van de dagelijkse afvoer in die periode verpompt wordt (figuur 8.1-2). Bijvoorbeeld: tussen 12h00 en 14h00 verpompt het gemaal 13,8% van het dagelijks volume. Om een representatief monster te krijgen moet 13,8% van het monster bestaan uit water dat in die periode wordt aangevoerd. Er past maximaal 15 L water in een vat, dus tussen 12h00 en 14h00 moet in totaal 2,07 L bemonsterd worden. Per monstername wordt 50 mL bemonsterd, dus in die 2 uur moet 41 maal bemonsterd worden, ofwel 1 monstername elke 2,9 minuten (= 176 seconden). De vacuümkast is per locatie geprogrammeerd om per blok de monsternamefrequentie aan te passen volgens het voor de monsterlocatie geldende schema zoals in figuur 8.1-2.



Figuur 8.1-2.DWA-patroon gedurende een etmaal bij een van de bemonsterde gemalen (Tuindorp-Fuchslaan).

Oog in Al (duiker Leidsche Rijn)
Voor het bemonsteren van de wijk Oog in Al is gekozen voor de laatste inspectieput vóór de duiker onder de Leidsche Rijn door. Er zijn voor deze locatie geen historische debietgegevens beschikbaar. Er is gekozen om te bemonsteren volgens het schema van gemaal Tuindorp. Dit omdat beide wijken vergelijkbaar zijn in termen van inwonersaantal en type wijk.

Ziekenhuis
Afvalwater van het ziekenhuis is bemonsterd uit een meetput. In die meetput is een debietmeting aanwezig. Historische data van de periode april-mei 2018 is gebruikt om een DWA-patroon af te leiden. Omdat de afvoer in het weekend beduidend anders is dan op weekdagen, zijn twee verschillende DWA-patronen afgeleid.

AZC
Afvalwater van het AZC is bemonsterd met behulp van een meetwagen (figuur 8.1-3). De afvoerende rioolbuis is voor de metingen geblokkeerd, de volledige afvoer via de meetwagen verpompt, en verderop weer in het riool geloosd. De meetwagen is voorzien van een debietmeter waarmee voorafgaand aan en tijdens de monstername een aantal dagen de afvoer is gemeten. De debietmeter is gebruikt voor de aansturing van de monstername (60 ml monster elke 0,3 m^3).



Figuur 8.1-3. Monstername met behulp van een meetwagen bij het AZC.

Verpleeghuis
Afvalwater van het verpleeghuis is bemonsterd vanuit de huisaansluiting van het verpleeghuis (dat wil zeggen: de buis die het verpleeghuis op het hoofdriool aansluit). De buis komt hoog uit in het rioolstelsel waardoor het mogelijk was onder de buis een emmer op te hangen, en vanuit deze emmer te bemonsteren. Ter voorkoming van verstoppingen door bijvoorbeeld wc-papier is de emmer afgedekt met een rooster (figuur 8.1-4). Vanwege gebrek aan informatie over debieten op deze locatie is tijdproportioneel bemonsterd (monstername 50 ml elke 10 minuten).



Figuur 8.1-4. Gebruikte constructie voor de monstername bij het verpleeghuis.

8.2 Gebruikte primers voor moleculaire analyses

PCR primers gebruikt voor aantonen aanwezigheid van beta-lactamase genen

Primer	Sequentie	Grootte PCR product (bp)	Hybridisatie positie[a]	Ref[b]
GES_463F	5'-AGT CGG CTA GAC CGG AAA G-3'	399	463-481	1
GES_861R	5'-TTT GTC CGT GCT CAG GAT-3'		861-844	1
IMP_194F	5'-TTG ACA CTC CAT TTA CDG-3'	139	194-211	1
IMP_332R	5'-GAT YGA GAA TTA AGC CAC YCT-3'		332-313	1
KPC_32F	5'-CTT GTC TCT CAT GGC CGC TGG-3'	449	32-52	2
KPC_ 480R	5'-ACG GAA CGT GGT ATC GCC GAT-3'		480-460	2
NDM_45F	5'-CGC ATT AGC CGC TGC ATT GA-3'	591	54-64	2
NDM_635R	5'-TCC TTG ATC AGG CAG CCA CC-3'		635-616	2
OXA48_31F	5'-TTG GTG GCA TCG ATT ATC G-3'	704	31-49	3
OXA48_774R	5'-GAG CAC TTC TTT TGT GAT GGC-3'		774-754	3
VIM_151F	5'-GAT GGT GTT TGG TCG CAT A-3'	390	151-169	1
VIM_540R	5'-CGA ATG CGC AGC ACC AG-3'		540-524	1
CTX-M-1g_61F	5'-TTA GGA ART GTG CCG CTG YA-3'	688	61 – 80	1
CTX-M-1g_748R	5'-CGA TAT CGT TGG TGG TRC CAT-3'		748 – 728	1
CTX-M-9g_299F	5'-TCA AGC CTG CCG ATC TGG T-3'	561	299 – 317	1
CTX-M-9g_859R	5'-TGATTCTCGCCGCTGAAG-3'		859 – 842	1
TEM_13F	5'-CATTTCCGTGTCGCCCTTATTC-3'	800	13-34	1
TEM_812R	5'-CGTTCATCCATAGTTGCCTGAC-3'		812-791	1
SHV_71F	5'-AGCCGCTTGAGCAAATTAAAC-3'	713	71-91	1
SHV_783R	5'-ATCCCGCAGATAAATCACCAC-3'		783-763	1
OXA'_201F	5'-GGCACCAGATTCAACTTTCAAG-3'	564	201-222	1
OXA_764R	5'-GACCCCAAGTTTCCTGTAAGTG-3		764-743	1

[a]Vanaf base 'A'van start het codon (ATG). bp=baseparen.[b]Referenties: 1 (Dallenne et al. 2010), 2(van der Zwaluw et al. 2015),3 (Blaak et al. 2019).

Primers gebruikt voor sequencen

Primer	Sequentie	Hybridisatie positie[a]	**Product** bp	az	Positie (az)	Ref.[c]
GES-58-F	5'-GAA AAA TTA ACC TTC AAG ACC-3'	58-78	641	213	27-239	1
GES-739-R	5'-GGG CTT TAA AAA AAC CAA TG-3'	739-720				1
KPC_-6F	5'-TCG TTG ATG TCA CTG TAT CG -3'	-6-14[d]	868	289	6-294	2
KPC_+124R	5'-GCT CTA CAG AAA ACC GGT C-3'	+124-+106				2
NDM_16F	5'-ATT ATG CAC CCG GTC GCG AAG-3'	16-36	755	251	13-263	2
NDM_810R	5'-GCG CAG CTT GTC GGC CAT G-3'	810-792				2
OXA48_31F	5'-TTG GTG GCA TCG ATT ATC G-3'	31-49	704	237	18-251	2
OXA48_774R	5'-GAG CAC TTC TTT TGT GAT GGC-3'	774-754				2

[a]Vanaf base 'A' van start het codon (ATG). bp=baseparen, az=aminozuren. [b]Referenties: 1 deze studie, 2: (Blaak et al. 2019); Eiwitlengte: GES = 1-288 bp; KPC =1-294 bp ;NDM =1-271 bp; IMP=; OXA-48=1-276 bp

8.3 **CPE typen per meetpunt en meetmoment** (onderstaande tabel bestaat uit twee delen)

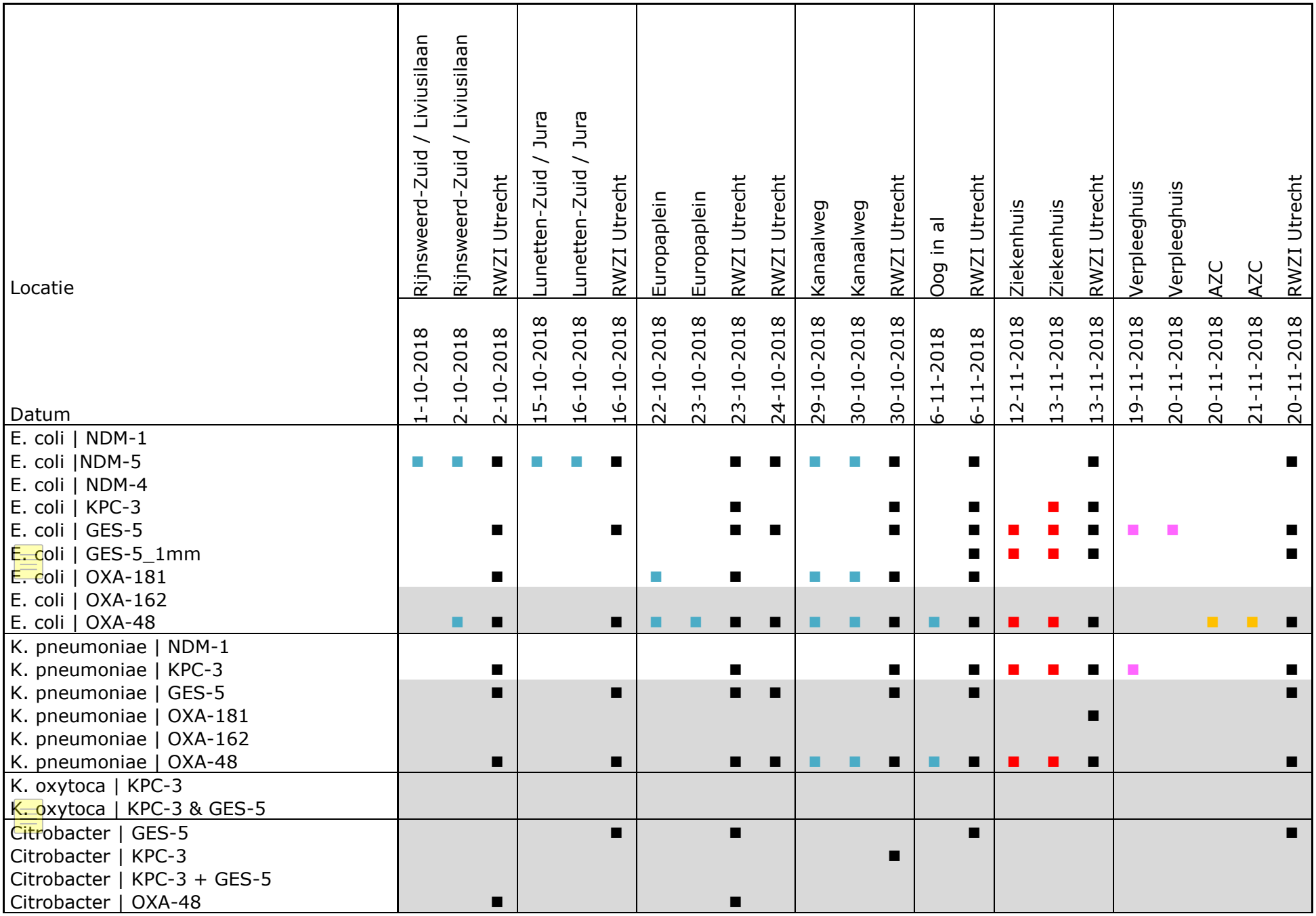
Locatie	Tuindorp/Fuchslaan	Tuindorp/Fuchslaan	RWZI Utrecht	Rijnsweerd-Zuid / Liviusilaan	RWZI Utrecht	Lunetten-Zuid / Jura	Lunetten-Zuid / Jura	RWZI Utrecht	Europaplein	Europaplein	RWZI Utrecht	Kanaalweg	Kanaalweg	RWZI Utrecht	Oog in al	Oog in al	RWZI Utrecht	Ziekenhuis	Ziekenhuis	RWZI Utrecht	AZC	AZC	RWZI Utrecht	Tuindorp/Fuchslaan	Tuindorp/Fuchslaan	RWZI Utrecht
Datum	4-6-2018	5-6-2018	5-6-2018	11-6-2018	12-6-2018	18-6-2018	19-6-2018	19-6-2018	25-6-2018	26-6-2018	26-6-2018	2-7-2018	3-7-2018	3-7-2018	9-7-2018	10-7-2018	10-7-2018	16-7-2018	17-7-2018	17-7-2018	27-8-2018	28-8-2018	28-8-2018	24-9-2018	25-9-2018	25-9-2018
E. coli | NDM-1									■	■																
E. coli |NDM-5			■	■	■			■			■	■	■	■	■	■				■						■
E. coli | NDM-4								■																		
E. coli | KPC-3								■						■			■	■	■	■						
E. coli | GES-5			■		■			■			■			■			■	■	■	■			■			
E. coli | GES-5_1mm														■												
E. coli | OXA-181					■			■	■	■	■				■		■			■	■	■	■	■	■	
E. coli | OXA-162			■		■																					
E. coli | OXA-48			■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■			■	■	■	■			■			■
K. pneumoniae | NDM-1									■	■	■			■			■									
K. pneumoniae | KPC-3			■		■			■			■			■			■	■	■	■			■			■
K. pneumoniae | GES-5																							■			■
K. pneumoniae | OXA-181								■			■															■
K. pneumoniae | OXA-162			■																	■						
K. pneumoniae | OXA-48			■		■			■	■		■	■	■	■			■	■	■	■			■			■
K. oxytoca | KPC-3			■																							
K. oxytoca | KPC-3 & GES-5			■																							
Citrobacter | GES-5																										■
Citrobacter | KPC-3																										

Locatie	Tuindorp/Fuchslaan	Tuindorp/Fuchslaan	RWZI Utrecht	Rijnsweerd-Zuid / Liviusilaan	RWZI Utrecht	Lunetten-Zuid / Jura	Lunetten-Zuid / Jura	RWZI Utrecht	Europaplein	Europaplein	RWZI Utrecht	Kanaalweg	Kanaalweg	RWZI Utrecht	Oog in al	Oog in al	RWZI Utrecht	Ziekenhuis	Ziekenhuis	RWZI Utrecht	AZC	AZC	RWZI Utrecht	Tuindorp/Fuchslaan	Tuindorp/Fuchslaan	RWZI Utrecht
Datum	4-6-2018	5-6-2018	5-6-2018	11-6-2018	12-6-2018	18-6-2018	19-6-2018	19-6-2018	25-6-2018	26-6-2018	26-6-2018	2-7-2018	3-7-2018	3-7-2018	9-7-2018	10-7-2018	10-7-2018	16-7-2018	17-7-2018	17-7-2018	27-8-2018	28-8-2018	28-8-2018	24-9-2018	25-9-2018	25-9-2018
Citrobacter | KPC-3 + GES-5																	■									
Citrobacter | OXA-48																	■	■		■						
Enterobacter CC | GES-5			■				■										■	■	■	■						■
Enterobacter CC | KPC-3							■										■		■				■			
Enterobacter CC | KPC-3 & GES-5							■							■			■	■	■	■						
Enterobacter CC | KPC-3 & GES-5 & GES-6																										
Enterobacter CC | NDM-1									■	■	■															
Enterobacter CC | OXA-48					■										■											■
P. rettgeri | KPC-3																										

Aantal verschillende CPE typen per meetmoment

Alle CPE typen										
In wijken en instellingen	0	2	1	6	3	3	9	1	1
Oók in RWZI op zelfde moment	n.v.t.	2	1	5	3	1	8	1	0

Met WGS onderzochte CPE typen[a]									
In wijken en instellingen	0	1	0	3	1	2	3	1	1
Oók in RWZI op zelfde moment	n.v.t.	1	n.v.t	2	1	1	3	1	0


Locatie
Datum
Rijnsweerd-Zuid / Liviusilaan
Rijnsweerd-Zuid / Liviusilaan
RWZI Utrecht
Lunetten-Zuid / Jura
Lunetten-Zuid / Jura
RWZI Utrecht
Europaplein
Europaplein
RWZI Utrecht
RWZI Utrecht
Kanaalweg
Kanaalweg
RWZI Utrecht
Oog in al
RWZI Utrecht
Ziekenhuis
Ziekenhuis
RWZI Utrecht
Verpleeghuis
Verpleeghuis
AZC
AZC
RWZI Utrecht
1-10-2018
2-10-2018
2-10-2018
15-10-2018
16-10-2018
16-10-2018
22-10-2018
23-10-2018
23-10-2018
24-10-2018
29-10-2018
30-10-2018
30-10-2018
6-11-2018
6-11-2018
12-11-2018
13-11-2018
13-11-2018
19-11-2018
20-11-2018
20-11-2018
21-11-2018
20-11-2018
E. coli | NDM-1
E. coli |NDM-5
E. coli | NDM-4
E. coli | KPC-3
E. coli | GES-5
E. coli | GES-5_1mm
E. coli | OXA-181
E. coli | OXA-162
E. coli | OXA-48
K. pneumoniae | NDM-1
K. pneumoniae | KPC-3
K. pneumoniae | GES-5
K. pneumoniae | OXA-181
K. pneumoniae | OXA-162
K. pneumoniae | OXA-48
K. oxytoca | KPC-3
K. oxytoca | KPC-3 & GES-5
Citrobacter | GES-5
Citrobacter | KPC-3
Citrobacter | KPC-3 + GES-5
Citrobacter | OXA-48

Locatie	Rijnsweerd-Zuid / Liviusilaan	Rijnsweerd-Zuid / Liviusilaan	RWZI Utrecht	Lunetten-Zuid / Jura	Lunetten-Zuid / Jura	RWZI Utrecht	Europaplein	Europaplein	RWZI Utrecht	RWZI Utrecht	Kanaalweg	Kanaalweg	RWZI Utrecht	Oog in al	RWZI Utrecht	Ziekenhuis	Ziekenhuis	RWZI Utrecht	Verpleeghuis	Verpleeghuis	AZC	AZC	RWZI Utrecht
Datum	1-10-2018	2-10-2018	2-10-2018	15-10-2018	16-10-2018	16-10-2018	22-10-2018	23-10-2018	23-10-2018	24-10-2018	29-10-2018	30-10-2018	30-10-2018	6-11-2018	6-11-2018	12-11-2018	13-11-2018	13-11-2018	19-11-2018	20-11-2018	20-11-2018	21-11-2018	20-11-2018
Enterobacter CC | GES-5			■							■			■		■			■					
Enterobacter CC | KPC-3																	■						
Enterobacter CC | KPC-3 & GES-5			■												■	■	■	■					
Enterobacter CC | KPC-3 & GES-5 & GES-6																		■	■	■			■
Enterobacter CC | NDM-1																							
Enterobacter CC | OXA-48			■								■	■											
P. rettgeri | KPC-3									■						■								

	Aantal verschillende CPE typen per meetmoment									Σ
Alle CPE typen										□
In wijken en instellingen	2	1	2	5	2	8	4			50
Oók in RWZI op zelfde moment	2	1	2	4	2	7	4			43

Met WGS onderzochte CPE typen[a]										Σ
In wijken en instellingen	1	1	1	2	0	4	2			23
Oók in RWZI op zelfde moment	1	1	1	2	n.v.t.	4	2			20

Weergegeven zijn de monsterlocaties en data waar de aangegeven CPE-typen zijn gevonden. De kleur van de symbolen geven de typen afvalwater weer: zwart=RWZI, blauw=wijk, rood=ziekenhuis, roze=verpleeghuis, geel=asielzoekerscentrum. De cijfers onder aan de tabel geven de totale aantallen CPE-typen per wijk of instelling weer met daaronder het aantal van deze CPE-typen dat op hetzelfde moment ook in de RWZI werden gevonden. Met behulp van grijze arcering zijn de CPE-typen weergegeven die niet zijn geselecteerd voor WGS. [a]Het aantal CPE-typen per wijk of instelling dat ook is geselecteerd voor WGS, met daaronder het aantal van deze CPE-typen dat op hetzelfde moment ook in de RWZI werden gevonden.Σ=som

RIVM
De zorg voor morgen begint vandaag