



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

**Carbapenemase-producerende
Enterobacteriaceae (CPE) in
ziekenhuisafvalwater**

RIVM Briefrapport 2018-0114
H. Schmitt et al.



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

Carbapenemase-producerende *Enterobacteriaceae* (CPE) in ziekenhuisafvalwater

RIVM Briefrapport 2018-0114
H. Schmitt et al.

Colofon

© RIVM 2018

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-2018-0114

H. Schmitt (auteur), RIVM
H. Blaak (auteur), RIVM
M.A. Kemper (auteur), RIVM
S.E. de Rijk (auteur), RIVM
M. van de Schans (auteur), RIKILT
A.M. de Roda Husman (auteur), RIVM

Contact:
Heike Schmitt
Z&O
Heike.schmitt@rivm.nl

Met dank aan: alle betrokken waterschappen, rwzi's en ziekenhuizen.

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 ziekenhuisafvalwater

Carbapenemase-producerende *Enterobacteriaceae* (CPE) kunnen ontstekingen veroorzaken die met de gangbare antibiotica moeilijk te behandelen zijn. Ze vormen daardoor een bedreiging voor de medische zorg. Het is dan ook belangrijk dat deze resistente bacteriën zich niet verder verspreiden onder mensen, dieren en in het milieu.

Het RIVM heeft onderzocht of het zinvol is om afvalwater van ziekenhuizen te zuiveren om de verspreiding van CPE in het milieu tegen te gaan. Het afvalwater van ziekenhuizen blijkt echter maar een klein deel te bevatten van het aantal van deze bacteriën dat via afvalwater in het oppervlaktewater terechtkomt. Deze maatregel kan er daarom niet voor zorgen dat er substantieel minder CPE in het milieu terechtkomen.

Antibioticaresistente bacteriën komen met menselijke ontlasting vanuit ziekenhuizen alsook vanuit de algemene bevolking in afvalwaterzuiveringsinstallaties terecht. Aangezien de bacteriën daar niet volledig worden verwijderd, belanden ze vervolgens in het oppervlaktewater. Voor dit onderzoek is bij vijf ziekenhuizen en bij de bijbehorende afvalwaterzuiveringsinstallaties het afvalwater gedurende 24 uur gemeten. De hoeveelheid aangetroffen CPE varieerden sterk per meetmoment. Meestal is minder dan 10 procent van het totale aantal CPE in de afvalwaterzuivering afkomstig van het afvalwater van ziekenhuizen. Bij sommige ziekenhuizen (een derde van de metingen) konden de aantallen op bepaalde momenten oplopen tot 10 tot 60 procent. Ook komt maar een klein deel van restanten van antibiotica (residuen) van het afvalwater van ziekenhuizen.

Kernwoorden: antibioticaresistentie, afvalwater, ziekenhuisafvalwater, gemeentelijk afvalwater, carbapenemase-producerende *Enterobacteriaceae* (CPE), resistentiegenen, antibioticaresiduen

Synopsis

Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* (CPE) in hospital waste water

Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* (CPE) can cause infections that are difficult to treat with the commonly used antibiotics. They are therefore a threat to public health. Accordingly, it's important to ensure that these resistant bacteria do not spread further in human beings and in the environment.

RIVM has investigated whether it would make sense to treat hospital waste water in order to combat the spread of CPE in the environment. However, it turns out that hospital waste water contains only a small fraction of all the CPE bacteria that end up in surface water via waste water. This measure would therefore not substantially reduce the number of CPE that enter the environment.

Antibiotic-resistant bacteria end up in waste water treatment facilities via human faeces from hospitals and from the general population. As they are not completely removed there, they then end up in surface water. For this investigation, the waste water from five hospitals and the associated waste water treatment facilities was analysed during 24 hours. The quantity of CPE found varied greatly over time. Generally, less than 10% of the total amount of CPE in the waste water treatment facilities comes from hospital waste water. For some hospitals (one third of the measurements), these numbers can increase to 10 to 60% at certain moments. It was also found that only a small part of antibiotic residues originates in hospital waste water.

Keywords: antibiotic resistance, waste water, hospital waste water, municipal waste water, carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* (CPE), resistance genes, antibiotic residues

Inhoudsopgave

Samenvatting — 9

1 Inleiding — 13

- 1.1 Aanleiding — 13
- 1.2 Doel — 13
- 1.3 Aanpak — 13
- 1.4 Achtergrond — 13
 - 1.4.1 Klinische relevantie van CPE — 13
 - 1.4.2 Verspreiding van CPE via het milieu — 14
 - 1.4.3 Emissies van antibiotica en resistentiegenen uit ziekenhuizen — 15

2 Methoden — 17

- 2.1 Methode in het kort — 17
- 2.2 Methode in detail — 17
 - 2.2.1 Ziekenhuizen, RWZIs en monsternames — 17
 - 2.2.2 Isolatie van CPE — 19
 - 2.2.3 Typering van CPE — 20
 - 2.2.4 Berekenen van concentraties en vrachten — 21
 - 2.2.4.1 Bepalen van concentraties — 21
 - 2.2.4.2 Detectielimiet, gemiddelden en ratio's — 22
 - 2.2.4.3 Vrachten — 22
 - 2.2.5 Analyse van antibioticaresistentiegenen — 22
 - 2.2.6 Analyse van residuen van antibiotica — 23

3 Resultaten — 25

- 3.1 Prevalentie CPE in ziekenhuisafvalwater en RWZI influent — 25
- 3.2 Typen CPE — 26
- 3.3 CPE concentraties — 28
- 3.4 Relatieve CPE vrachten in ziekenhuisafvalwater en RWZI influent — 29
- 3.5 Antibioticaresistentiegenen in (ziekenhuis)afvalwater — 33
- 3.6 Residuen van antibiotica in ziekenhuisafvalwater — 34

4 Discussie en conclusies — 37

5 Referenties — 41

6 Annex — 43

- 6.1 Analyse van antibioticaresiduen — 43
 - 6.1.1 Analysis of tetracyclines, sulfonamides, macrolides and quinolones — 43
 - 6.1.2 Analysis of aminoglycosides — 43
 - 6.1.3 Analysis of β -lactams — 44

Samenvatting

Achtergrond

Carbapenems zijn belangrijke antibiotica voor de behandeling van infecties met bijzonder resistente micro-organismen (BRMO). Indien een infectie optreedt met bacteriën die resistent zijn tegen deze antibiotica (carbapenemase producerende *Enterobacteriaceae* of CPE) zijn de mogelijkheden om met antibiotica te behandelen beperkt. Een toename van de verspreiding van CPE is niet wenselijk gezien de mogelijke dreiging voor de volksgezondheid.

Een mogelijke maatregel tegen de verspreiding van CPE in het milieu is zuivering van afvalwater van ziekenhuizen. Dit omdat CPE in de darmen van mensen zitten en na uitscheiding in het riool komen. In 2016 is het voorkomen van CPE in afvalwater van 100 rioolwaterzuiveringsinstallaties (RWZI) onderzocht. In zowel het instromend (influent) als het gezuiverde afvalwater (effluent) werden CPE aangetroffen. De concentraties van CPE waren laag ten opzichte van veel voorkomende bacteriën zoals niet-resistente *E. coli*. Uit de resultaten kon niet worden vastgesteld hoe groot de bijdrage is van afvalwater uit ziekenhuizen ten opzichte van huishoudens en andere bronnen aan de totale hoeveelheid CPE in het RWZI. Dit is van belang om het effect van maatregelen specifiek gericht op de behandeling van ziekenhuisafvalwater te bepalen.

Doel van het onderzoek en aanpak

Om een beter inzicht in de relatieve bijdrage van ziekenhuizen als bronnen van CPE te krijgen ten opzichte van afvalwater uit huishoudens zijn metingen verricht van CPE in afvalwater van een aantal ziekenhuizen. Naast CPE zijn ook ESBL-producerende *E. coli*, resistentiegenen en antibioticaresiduen in het ziekenhuisafvalwater onderzocht. Ook is gemeten in het influent van de RWZI's waar het afvalwater van deze ziekenhuizen naar toe geleid wordt en wordt behandeld. In totaal zijn er 26 gepaarde metingen gedaan bij 8 ziekenhuizen en 7 RWZI's (twee van de ziekenhuizen lozen op dezelfde RWZI). Met een gepaarde meting wordt bedoeld dat de meting in het afvalwater van een ziekenhuis en in het influent van de bijbehorende RWZI op dezelfde dag plaatsvond. 17 van deze metingen (in 5 ziekenhuizen en 4 RWZI) konden gebruikt worden voor de berekening van vrachten.

“Vrachten” in ziekenhuisafvalwater en RWZI influent

De vracht aan CPE is het aantal CPE dat per dag met het afvalwater uit het ziekenhuis naar de RWZI stroomt. De vracht wordt berekend uit de concentratie CPE in ziekenhuisafvalwater en de hoeveelheid afvalwater dat een ziekenhuis per dag loost. De vracht aan CPE die de afvalwaterzuivering bereiken kan berekend worden uit de concentratie van CPE in RWZI influent en de hoeveelheid gezuiverd afvalwater. Door de vracht uit ziekenhuizen te vergelijken met de vracht aan CPE die het RWZI bereiken kan de bijdrage van het ziekenhuis worden berekend. Eenzelfde berekening kan worden gedaan voor *E. coli* en ESBL *E. coli*, resistentiegenen en antibioticaresiduen.

Het aandeel van ziekenhuisafvalwater aan de vrachten van CPE varieerde sterk tussen de onderzochte ziekenhuizen, tussen de herhaalde metingen per ziekenhuis en ook tussen de typen CPE, wat waarschijnlijk door het lage aantal CPE dragers veroorzaakt wordt. In ongeveer een derde van de metingen lag het aandeel van ziekenhuisafvalwater voor bepaalde typen CPE tussen 10-63%. In de meeste metingen was het aandeel van ziekenhuisafvalwater aan de vracht van CPE echter klein (<10%). Het merendeel van de CPE in het verzamelde afvalwater is daarmee niet van ziekenhuizen afkomstig, maar van huishoudelijk afvalwater.

Het aandeel van ziekenhuisafvalwater aan de *E. coli* vrachten bedroeg 0.5%. Dit komt overeen met het gemiddelde aandeel van ziekenhuisafvalwater aan het totale afvalwater van 0.9% in de onderzochte ziekenhuizen. Ook was de spreiding laag (0,04% tot 2%), een teken dat afvalwatermetingen in principe geschikt zijn om het aandeel van verschillende bronnen vast te stellen.

De beperkte bijdrage van ziekenhuizen aan de totale CPE in afvalwater werd ondersteund door nader onderzoek van de CPE genen in de bacteriële isolaten. Sommige CPE genotypen die in RWZI influent werden aangetroffen zijn mogelijk afkomstig van ziekenhuisafvalwater, omdat daarin dezelfde genotypen werden gevonden. Aan de andere kant werden in RWZI influent ook CPE genotypen gevonden die niet in ziekenhuisafvalwater aangetoond werden en daarmee vermoedelijk afkomstig zijn van dragers uit de bevolking.

Voor antibioticaresiduen waren alleen schattingen van de vrachten beschikbaar, gebaseerd op vergelijkingen van in deze studie gemeten residuen in ziekenhuisafvalwater met concentraties in RWZI influent gemeten in een eerder project. De geschatte vrachten van antibiotica in ziekenhuisafvalwater waren lager dan de vrachten in RWZI influent tot maximaal 10-30% voor enkele stoffen.

Concentraties in ziekenhuisafvalwater en RWZI influent

CPE werden in afvalwater van 6 van de 8 ziekenhuizen en in alle RWZI influenten aangetroffen. Van het totale aantal monsters genomen in deze ziekenhuizen waren 62% (18/29) positief, vergeleken met 100% van de monsters van RWZI influent (26/26). In ziekenhuisafvalwater waarin CPE gevonden werd was de gemiddelde concentratie van CPE significant maar licht verhoogd ten opzichte van die in RWZI influent. De concentraties van één resistentiegen (*su11*) en enkele antibioticaresiduen (ciprofloxacin, doxycycline, sulfamethoxazol en trimethoprim) lagen in ziekenhuisafvalwater gemiddeld hoger dan in RWZI influent. Het resistentiegen *ermB* en andere antibioticaresiduen (sulfapyridine, tetracycline, norfloxacin) vertoonden vergelijkbare concentraties in ziekenhuisafvalwater en RWZI influent.

Conclusies

In deze studie werd aangetoond dat de bijdrage van afvalwater uit ziekenhuizen aan het voorkomen van CPE in RWZIs sterk afhangt van het ziekenhuis en het tijdstip van de meting. Ziekenhuizen zijn in nagenoeg alle metingen niet de voornaamste bron van CPE: ze dragen in het merendeel van de metingen minder dan 10% aan de totale CPE in

het verzamelde afvalwater bij. Voor antibioticaresiduen en resistentiegenen geldt dat voor enkele stoffen en genen verhoogde concentraties in ziekenhuisafvalwater worden gevonden. Ziekenhuisafvalwater verklaart meestal minder dan 30% van de totale vrachten in het verzamelde afvalwater.

Door afvalwaterbehandeling in het ziekenhuis kunnen de lozingen van CPE uit ziekenhuisafvalwater worden verminderd. Afvalwaterzuivering bij ziekenhuizen kan echter maar een klein deel van de totale lozingen van resistente bacteriën naar het milieu voorkomen, omdat het merendeel van de CPE – behalve dan in enkele metingen – niet van het ziekenhuis afkomstig was. Een vermindering van de verspreiding van CPE met afvalwater kan daarom effectiever worden ingezet bij RWZIs.

1 Inleiding

1.1 Aanleiding

In een recent RIVM onderzoek naar Carbapenemase-Producterende *Enterobacteriaceae* (CPE) in afvalwater bleek dat CPE aan te tonen waren in 89% van 100 onderzochte rioolwaterzuiveringsinstallaties (RWZIs). Omdat CPE in zorginstellingen kunnen worden aangetroffen (Nethmap 2017, ECDC 2018), zouden zorginstellingen een belangrijke puntbron van deze resistente bacteriën kunnen zijn. De bevindingen in RWZIs (Schmitt et al. 2017) waren echter niet geschikt om te concluderen of ziekenhuizen een belangrijke bron zijn van CPE in gemeentelijk afvalwater.

Naast CPE werden in afvalwater ook genen die coderen voor antibioticaresistentie, alsmede residuen van antibiotica gevonden (Schmitt et al. 2017). Ook voor antibiotica en resistentiegenen geldt de vraag in hoe verre zorginstellingen en met name ziekenhuizen een belangrijke puntbron voor emissies van resistentiegenen en antibioticaresiduen vormen.

Gescheiden behandeling van afvalwater is herhaaldelijk als mogelijke beheersmaatregel voorgesteld om de emissies van geneesmiddelen naar het milieu te reduceren. (Derksen en Roorda 2005). Inzicht in de rol van ziekenhuizen als puntbronnen van emissies van resistente bacteriën helpt in het beoordelen van het effect van gescheiden behandeling van ziekenhuisafvalwater voor bijzonder resistente micro-organismen (BRMO's).

1.2 Doel

Het doel van het huidige onderzoek was om vast te stellen in welke mate ziekenhuizen bijdragen aan de aanwezigheid van CPE en andere relevante resistente bacteriën (ESBL producerende *E. coli*) in het afvalwater, ten opzicht van andere bronnen zoals huishoudens. Ook werd het vóórkomen van resistentiegenen en antibioticaresiduen in afvalwater van zorginstellingen onderzocht.

1.3 Aanpak

Om de bijdrage van ziekenhuizen aan CPE in gemeentelijk afvalwater vast te stellen werd het afvalwater van ziekenhuizen en ontvangende RWZIs onderzocht op concentraties, totale aantallen, en typen CPE, alsmede op de concentraties aan antibioticaresiduen en antibiotica resistentiegenen.

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 penicillines, cephalosporines en carbapenems. Deze resistentie, die vaak gepaard gaat met resistentie tegen andere klassen van antibiotica,

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 carbapenemase-producerende *Enterobacteriaceae* (CPE) worden daarom gezien als een dreiging voor de volksgezondheid (Bell 2013, Tacconelli and Magrini 2017).

In tegenstelling tot infecties met CPE is de aanwezigheid van CPE in de bacteriële gemeenschap van de darmen ("dragerschap") veelal niet direct bedreigend voor de persoon zelf. Wel kan dragerschap tot de verspreiding van CPE bijdragen.

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 en vooral bij ziekenhuisuitbraken voorkomen (Nethmap/MARAN 2017?). Daarnaast wordt het voorkomen van CPE in Nederland geassocieerd met reizen naar (van Hattem et al. 2016) en ziekenhuis opname in het buitenland (Nethmap/MARAN 2017).

Dragerschap in de algemene bevolking wordt heel erg laag geschat (Reuland et al. 2013, van Hattem et al. 2016, van Hoek et al. 2015).

1.4.2 *Verspreiding van CPE via het milieu*

Als mensen drager zijn van CPE komen deze bacteriën, net als alle darmbacteriën, met uitwerpselen in het riool terecht. Rioolwater verzamelt zich bij RWZIs waar het gezuiverd wordt. Het rioolwater dat bij RWZIs binnenkomt, bestaat grotendeels uit afvalwater, afkomstig van huishoudens (in Nederland gemiddeld 72%, gemeten aan het drinkwaterververbruik), en bedrijven en instellingen (gemiddeld 27%), waaronder ziekenhuizen (gemiddeld 0.7%, Schmitt et al. 2017). Er zijn in Nederland verschillende typen rioleringsstelsels, wat ruwweg op te delen is in 2 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.

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, 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 verondersteld grotendeels van humane oorsprong te zijn, en daarmee een mogelijkheid te bieden voor surveillance van humane darmpathogenen.

De zuivering die door RWZIs wordt toegepast verwijdert ongeveer 99% tot 99,9% van alle bacteriën uit het afvalwater. Dat klinkt veel, maar omdat er miljarden (10^{13} - 10^{16}) darmbacteriën in het ongezuiverde afvalwater zitten, betekent dat dat er per dag, en per RWZI, biljoenen (10^{10} - 10^{14}) darmbacteriën het zuiveringsproces overleven. Deze bacteriën komen in het oppervlaktewater terecht. Bij 89% van de RWZIs zitten hier ook CPE bij (variërend tussen 10^5 en 10^{10} per RWZI per dag). Eenmaal in het water is het mogelijk dat mensen of dieren deze CPE weer binnenkrijgen, met verdere verspreiding van CPE tot gevolg. Een

manier om dit te voorkomen is betere zuivering bij de RWZIs, wat echter enorme kosten met zich mee zou brengen. Een alternatief zou kunnen zijn om afvalwater van ziekenhuizen te zuiveren voordat het op het riool geloosd wordt. Om te bepalen of dit een effectieve maatregel is om de verspreiding van CPE te verminderen zal echter eerst moeten worden vastgesteld in welke mate ziekenhuizen bijdragen aan CPE in afvalwater.

1.4.3

Emissies van antibiotica en resistentiegenen uit ziekenhuizen

Ziekenhuisafvalwater bevat niet alleen resistente bacteriën, maar ook resistentiegenen, en residuen van geneesmiddelen waaronder antibiotica. In eerder onderzoek is bepaald dat 16-40% van de antibioticaresiduen in het influent van een RWZI uit ziekenhuizen afkomstig zijn (Roorda et al. 2009). Recent werden in Nederland resistentiegenen in ziekenhuisafvalwater en RWZI influent en effluent onderzocht, en gevonden dat ziekenhuizen de hoogste relatieve concentraties van resistentiegenen hebben, maar dat RWZI influenten die wel of niet ziekenhuisafvalwater bevatten geen verschil in de relatieve concentraties van resistentiegenen toonden (van Buelow et al. 2017).

2 Methoden

2.1 Methode in het kort

Afvalwatermonsters werden verzameld bij acht ziekenhuizen en de zeven rioolwaterzuiveringsinstallaties (RWZIs) waar het afvalwater van deze ziekenhuizen met rioolwater terecht komt. De monsters in ziekenhuizen en bij RWZIs werden op dezelfde dag genomen. Afvalwaters werden onderzocht op de aanwezigheid van CPE, gebruikmakend van selectieve kweekmedia. Selectieve kweekmedia zijn voedingsbodems waarop, door de toevoeging van specifieke stoffen waaronder antibiotica, alleen bepaalde bacteriën efficiënt op kunnen groeien. Doordat vaste volumes afvalwater werden onderzocht konden de concentraties hierin bepaald worden. De geïsoleerde CPE stammen zijn gekarakteriseerd voor wat betreft het type carbapenemase (CP)-gen, zodat ook bepaald kon worden of de genen die bij RWZIs gevonden worden dezelfde zijn als die in het ziekenhuisafvalwater voorkomen.

Antibiotica-resistentiegenen werden onderzocht door DNA van de totale microbiële gemeenschap te extraheren, en in de verkregen DNA met kwantitatieve PCR resistentiegenen te meten.

Antibioticaresiduen werden uit ziekenhuiswatermonsters geëxtraheerd en met behulp van LC-MS/MS analyse gekwantificeerd.

Voor een deel van de ziekenhuizen werd geregistreerd hoeveel afvalwater er gedurende de monsternamedagen op het riool geloosd werd (= het geloosde "dagdebiet"). Voor de RWZIs werd geregistreerd hoeveel rioolwater er op een dag de RWZI binnenkomt (het binnenkomende "dagdebiet"). Met behulp van deze debieten en de concentratie CPE in het water kon berekend worden hoeveel CPE er op een dag een ziekenhuis verlaten, en hoeveel CPE er op een dag bij een RWZI binnenkomen.

2.2 Methode in detail

2.2.1 *Ziekenhuizen, RWZIs en monsternames*

Er werden acht Nederlandse ziekenhuizen onderzocht: vier academische en vier regionale ziekenhuizen. Het afvalwater van deze acht ziekenhuizen wordt via het riool afgevoerd naar zeven verschillende RWZIs: twee van de onderzochte ziekenhuizen liggen in hetzelfde rioldistrict, d.w.z. met afvoer naar dezelfde RWZI (Tabel 1). De RWZIs en bijbehorende ziekenhuizen zijn deels geselecteerd gebaseerd op eerder opgedane kennis over de aanwezigheid van CPE bij de RWZIs tijdens een eerder onderzoek (Schmitt et al. 2017). De ziekenhuizen zijn twee tot maximaal vier keer bemonsterd (Tabel 1). De bemonsteringen zijn uitgevoerd tussen augustus 2017 en februari 2018; de periode tussen twee monsters van eenzelfde ziekenhuis was steeds ongeveer een maand.

Voor een compleet beeld van lozingen vanuit huishoudelijk afvalwater zonder invloed van industriële lozingen zouden alle bij een RWZI aangesloten woonwijken op hetzelfde moment gescheiden bemonsterd

moeten worden. Dit is praktisch niet uitvoerbaar. Daarom is gekozen voor bemonstering bij het ontvangende RWZI. Het influent van RWZI's bevat naast huishoudelijk afvalwater (gemiddeld 72%, gemeten aan het drinkwaterverbruik) ook industrieel afvalwater (27%). Op dezelfde dagen dat de ziekenhuizen bemonsterd werden, werd ook het inkomende, ruwe afvalwater (influent) van de bijbehorende RWZIs bemonsterd. In totaal zijn er 29 ziekenhuisafvalwater en 26 RWZI influent monsters genomen (en 26 sets van gepaarde monsters). In een van de onderzoekslocaties (A) zijn daarnaast monsters genomen bij een verpleeghuis en in het riool in een van de aan dit RWZI aangesloten woonwijken.

Monsters werden genomen met behulp van automatische bemonsteringsapparatuur, waarmee gedurende een periode van 24 uur deelmonsters worden genomen per tijdseenheid (tijd-proportionele bemonstering) of per volume langsstromend water (debiet-proportionele bemonstering); de deelmonsters worden opgevangen en gemengd in een vat. In twee van de ziekenhuizen is het afvalwater bemonsterd door middel van steekmonsters (Tabel 1). Het totale aantal monsters was 63. Bij ziekenhuizen werden de watermonsters genomen door hiervoor geaccrediteerde bedrijven of door ziekenhuismedewerkers, bij RWZIs door RWZI medewerkers. De monsters werden gekoeld vervoerd naar het RIVM en binnen 24 uur ingezet.

Tabel 1. Overzicht van het aantal en type monsters per locatie.

Onder-zoeks-locatie	Type afvalwater	Monstertype	Aantal monsters	Opmerking
A	Regionaal ziekenhuis	24H tijd-proportioneel	4	
A	RWZI influent	24h debiet-proportioneel	4	1 van de 4: steekmonster
A	Verpleeghuis	24H tijd-proportioneel	4	1 van de 4: steekmonster
A	Riool woonwijk	24H tijd-proportioneel	4	
B	Regionaal ziekenhuis	Steekmonster	3	1 van de drie: 2 monsters op 1 dag, resultaten samengevoegd
B	RWZI influent	24h debiet-proportioneel	3	
C	Regionaal ziekenhuis	24h debiet-proportioneel	4	
C	RWZI influent	24h debiet-proportioneel	4	
D	Regionaal ziekenhuis	24h debiet-proportioneel	2	
D	Academisch ziekenhuis	24h debiet-proportioneel	4	
D	RWZI influent	24h debiet-proportioneel	4	

Onder-zoeks-locatie	Type afvalwater	Monstertype	Aantal monsters	Opmerking
E	Academisch ziekenhuis	24h debiet-proportioneel	4	
E	RWZI influent	24h debiet-proportioneel	4	
F	Academisch ziekenhuis	Steekmonster	4	
F	RWZI influent	24h debiet-proportioneel	4	
G	Academisch ziekenhuis	24h debiet-proportioneel	4	1 monster 1 dag te laat geleverd
G	RWZI influent	24h debiet-proportioneel	3	1 monsternamen mislukt

2.2.2

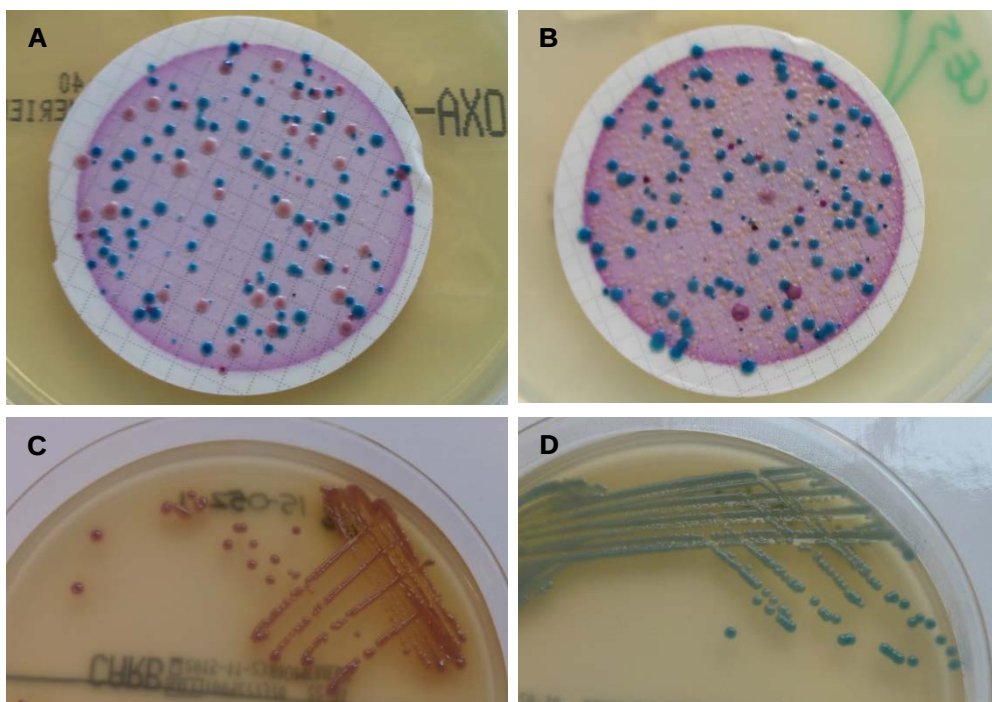
Isolatie van CPE

Voor de isolatie van CPE werden afvalwatermonsters binnen 24 uur na monsternamen gefiltreerd door membraan filters met een poriëgrootte van 0,45µm. De filters werden vervolgens op selectieve kweekmedia geplaatst. Er werden twee typen kweekmedia gebruikt wat nodig is om alle typen CPE te detecteren: "ChromID® CARBA agar" en "ChromID® OXA48 agar". Beide media bevatten carbapenem antibiotica, maar verschillen in de specifieke samenstelling daarvan. Om de aantallen te kunnen bepalen werd van elk monster 4 verschillende volumes gefiltreerd (1, 3, 10 en 30 ml). De filters werden 4 to 5 uur bebroed bij 36±1°C, gevolgd door 21±3 uur bij 44±0.5°C.

Voor het bepalen van de aantallen werden verdachte kolonies geteld op de CPE kweekmedia: roze voor *E. coli* en blauw voor *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Enterobacter* and *Serratia* (KESC)(Figuur 1). Vervolgens werden een aantal van representatieve kolonies rein gekweekt op de platen waarop ze geïsoleerd waren. Isolaten met efficiënte groei op deze platen werden gedefinieerd als 'resistent'¹ en werden verder gekarakteriseerd.

Om de CPE aantallen in de monsters in perspectief te kunnen plaatsen 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 (groene kolonies) en ChromID®ESBL agar (roze kolonies), en bebroed bij dezelfde condities als CRE.

¹ 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).



Figuur 1. Groei van *E. coli* en "KESC" kolonies op filters bebroed op ChromID®OXA48 (A) en ChromID®CARBA agar (B), en reinkultures van een *E. coli* op ChromID®OXA48 agar (C) en een *K. pneumoniae* op ChromID®CARBA agar (D)

2.2.3 Typering van CPE

In totaal werden 1144 isolaten uit 63 monsters verkregen, 653 *E. coli* en 491 "KESC" bacteriën. Van deze isolaten werd de aanwezigheid van vijf typen carbapenemase-gen-families (OXA-48-, NDM- en KPC-, VIM- en IMP-familie), aangetoond door middel van PCR. Van alle isolaten die positief waren voor één van deze genen, d.w.z. de bevestigde CPE (n=923), is vervolgens de sequentie van de carbapenemase genen bepaald door middel van sequenzen. De verkregen sequenties zijn geanalyseerd in het computerprogramma Bionumerics, en hierin ook vergeleken met de sequenties van gepubliceerde carbapenemase genen, om de precieze identiteit vast te stellen.

De identiteit van CP *E. coli* isolaten (n=560) is in de eerste plaats vastgesteld door de koloniekleur op de kweekmedia. De kleur roze wordt alleen verkregen door bacteriën die 2 enzymen (beta-glucuronidase en beta-galactosidase) om kunnen zetten, wat een specifieke eigenschap is van *E. coli*. Voor een deel (n=272) van de *E. coli* isolaten is dit bevestigd met behulp van andere technieken (PCR of API20E), wat een 100% specificiteit aantoonde.

Voor CP "KESC" isolaten (n=363) werd eerst vastgesteld of het *Klebsiella* spp. of *Enterobacter* spp. waren, door te testen op beweeglijkheid en ornithine decarboxylase activiteit (ODC). Van de "KESC" bacteriën is alleen *Klebsiella* spp. onbeweeglijk, en daarnaast is *Klebsiella* meestal ODC-negatief. Omdat bij 44°C bebroed is, gaat het dan met zeer grote waarschijnlijkheid om *K. pneumoniae*. In een eerder onderzoek bleek deze methode 100% specifiek (Schmitt et al. 2017). Beweeglijke en ODC-positieve isolaten zijn waarschijnlijk *Enterobacter*

spp. Dergelijke isolaten werden verder bevestigd op basis van biochemische eigenschappen met behulp van API20E. Dit laatste werd ook gedaan voor isolaten met een onduidelijke uitslag (d.w.z. onbeweeglijk en ODC-positief, of beweeglijk en ODC-negatief).

2.2.4 Berekenen van concentraties en vrachten

2.2.4.1 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:

$$C = \frac{\sum N1...N4}{\sum V1...V4} = \frac{N_{tot}}{V_{tot}}$$

Waarbij N1 t/m N4 het aantal kolonies is op filter 1 t/m 4, N_{tot} het totaal aantal kolonies, V1 t/m V4 het gefiltreerde volume 1 t/m 4, V_{tot} 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}, 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 op groei op de media. Hiermee is de concentratie resistente bacteriën (C_{res}) berekend:

$$C_{res} = \frac{N_{tot} \times \%bevestigd\ resistant}{V_{tot}} = \frac{N_{res}}{V_{tot}}$$

Waarbij N_{res} het aantal bevestigde resistente bacteriën is.

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

$$C_{CPE.coli} = \frac{(N_{roze} \times \%OXA48pos) ChromIDOXA48}{(V_{tot}) ChromIDOXA48} + \frac{(N_{roze} \times \%NDM/KPCpos) ChromIDCARBA}{(V_{tot}) ChromIDCARBA}$$

$$C_{CP.KESC} = \frac{(N_{blauw} \times \%OXA48pos) ChromIDOXA48}{(V_{tot}) ChromIDOXA48} + \frac{(N_{blauw} \times \%NDM/KPCpos) ChromIDCARBA}{(V_{tot}) ChromIDCARBA}$$

Waarbij %OXA48pos betekent het percentage isolaten met een OXA-48-achtig CP-gen, en %NDM/KPCpos betekent het percentage isolaten met een KPC of een NDM CP-gen; isolaten met andere CP-genen werden niet aangetroffen. Concentraties CP *K. pneumoniae* zijn berekend, door het aantal blauwe kolonies ook nog te vermenigvuldigen met het percentage

isolaten dat als *K. pneumoniae* (respectievelijk als andere species) geïdentificeerd is. Omdat met uitzondering van één 'blauw' CP isolaat alle isolaten *K. pneumoniae* waren, was de concentratie CP *K. pneumoniae* echter voor alle monsters met uitzondering van één, gelijk aan CP KESC.

2.2.4.2 Detectielimiet, gemiddelden en ratio's

In CPE-negatieve monsters is de concentratie CPE lager dan de zogenaamde "detectielimiet", of gevoeligheid van de methode. Deze limiet wordt bepaald door het volume water dat getest wordt. In deze studie was dat 44 ml op beide type media, dus in totaal 88 ml. De detectielimiet is 1 bacterie op één van beide typen media, dus 1 bacterie in 88 ml = 11,4 kve/L afvalwater. In negatieve monsters kan de concentratie CPE daarom alles zijn wat minder is dan 11,4 kve/L, dat kan zijn 10 kve/L, maar bijvoorbeeld ook 0,001 kve/L (=1 kve/m³) of echt 0. Voor de berekening van gemiddelde waarden wordt voor deze monsters een fictieve waarde gebruikt, die gelijk is aan de wortel van de detectielimiet. De gemiddelden zijn berekend gebaseerd op de log-getransformeerde concentratie waarden.

Voor de CPE-positieve ziekenhuisafvalwatermonsters en de daarmee gepaarde RWZI monsters, d.w.z. ziekenhuisafvalwater en bijbehorende RWZI op dezelfde dag, zijn zowel de gemiddelde concentraties als de verhoudingen CPE en ESBL-producerende *E. coli* ten opzichte van totale *E. coli* berekend.

2.2.4.3 Vrachten

Voor monsters waar de dagdebieten (=totale hoeveelheid water in m³ per 24 uur) bekend waren voor zowel het ziekenhuisafvalwater als het RWZI influent zijn de vrachten berekend. Vracht wil zeggen: de concentratie × het debiet, oftewel, het totale aantal bacteriën dat langskomt in 24 uur. Dit was het geval voor de onderzoekslocaties waar debietproportioneel bemonsterd was: C, D, E en G (Tabel 1). Door de vrachten CPE die met ziekenhuisafvalwater het riool in gaan te vergelijken met de vrachten CPE die in de RWZI binnenkomen kan bepaald worden in welke mate het ziekenhuisafvalwater verantwoordelijk is voor de aanwezigheid van CPE in het rioolwater bij de RWZI.

2.2.5 Analyse van antibioticaresistentiegenen

Watermonsters werden binnen 24 uur na monsternamen in een volume van 30ml gefiltreerd door membraan filters (mixed esther cellulose filters, HAWG047S6), met een poriegrootte van 0,45µm. DNA werd geëxtraheerd dmv het PowerWater kit (Mobio). Het DNA werd voor qPCR 100x verdund. qPCR vond plaats op de genen ermB (macrolide resistentie) en sul1 (sulfonamide resistentie). De gebruikte primers en reacties zijn samengevat in Tabel 2 en Tabel 3. De reacties werden uitgevoerd met IQSybrgreen mastermix (Biorad) onder toevoeging van BSA tot een concentratie van 0.4 µg/ul, en met gebruik van 2 µl DNA template. Als calibratiecurves werden synthetische DNA standards gebruikt.

Tabel 2. Primer sequenties van de gebruikte qPCR reacties.

Gen	Referentie	Naam	Sequentie
ermB	Knapp et al., 2010	ErmB-F	AAAACTTACCCGCCATACCA
		ErmB-R	TTTGGCGTGTTTCATTGCTT
sul1	Pei et al., 2006	Sul1-F	CGCACCGGAAACATCGCTGCAC
		Sul1-R	TGAAGTTCCGCCGCAAGGCTCG

Tabel 3. qPCR reactie parameter.

Gen	Primer conc in reaction	Reaction volume	Amplification Protocol
ermB	400 nM	10 ul	95°C 5 min 40x(95°C 15s 61°C 30s) + melting curve 65°C-95°C 0.5/5s
sul1	400 nM	10 ul	95°C 5 min 40x(95°C 15s 61°C 30s) + melting curve 65°C-95°C 0.5/5s

2.2.6

Analyse van residuen van antibiotica

In het kader van dit onderzoek is het afvalwater van 1 regionale en 3 academische ziekenhuizen en afvalwater van het verpleeghuis geanalyseerd op de aanwezigheid van tetracyclines, sulfonamiden, macroliden, quinolonen, aminoglycosiden en β -lactams. In verband met de hoge koste van de analyse werden er geen monsters van influent onderzocht. Deze analyses vonden plaats bij het RIKILT. De gedetailleerde methoden zijn opgenomen in Annex 6.1. In het kort werden per monster drie verschillende extracties uitgevoerd, om de verschillende groepen antibiotica efficiënt te kunnen extraheren. Per monster werd een parallelmonster met referentiestoffen gespiked, ter controle van de analyse. In de extracten werden de concentraties antibiotica door middel van LC-MS/MS bepaald.

3 Resultaten

3.1 Prevalentie CPE in ziekenhuisafvalwater en RWZI influent

In ziekenhuisafvalwater werden CPE in 18 van de 29 monsters aangetroffen (Tabel 4). In twee van de ziekenhuizen, beide regionale ziekenhuizen, werden CPE nooit aangetroffen. Daarentegen werd in drie van de ziekenhuizen (1 regionaal en 2 academisch) CPE bij elke monstername aangetroffen.

In alle 26 RWZI influenten werden CPE aangetroffen, bij alle 7 RWZIs (Tabel 5). De meest voorkomende CPE waren *E. coli* met OXA-48-genen, die in alle monsters werden aangetroffen. Daarnaast werden *E. coli* aangetroffen met NDM- of KPC-genen, *K. pneumoniae* met OXA-48, NDM of KPC. Bij één van de RWZIs (locatie C) werd daarnaast op één van de tijdstippen één OXA-48-positieve *Enterobacter* spp. gevonden.

Van de zeven in RWZIs aangetroffen combinaties van bacteriesoort en CPE gen werden, met uitzondering van OXA-48-positieve *Enterobacter*, allen ook in ziekenhuisafvalwater gevonden, maar wel met verschillen in prevalenties. Vooral de prevalentie van OXA-48-producerende *E. coli*, NDM-producerende *E. coli* en NDM-producerende *K. pneumoniae* bleek hoger in RWZI afvalwater dan in ziekenhuisafvalwater (respectievelijk 26/26 vs 17/29, 11/26 vs 6/29, en 7/26 vs 1/29). Voor de overige typen lagen de prevalenties in de twee typen afvalwater dicht bij elkaar.

Tabel 4. Prevalentie van CPE in ziekenhuisafvalwater.

ziekenhuis (type)	Aantal monsters	<i>E. coli</i>			<i>K. pneumoniae</i>			CPE
		OXA-48	NDM	KPC	OXA-48	NDM	KPC	
A (R)	4	1	1					1
B (R)	3							
C (R)	4	4	1	4	3		4	4
D (R)	2							
D (A)	4	3			3			3
E (A)	4	4		4	4		4	4
F (A)	4	4	3		4	1	2	4
G (A)	4	1	1					2
Total	29	17	6	8	14	1	10	18
van monsters		17 / 29	6 / 29	8 / 29	14 / 29	1 / 29	10 / 29	18 / 29
van ziekenhuizen		6 / 8	4 / 8	2 / 8	4 / 8	1 / 8	3 / 8	6 / 8

*R=regionaal, A=academisch

Tabel 5. Prevalentie van CPE in RWZI influent*.

Onderzoeks-locatie	Aantal monsters	<i>E. coli</i>			<i>K. pneumoniae</i>			CPE
		OXA-48	NDM	KPC	OXA-48	NDM	KPC	
A	4	4	1			1		4
B	3	3			1			3
C	4	4	1	4	2		4	4
D	4	4	2	1	4	3	2	4
E	4	4	2	4	4		4	4
F	4	4	4		4	3		4
G	3	3	1					3
Total	26	26	11	9	15	7	10	26
van monsters		26 / 26	11 / 26	9 / 26	15 / 26	7 / 26	10 / 26	26 / 26
van RWZI		7 / 7	6 / 7	3 / 7	5 / 7	3 / 7	3 / 7	7 / 7

*in locatie C werd op één tijdstip ook een OXA-48 positieve *Enterobacter* spp. gevonden.

CPE werden niet aangetroffen in het verpleeghuis of in het riool in een woonwijk in locatie E.

3.2 Typen CPE

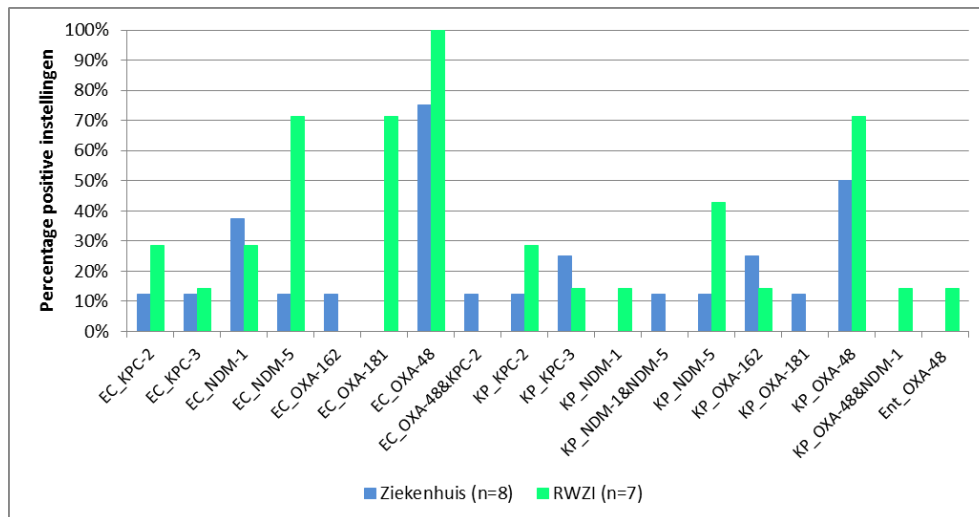
In ziekenhuisafvalwater en RWZI influent werden in totaal 18 verschillende typen CPE gevonden, gebaseerd op bacteriesoort en carbapenemase (CP)-gen (Tabel 6). Er waren in totaal 155 CPE-type/monster combinaties (het aantal gekleurde vakjes in Tabel 6). Van deze 155 combinaties vormden 94 (61%) 'matches' in CPE type tussen wat betreft locatie en tijdstip gepaarde ziekenhuis en RWZI monsters. In 47 (30%) van de gevallen werden CPE typen uit RWZI influent niet op dezelfde dag in de gepaarde ziekenhuizen gevonden, en in 14 (9%) gevallen werden CPE typen uit ziekenhuisafvalwater niet op dezelfde dag in de gepaarde RWZI gevonden. In enkele van de gevallen werden dezelfde CPE typen wel in gepaarde ziekenhuizen en RWZIs aangetroffen maar niet (altijd) op dezelfde dag. In drie van de locaties (A, B, en D) werden relatief weinig matches gevonden tussen RWZI en ziekenhuisafvalwater (0 tot 38%). In de overige locaties werd in minstens twee-derde van de gevallen een match gevonden tussen CPE typen in ziekenhuizen en gepaarde RWZIs (67% tot 80%).

Tabel 6 Typen CPE in ziekenhuisafvalwater en RWZIs.

Species / genus	CARBAgen	Regio / Ziekenhuis of RWZI* / Tijdspunt																																															
		A				B				C				D				E				F				G																							
		Z _R		I		Z _R		I		Z _R		I		Z _R		Z _A		I		Z _A		I		Z _A		I		Z _A		I																			
		1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4												
E. coli	KPC-2												1	2	3	4	1	2	3	4																													
E. coli	KPC-3																																																
E. coli	NDM-1		2										1																																				
E. coli	NDM-5						2																																										
E. coli	OXA-162																																																
E. coli	OXA-181						1,2	2																																									
E. coli	OXA-48		2				1																																										
E. coli	OXA-48&KPC-2																																																
K. pneumoniae	KPC-2																																																
K. pneumoniae	KPC-3																																																
K. pneumoniae	NDM-1																																																
K. pneumoniae	NDM-1&NDM-5						1																																										
K. pneumoniae	NDM-5						1																																										
K. pneumoniae	OXA-162																																																
K. pneumoniae	OXA-181																																																
K. pneumoniae	OXA-48																																																
K. pneumoniae	OXA-48&NDM-1																																																
Enterobacter spp.	OXA-48																																																

*Z_R=regionaal ziekenhuis, Z_A=academisch ziekenhuis, I = RWZI influent

Vijf CPE typen werden op minstens 5 van de 15 locaties (8 ziekenhuizen en 7 RWZIs) aangetroffen: OXA-48 *E. coli*, OXA-48 *K. pneumoniae*, NDM-1 *E. coli*, NDM-5 *E. coli*, en OXA-181 *E. coli*. Hiervan leken met name de laatste twee typen vaker bij RWZIs aangetroffen te worden dan bij ziekenhuizen (Tabel 6). Zeldzamere CPE typen werden soms alleen in een ziekenhuis, soms alleen in een RWZI aangetroffen.



Figuur 2. Prevalentie van CPE typen bij ziekenhuizen en RWZIs.
EC=*E. coli*, KP=*K. pneumoniae*, Ent=*Enterobacter* spp.

3.3 CPE concentraties

In ziekenhuisafvalwater was de CPE concentratie gemiddeld $8,5 \times 10^2$ kolonievormende eenheden per liter (kve/l), met een spreiding van <10 (onder de detectiegrens) tot $8,1 \times 10^5$ kve/l. In RWZI influent was de CPE concentratie gemiddeld $3,2 \times 10^3$ kve/l, met een spreiding van $4,7 \times 10^1$ tot $1,1 \times 10^5$ kve/l. Ter vergelijking, de concentraties ESBL-producerende *E. coli* en totale *E. coli* waren in ziekenhuisafvalwater respectievelijk $1,3 \times 10^6$ kve/l en $4,3 \times 10^7$, en in RWZI influent respectievelijk $8,1 \times 10^5$ kve/l en $7,3 \times 10^7$.

De lagere gemiddelde CPE concentratie in ziekenhuisafvalwater wordt deels veroorzaakt door een relatief groot aantal (38%) monsters met concentraties onder de detectiegrens. In de ziekenhuizen waar CPE konden worden gedetecteerd was de concentratie juist licht maar significant hoger dan dat in de bijbehorende RWZI influenten (mediaan $1,9 \times 10^4$ vs. $7,7 \times 10^3$ kve/l, Tabel 7), en was ook de verhouding CPE ten opzichte van totale *E. coli* hoger dan in influent van de bijbehorende RWZIs (mediaan 1 op 1715 vs. 1 op 7540; figuur 2, p waarde van het verschil gebaseerd op log ratios 0,003). Dit was ook het geval voor ESBL-producerende *E. coli* (mediaan 1 op de 35 vs. 1 op de 81, p waarde gebaseerd op log ratios 0,002).

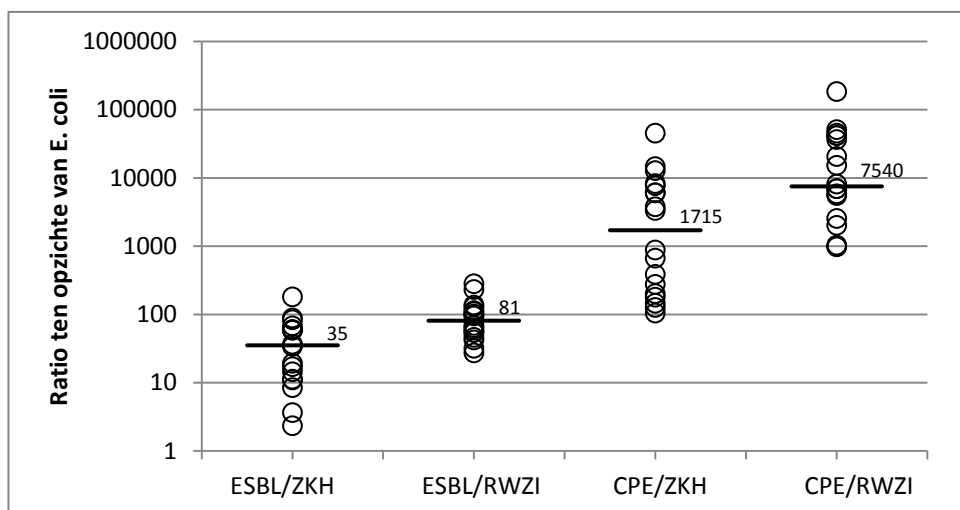
Tabel 7. Concentraties van *E.coli*, ESBL-*E. coli* en CPE in ziekenhuisafvalwater en RWZI influent. De gemiddelden en standaarddeviaties zijn op basis van de log getransformeerde concentraties berekend.

Locatie	Bacterium	Gemiddelde (kve/L)	Gemiddelde (log kve/L)	Standard-deviatie (log kve/L)	p waarde
<i>E. coli</i>	ziekenhuis	4,3E+07	7,6	0,5	0,046
	RWZI	7,3E+07	7,9	0,3	
ESBL <i>E. coli</i>	ziekenhuis	1,3E+06	6,1	0,7	0,162
	RWZI	8,1E+05	5,9	0,4	
CPE	ziekenhuis	3,0E+04	4,5	1,0	0,001
	RWZI	3,0E+03	3,5	0,9	

3.4

Relatieve CPE vrachten in ziekenhuisafvalwater en RWZI influent

Voor vier van de locaties, namelijk C, D, E, en G, zijn debiet-proportionale monsters verkregen bij zowel de ziekenhuizen als de RWZIs (Tabel 1). Het volume water (= debiet) dat tijdens de periode van 24 uur van monsternamen de ziekenhuizen was uitgestroomd en het volume dat de RWZIs was binnengestroomd werden geregistreerd. Met behulp van deze dag-debieten en de gemeten bacterieconcentraties kunnen de totale aantallen bacteriën ("vrachten") in het afvalwater dat op een dag in- of uitstroomt berekend worden. Door de vrachten CPE die met ziekenhuisafvalwater het riool in gaan te vergelijken met de vrachten CPE die in de RWZI binnenkomen, kan worden bepaald in welke mate het ziekenhuisafvalwater verantwoordelijk is voor de aanwezigheid van CPE in het rioolwater bij de RWZI.



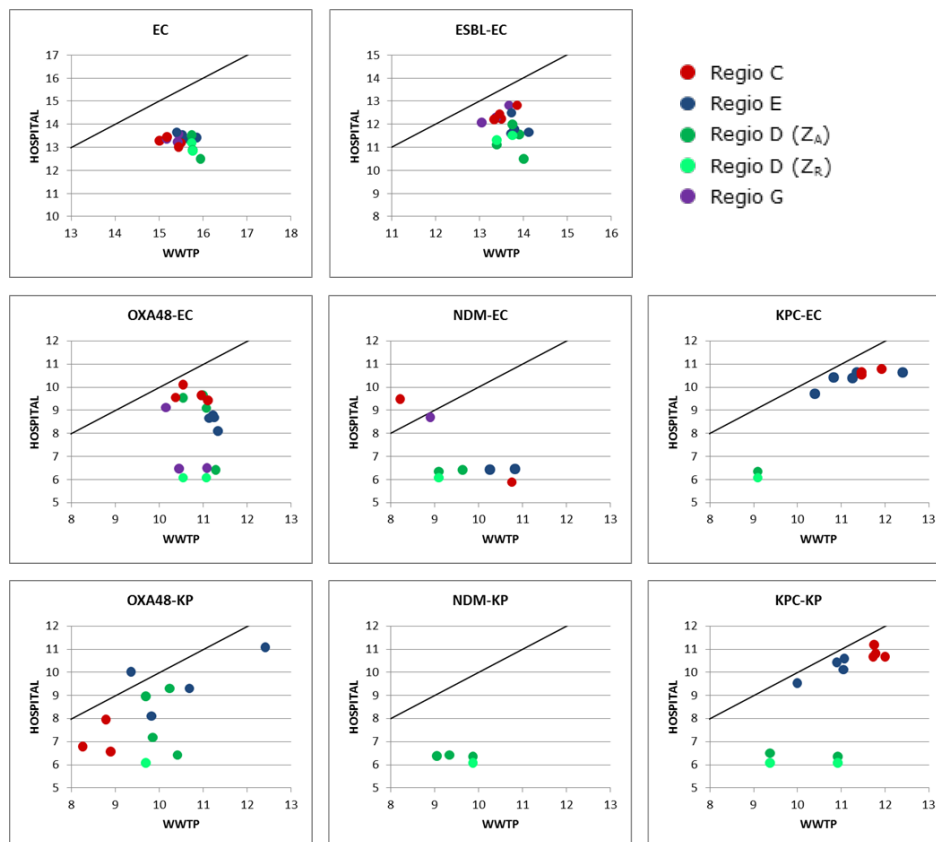
Figuur 3. Verhouding van ESBL-producerende *E. coli* en CPE ten opzichte van *E. coli* in CPE-positieve ziekenhuisafvalwater (ZKH) en in de bijbehorende RWZIs. De horizontale lijnen geven de medianen weer. Het verschil is voor ESBL productie *E. coli* en voor CPE significant.

Voor wat betreft *E. coli* was de totale vracht in ziekenhuisafvalwater gemiddeld 100-1000 keer (2 tot 3-log units, gemiddelde en standaarddeviatie op log schaal: 2,3 en 0,5) lager dan in RWZI influent (Figuur 4). Omgerekend betekent dit dat gemiddeld 0,5% (spreiding 0,04% tot 2%) van de *E. coli* in het gemeentelijk afvalwater afkomstig was van de ziekenhuizen. Voor ESBL-*E. coli* hadden de ziekenhuizen een iets groter aandeel: gemiddeld 1,8%, maar de spreiding was groter vergeleken met *E. coli* (0,03% tot 14%, gemiddelde en standaarddeviatie van de ratio op log schaal: 1,7 en 0,7). Het aandeel van ziekenhuizen aan de ESBL-producerende *E. coli* vracht leek afhankelijk van de locatie: met name in locaties C en G was deze relatief hoog (gemiddeld 8% en 11%)(Figuur 4).

Voor CPE werd er in vergelijking met *E. coli* en ESBL-producerende *E. coli* meer variatie tussen de herhaalde metingen gevonden (Figuur 4, Tabel 8, Tabel 9). Zo varieerde het aandeel van ziekenhuizen aan OXA-48-producerende *E. coli* van <0.1% tot 37%. Het aandeel van ziekenhuizen bleek ook te variëren met het type CPE en ook tussen locaties. Het aandeel van ziekenhuizen aan NDM-producerende *E. coli* was lager dan voor KPC-producerende *E. coli*. Met name in locatie E en locatie C waren de ziekenhuizen belangrijke bronnen van KPC-producerende *E. coli* (respectievelijk 14-40% en 2-16%) en KPC-producerende *K. pneumoniae* (respectievelijk 12-35% en 5-28%).

In locatie G werd NDM-*E. coli* op één tijdstip aangetroffen in zowel ziekenhuis als RWZI; op dat tijdstip was het aandeel van het ziekenhuis voor dit type CPE 63%. In locatie D leken beide ziekenhuizen niet tot nauwelijks bij te dragen aan de aanwezigheid van alle typen CPE.

Indien alle genotypen onafhankelijk worden onderzocht, kon 60 keer het aandeel van ziekenhuisafvalwater aan de vracht in RWZI influent bepaald worden (alle cellen van Tabel 9 waarin een getal aangegeven is). In 18 gevallen (30%) was het aandeel van ziekenhuisafvalwater groter dan 10%, en in 1 geval (2%) groter dan 50%. Indien de som van alle CPE wordt beschouwd (Tabel 8), was de bijdrage van ziekenhuizen aan de CPE vrachten in influent in 4 van 17 gevallen (24%) groter dan 10%.



Figuur 4. Verhouding tussen bacterie-vrachten in ziekenhuisafvalwater en RWZI influent. De getallen op de assen geven de vrachten weer in log-eenheden (bijv. 10 wil zeggen 10^{10} , oftewel, 10 miljard bacteriën per dag). De lijn geeft de verhouding weer waarbij de ziekenhuisvracht gelijk is aan de vracht in RWZI influent; hoe dichter de metingen bij deze lijn liggen, hoe groter het aandeel van ziekenhuisafvalwater. De kleuren van de symbolen geven de verschillende locaties weer.

Tabel 8. Percentage van de bacterie-vrachten in ziekenhuisafvalwater vergeleken met RWZI influent. Een bijdrage hoger dan 10% is vet aangegeven.

Onderzoekslocatie	<i>E. coli</i>	ESBL <i>E. coli</i>	CPE <i>E. coli</i> totaal	Non OXA-48 CPE <i>E. coli</i> totaal
C	1.9	5.3	10.8	11.4
C	0.5	9.1	3.4	3.0
C	0.4	9.6	7.1	7.0
C	1.9	7.6	14.7	15.9
Da	0.4	0.4	5.5	10.6
Da	0.0	0.0	<0.1	<0.1
Da	0.6	1.8	3.3	1.0
Da	0.1	0.5	1.0	0.4
Db	0.3	0.6	<0.1	<0.1
Db	0.1	0.8	<0.1	<0.1
E	0.4	0.3	4.7	4.9
E	1.0	0.8	7.0	11.2
E	0.7	1.0	16.9	26.3
E	1.8	5.8	18.8	34.8
G	1.4	14.0	<0.1	<0.1
G	0.6	8.3	8.5	1.1
G	1.5	10.4	1.8	34.9
Aantal metingen	17	17	17	17
Aantal metingen met CPE in RWZI	17	17	17	17
Aantal metingen <5%	17	9	9	9
Aantal metingen <10%	17	15	13	10
Aantal metingen >10%	0	2	4	7
Aantal metingen >50%	0	0	0	0

Tabel 9. Percentage van de bacterie-vrachten van CPE in ziekenhuisafvalwater vergeleken met RWZI influent, per bacterium en CPE klasse. Een * geeft aan dat geen CPE van deze type in ziekenhuisafvalwater en RWZI influent werden aangetroffen, een ** geeft aan dat geen CPE van dit type in RWZI influent werd aangetroffen.

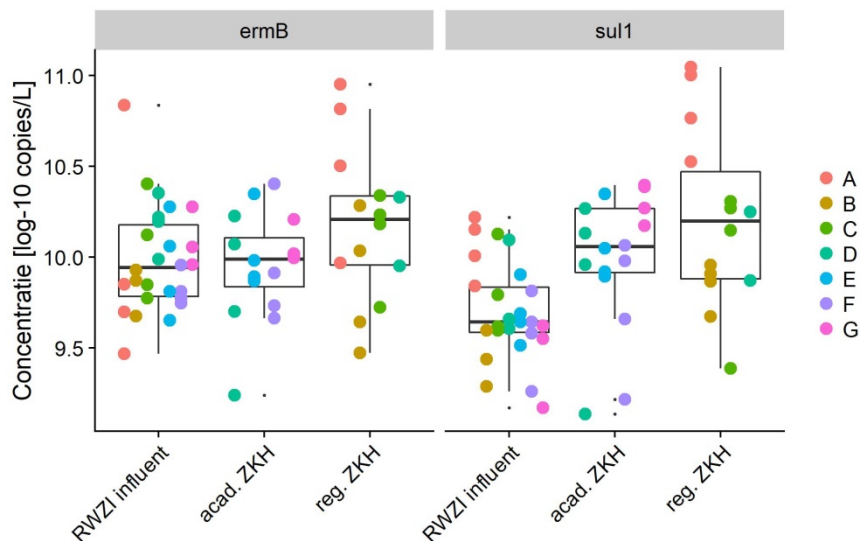
Onderzoekslocatie	CPE <i>E. coli</i>			CPE <i>Klebsiella</i>		
	OXA-48	NDM	KPC	OXA-48	NDM	KPC
C	4.9	**	11.6	*	*	10.8
C	37.4	*	1.8	14.8	*	9.0
C	15.2	<0.1	15.9	0.5	*	4.8
C	2.1	*	7.5	**	*	28.2
Da	4.5	*	*	11.7	<0.2	*
Da	<0.1	<0.1	*	<0.1	<0.1	*
Da	10.0	<0.2	<0.2	18.4	<0.1	<0.1
Da	1.1	*	*	0.2	*	<0.1
Db	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
Db	<0.1	*	*	*	*	<0.1
E	0.3	<0.1	21.2	4.8	*	34.8
E	0.1	<0.1	13.8	4.2	*	11.8
E	0.3	*	19.1	**	*	34.7
E	0.4	*	40.0	2.0	*	33.8
G	<0.1	*	*	*	*	*
G	9.2	*	*	*	*	*
G	<0.2	62.7	*	*	*	*
Aantal metingen	17	17	17	17	17	17
Aantal metingen met CPE in RWZI	17	7	10	10	4	12
Aantal metingen <5%	13	6	3	7	4	5
Aantal metingen <10%	15	6	4	7	4	6
Aantal metingen >10%	2	1	6	3	0	6
Aantal metingen >50%	0	1	0	0	0	0

3.5 Antibioticaresistentiegenen in (ziekenhuis)afvalwater

Naast resistente bacteriën werden ook resistentiegenen in het ziekenhuisafvalwater onderzocht en met kommunaal afvalwater vergeleken. De resistentiegenen *ermB* (welke codeert voor macrolide resistentie) en *sul1* (sulfonamide resistentie) werden in alle onderzochte monsters aangetroffen. De concentraties varieerden licht tussen de verschillende locaties, de grootste verschillen tussen locaties werden waargenomen tussen monsters van verschillende regionale ziekenhuizen (Figuur 5). Samengenomen lagen de concentraties van *sul1* in ziekenhuisafvalwater ongeveer 2,5 keer hoger dan in RWZI influent (dit is significant hoger). Dit was niet het geval voor de concentraties van *ermB* (Tabel 10).

Tabel 10. Concentraties van resistentiegenen in ziekenhuisafvalwater en kommunaal afvalwater (RWZI influent). Concentraties zijn getoond in log genkopiën per L water.

Monster	Gen	Observaties	Gemiddelde	Mediaan	Min-max
RWZI influent	<i>erm</i>				
	B	26	4,76	4,72	4,25 - 5,61
	<i>sul1</i>	26	4,47	4,42	3,95 - 5
ziekenhuis-afvalwater	<i>erm</i>				
	B	30	4,84	4,79	4,02 - 5,73
	<i>sul1</i>	30	4,87	4,88	3,91 - 5,82



Figuur 5. Concentraties van de resistentiegenen *ermB* en *sul1* in ziekenhuisafvalwater en de bijbehorende RWZI influenten.

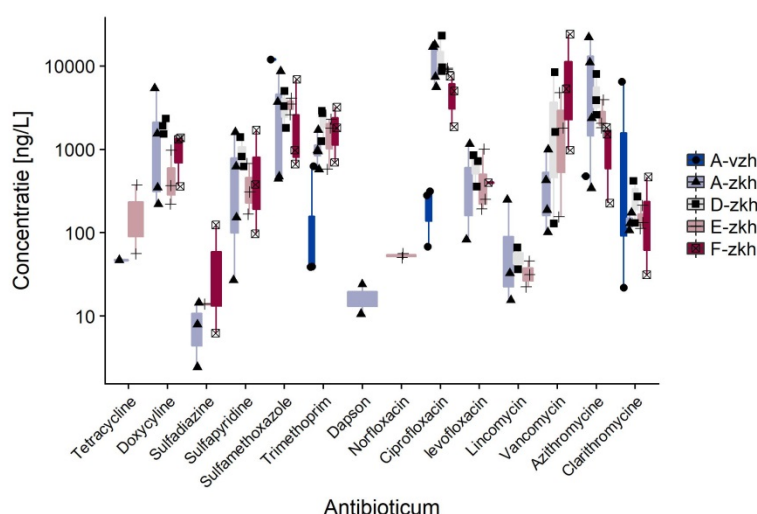
Met behulp van de dagdebieten die voor vier van de locaties beschikbaar waren, konden ook voor resistentiegenen de aantallen resistentiegenen per dag ("vrachten") berekend worden. Van de totale vrachten aan resistentiegenen in RWZI influent waren enkele percent afkomstig van ziekenhuisafvalwater (Tabel 11).

Tabel 11. Percentage van resistentiegenen in RWZI influent die uit ziekenhuisafvalwater afkomstig zijn.

Gen	Observaties	Gemiddelde	Mediaan	Min-max
<i>ermB</i>	17	1,2	0,7	0,1 – 3,7
<i>sul1</i>	17	3,9	2,8	0,1 – 2,8

3.6 Residuen van antibiotica in ziekenhuisafvalwater

In ziekenhuisafvalwater van 4 ziekenhuizen en in afvalwater van een verzorgingstehuis werden ook residuen van antibiotica onderzocht. Van alle 90 onderzochte antibiotica werden er 14 in tenminste 1 monster aangetroffen (de detectielimieten lagen voor de meeste stoffen tussen 1-25 ng/L, voor aminoglycosiden en beta-lactam antibiotica tussen 100 ng/L en enkele µg/L). De gevonden antibiotica behoorden tot de klasse van tetracyclines, sulfonamides, fluorochinolones, en macroliden. De meeste van de aangetroffen antibiotica werden in een eerder onderzoek ook in RWZI influent en effluent aangetroffen, met de uitzondering van vancomycine (Schmitt et al. 2017, clarithromycin en azithromycin werden toen niet onderzocht). De meeste antibiotica werden wel in ziekenhuisafvalwater maar niet in afvalwater van het verzorgingstehuis gedetecteerd, of toonden in afvalwater van het verzorgingstehuis lagere concentraties (behalve dan voor clarithromycine) (Figuur 6 en Tabel 12).



Figuur 6. Residuen van antibiotica in ziekenhuisafvalwater en in afvalwater van een verzorgingstehuis

In vergelijking met gemengd afvalwater (Schmitt et al. 2017) lagen de concentraties van enkele stoffen in ziekenhuisafvalwater ongeveer 3-10x hoger (ciprofloxacin, doxycycline, sulfamethoxazole, trimethoprim) (Tabel 12).

Tabel 12. Concentraties van antibioticaresiduen in ziekenhuisafvalwateren afvalwater van een verzorgingstehuis. Concentraties zijn getoond in ng per L water.

Antibioticum	monster	n	% positief	Gemiddelde	Mediaan	Min-max
Azithromycine	ziekenhuis	13	100	4733	2361	226 - 22000
	Verpleeghuis	3	33	476	476	476 - 476
Ciprofloxacin	ziekenhuis	13	100	10059	8700	1864 - 23000
	Verpleeghuis	3	100	221	280	68 - 316
Clarithromycine	ziekenhuis	13	85	199	132	31 - 464
	Verpleeghuis	3	67	3261	3261	22 - 6500
Dapson	ziekenhuis	13	15	17	17	11 - 24
Doxycycline	ziekenhuis	13	100	1378	1317	221 - 5400
levofloxacin	ziekenhuis	13	69	559	397	83 - 1163
Lincomycin	ziekenhuis	13	62	62	35	16 - 248
Norfloxacin	ziekenhuis	13	15	53	53	50 - 56
Sulfadiazine	ziekenhuis	13	46	28	11	2 - 124
Sulfamethoxazole	ziekenhuis	13	100	3235	3300	443 - 8600
Sulfamethoxazole	Verpleeghuis	3	33	12000	12000	12000 - 12000
Sulfapyridine	ziekenhuis	13	100	660	622	27 - 1700
Tetracycline	ziekenhuis	13	23	159	56	47 - 375
Trimethoprim	ziekenhuis	13	100	1648	1700	573 - 3200
Trimethoprim	verpleeghuis	3	100	236	39	39 - 629
Vancomycin	ziekenhuis	13	100	3759	996	101 - 24000

In deze studie werden alleen ziekenhuisafvalwatermonsters onderzocht, maar niet de gepaarde RWZI influenten. Het is daarom niet mogelijk het aandeel van ziekenhuisafvalwater aan de antibioticaresiduen in RWZI influent per locatie en meting te berekenen. Aan hand van concentratiemetingen in RWZI influent uit Schmitt et al. (2017), in verband met gegevens over het gemiddelde aandeel van

ziekenhuisafvalwater aan RWZI influent, kunnen echter schattingen voor enkele stoffen worden gemaakt. In Derksen et al. (2007) is aangegeven dat de hoeveelheid afvalwater uit ziekenhuizen 0,4% van de totale afvalwaterproductie in Nederland bedraagt. Voor de hier onderzochte ziekenhuizen was de hoeveelheid afvalwater uit ziekenhuizen gemiddeld 0.9%. Als worst-case waarde zijn de vrachten ook voor een grotere aandeel van ziekenhuisafvalwater aan RWZI influent (2%) berekend. Zoals in Tabel 13 getoond, bedraagt het aandeel van ziekenhuisafvalwater aan antibioticaresiduen in RWZI influent enkele procenten. Dit kan voor sommige stoffen (trimethoprim, ciprofloxacin, levofloxacin) echter oplopen tot 27%.

Tabel 13. Percentage van antibioticaresiduen in RWZI influent die uit ziekenhuisafvalwater afkomstig zijn, geschat voor RWZI met een ziekenhuisafvalwaterpercentage van 0.4%, 0.9% en 2%. Getoond zijn alle antibiotica die in Schmitt et al. (2017) en in het huidige onderzoek zijn aangetroffen. Het gemiddelde geeft de gemiddelde concentratie in afvalwater aan, %pos geeft de percentage van de monsters aan in welk het antibioticum werd aangetroffen.

Antibio- ticum	Ziekenhuis- afvalwater		RWZI influent		Vracht afkomstig van ziekenhuisafval-water aangenomen % ziekenhuisafval-water in RWZI influent		
	Gemiddelde	% pos	Gemiddelde	% pos	0.4	0.9	2
Tetracycline	159	23	146	11	0.4	1.0	2.2
Doxycyline	1378	100	551	47	1.0	2.3	5.1
Sulfadiazine	28	46	59	29	0.2	0.4	1.0
Sulfapyri- dine	660	100	589	98	0.4	1.0	2.3
Sulfameth- oxazole	3235	100	430	100	3.0	6.8	15.3
Trimetho- prim	1648	100	125	98	5.3	12.0	27.0
Dapson	17	15	39	2	0.2	0.4	0.9
Norfloxacin	53	15	203	60	0.1	0.2	0.5
Ciprofloxacin	10059	100	1166	100	3.5	7.8	17.6
levofloxacin	559	69	86	20	2.6	5.9	13.3
Lincomycin	62	62	588	20	0.0	0.1	0.2
Vancomycin	3759	100	nd	nd	0.0	0.0	0.0

4 Discussie en conclusies

Aanleiding

In een eerder onderzoek naar het voorkomen van resistente bacteriën in afvalwater werden CPE in inkomend en gezuiverd afvalwater van afvalwaterzuiveringsinstallaties aangetroffen. Er kon echter niet met zekerheid worden vastgesteld of de CPE voor een groot deel van ziekenhuizen afkomstig waren of niet. Daarom werd hier specifiek de bijdrage van ziekenhuisafvalwater aan het voorkomen van CPE in gemeentelijk afvalwater onderzocht. Dit is relevant omdat zuivering van afvalwater van ziekenhuizen een effectieve methode kunnen zijn om de emissies van BRMO naar het oppervlaktewater te reduceren.

Totale bijdrage van ziekenhuizen aan resistentie in afvalwater

Om de totale bijdrage van ziekenhuizen aan het voorkomen van resistente bacteriën in gemeentelijk afvalwater te berekenen, werd het totale aantal CPE dat per dag met het ziekenhuisafvalwater naar de RWZI stroomt ("vrachten") vergeleken met de binnenkomende vrachten in het RWZI. Naast ziekenhuisafvalwater draagt gemeentelijk afvalwater bij aan de concentratie CPE bij de RWZI. De vrachten konden voor 4 ziekenhuizen worden berekend, omdat voor deze ziekenhuizen het totale volume afvalwater op de dag van de meting bekend was. Voor de andere ziekenhuizen was het volume afvalwater niet precies bekend (deze ziekenhuizen voerden namelijk geen debietsproportionele monsternamen uit, zoals tijdens het onderzoek duidelijk werd).

De totale bijdrage van ziekenhuizen aan de vrachten van niet-resistente *E. coli* was laag (gemiddeld 0,5%) en toonde weinig variatie (0,04% tot 2%). Dit is in lijn met de verwachting dat er in ziekenhuispatienten niet meer *E. coli* aangetroffen worden dan bij de bevolking, en met het beperkte aandeel van ziekenhuizen aan het totale gemeentelijke afvalwater (in de hier onderzochte RWZI's gemiddeld 0,9%). De bijdrage van ziekenhuizen in vrachten CPE varieerden duidelijk sterker dan de bijdrage aan *E. coli* vrachten en ESBL-*E. coli* vrachten en hingen af van CPE type, het ziekenhuis en het tijdstip van de meting. De vermoedelijke oorzaak is dat kleine verschillen in het aantal dragers die op afvalwater lozen bij een lage totale aantal dragers tot grotere verschillen tussen de metingen leiden. De bijdrage van ziekenhuizen aan de totale vracht van CPE lag in 4 van de 17 metingen duidelijk hoger dan voor *E. coli*, namelijk tussen 10 tot 20%. In het merendeel van de gevallen (13/17) was de bijdrage van ziekenhuizen <10%. Ook indien de CPE genotypen gescheiden worden onderzocht, was de bijdrage van de ziekenhuizen in de meeste metingen <10%. Voor enkele CPE genotypen kon de bijdrage van ziekenhuizen echter in een enkele meting oplopen tot 63%. In conclusie zijn ziekenhuizen wel een puntbron van CPE en dragen meer CPE bij dan uit de afvalwatervolumina aan te nemen. Aan de andere kant is het merendeel van alle CPE afkomstig van bronnen buiten het ziekenhuis.

De uit ziekenhuizen afkomstige vrachten aan resistentiegenen en de geschatte vrachten van antibiotica toonden een vergelijkbaar beeld; de bijdrage van ziekenhuisafvalwater was voor veel stoffen en voor de

resistentiegenen beperkt tot enkele procenten, maar kon voor enkele stoffen (trimethoprim, ciprofloxacin) oplopen tot naar schatting >20%. Dit komt overeen met gegevens van Roorda et al. (2009), die voor trimethoprim en ciprofloxacin aan hand van metingen in afvalwater een bijdrage van >20% van ziekenhuizen bepaald hebben. Ook aanhand van gebruiksdata van antibiotica in ziekenhuizen en de algemene bevolking was ciprofloxacin in deze studie voor meer dan 20% van de onderzochte ziekenhuizen afkomstig.

Behandeling van ziekenhuisafvalwater ter reductie van de totale AMR emissies

Indien een groot aandeel van de resistente bacteriën afkomstig zijn uit afvalwater van zorginstellingen, zou een lokale behandeling van dit afvalwater een mogelijkheid zijn om de emissies van deze bacteriën, maar ook van geneesmiddelen en resistentiegenen te reduceren. Deze studie toont dat de onderzochte ziekenhuizen in het merendeel van de metingen minder dan 10% bijdragen aan de totale vracht van CPE, en dat alleen in enkele gevallen en voor enkele genen hogere bijdragen van ziekenhuisafvalwater worden gevonden. Zuivering van ziekenhuisafvalwater leidt daarom niet tot een substantiële reductie van de totale vracht van CPE. Dit komt overeen met onderzoek naar emissies van antibiotica uit ziekenhuizen, waarin de bijdrage van zuivering van ziekenhuisafvalwater aan de reductie van de gehele vracht laag werd ingeschat (Roorda et al. 2009).

In dit project werd geen onderzoek verricht naar de kosten van aanvullende zuivering van ziekenhuisafvalwater voor de reductie van resistente bacteriën. Roorda et al. (2009) constateerden dat maatregelen ter zuivering van geneesmiddelen in ziekenhuisafvalwater, indien gemeten per kg verwijderd geneesmiddel en niet per vracht, kosteneffectief kunnen zijn. Dit geldt vermoedelijk ook voor CPE en wordt met name door de afvalwaterbehandelingskosten veroorzaakt, die bij behandeling van het relatief lage volume ziekenhuisafvalwater lager zijn dan bij behandeling van het gehele gemeentelijke afvalwater. Zoals boven besproken kan afvalwaterzuivering de totale vracht van CPE echter niet substantieel verlagen.

Prevalentie en concentraties van CPE ziekenhuisafvalwater

In dit onderzoek werden CPE vaker aangetroffen in RWZI influent (26/26 metingen) dan in ziekenhuisafvalwater (18/29 metingen, 6/8 ziekenhuizen). De gemiddelde concentraties CPE varieerden sterk per ziekenhuis en lagen in de monsters waarin CPE werden aangetroffen iets hoger dan in RWZI influent. In CPE-positieve monsters van ziekenhuisafvalwater droeg gemiddeld ongeveer 1 op de 2000 *E. coli* bacteriën een carbapenemase gen. Dit was significant hoger dan in gemeentelijk afvalwater, waar gemiddeld ongeveer 1 CPE per 10 000 *E. coli* aangetroffen werd. In ziekenhuisafvalmonsters waren er in vergelijking met gemeentelijk afvalwater ook 2,3 keer zoveel ESBL-producerende *E. coli* per *E. coli*. Indien aangenomen wordt dat elke persoon ongeveer evenveel niet-resistente *E. coli* uitscheidt, zouden in ziekenhuizen gemiddeld meer CPE-dragers en ESBL-dragers voorkomen, of zouden de dragers in ziekenhuizen gemiddeld hogere aantallen resistente bacteriën uitscheiden dan dragers buiten ziekenhuizen.

Samengenomen laat dit zien dat ziekenhuizen CPE emitteren, en relatief tot de totale aantal fecale bacteriën ook een hogere CPE concentratie tonen dan RWZI influent. Relatief tot het volume water zijn de concentraties CPE maar licht verhoogd ten opzichte van RWZI influent.

Concentraties van resistentiegenen en antibioticaresiduen in ziekenhuisafvalwater

Naast CPE werden ook residuen van antibiotica en resistentiegenen in ziekenhuisafvalwater aangetroffen. De concentraties van antibiotica en resistentiegenen waren voor enkele antibiotica (sulfamethoxazole, trimethoprim, ciprofloxacin) en het sulfonamide resistentiegen sul1 in ziekenhuisafvalwater hoger dan in RWZI influent. Dit geldt echter niet voor alle antibiotica en genen.

Bronnen van CPE buiten ziekenhuisafvalwater

Een aantal waarnemingen maken het aannemelijk dat ziekenhuizen niet de enige bron van CPE in gemeentelijk afvalwater zijn. Ten eerste worden CPE in gemeentelijk afvalwater vaker gevonden dan in ziekenhuisafvalwater. Ten tweede zijn naar vergelijking van de vrachten minder dan 50% van de totale CPE afkomstig uit ziekenhuisafvalwater. Ten derde worden in gemeentelijk afvalwater ook CPE genotypen gevonden die niet in ziekenhuisafvalwater gevonden werden (zie beneden).

Mogelijke andere bronnen van CPE in het gemeentelijke rioolwater zijn huishoudens of andere typen van zorginstellingen, zoals verpleeghuizen. CPE dragers in huishoudens kunnen personen zijn die in een ziekenhuis opgenomen zijn geweest en nu thuis zijn, of personen die gereisd hebben naar landen waar CPE vaker voorkomen dan in Nederland (van Hattem et al. 2016), of kunnen gezinsleden zijn van mensen die CPE opgelopen hebben in het ziekenhuis of buitenland (Haverkate et al. 2017). Maar ook de aanwezigheid van andere dan de onderzochte ziekenhuizen zouden een bijdrage hebben kunnen leveren aan de CPE die bij RWZIs werden aangetroffen. In drie van de onderzochte gebieden (E, D en F) was er sprake van meerdere ziekenhuizen binnen hetzelfde riooldistrict (in locatie D zijn beide ziekenhuizen onderzocht).

CPE varianten

De CPE isolaten uit deze studie zijn gekarakteriseerd voor wat betreft de bacteriesoort en type carbapenemase-gen. Een deel van de gepaarde monsters toont overeenstemming tussen ziekenhuisafvalwater en RWZI influent: dan wordt een bepaalde CPE variant zowel in het ziekenhuisafvalwater alsook in het RWZI influent gevonden. In een aanzienlijk deel van de gepaarde ziekenhuis- en RWZI monsters werden bepaalde CPE varianten echter wel in RWZI influent maar niet in de ziekenhuismonsters gevonden. Andersom worden varianten die in ziekenhuisafvalwater worden aangetroffen niet altijd in RWZI influent gevonden. Dit ondersteunt de conclusie gebaseerd op prevalentie en vrachten dat ziekenhuizen bronnen van CPE zijn, en dat er naast ziekenhuizen additionele CPE bronnen bestaan.

De discrepanties in CPE varianten tussen ziekenhuisafvalwater en gemeentelijk afvalwater kunnen – naast echte verschillen tussen deze twee - ook nog een andere verklaring hebben. Vooral bij lage bacterieconcentraties (rond de detectielimiet van de methode) speelt het

toeval een grote rol voor de gevonden varianten. Daarnaast is er sprake van een verblijftijd in het riool: het ziekenhuisafvalwater dat in het riool terecht komt heeft tijd nodig om bij de RWZI terecht te komen. Hoe lang dat duurt is afhankelijk van de afstand, het type riool, en de weersomstandigheden, en is niet eenvoudig vast te stellen. Omdat de monsters bij de RWZIs en ziekenhuizen op dezelfde dag genomen zijn wil dat zeggen dat een deel van de RWZI monsters water bevatten dat een dag eerder uit het ziekenhuis gekomen is. Het is daarom in theorie mogelijk dat CPE variant in het rioolwater afkomstig is van een ziekenhuispatient, maar dat deze op de dag van ziekenhuisafvalwater-monstername niet naar de wc is geweest, of zelfs uit het ziekenhuis ontslagen. Bij de ziekenhuizen waar in plaats van een 24uur mengmonster een steekmonster is genomen (B en F) zouden de discrepanties tussen ziekenhuis en RWZI afvalwater nog groter kunnen zijn: “de” CPE drager moet dan toevallig vlak voor de monstername naar het toilet gegaan zijn. De resultaten wijzen er echter niet op dat er meer discrepanties in CPE varianten werden gevonden waar de ziekenhuizen bemonsterd zijn met steekmonsters. Zowel toeval als het effect van verblijftijd kunnen ook verklaren dat in sommige gevallen CPE typen wel in het ziekenhuisafvalwater maar niet in de ontvangende RWZI werden aangetroffen.

De CPE varianten uit deze studie zijn gekarakteriseerd voor wat betreft de bacteriesoort en type carbapenemase-gen. Een verdere karakterisatie zal nog moeten uitwijzen of twee stammen die identiek lijken ook daadwerkelijk dezelfde zijn. Voorlopige analyses wijzen uit dat dit niet altijd het geval is, maar dat er – zowel tussen als binnen monsters – meerdere varianten zijn van bacteriën van dezelfde soort met eenzelfde CPE-gen. Aanvullende analyses binnen het kader van een door Interreg gefinancierd onderzoek (EurHealth-1 health) zullen deze vraag nader onderzoeken.

Conclusie

Het huidige onderzoek toont aan dat ziekenhuisafvalwater CPE, antibioticaresistentiegenen en residuen van antibiotica kan bevatten. In ziekenhuisafvalwater werden in vergelijking met RWZI influent (licht) verhoogde concentraties van CPE en van enkele antibiotica en resistentiegenen aangetroffen. De bijdrage van ziekenhuisafvalwater aan de vrachten van CPE was variabel en over het algemeen beperkt (<10%), maar kon voor enkele meetmomenten, CPE typen en ziekenhuizen oplopen tot ongeveer 60%. Een vergelijkbaar beeld werd gevonden voor antibioticaresiduen. Een deel van de gevonden CPE typen stemmen in gepaarde monsters van ziekenhuisafvalwater en RWZI influent overeen wat daarop wijst dat de CPE in RWZI influent van het ziekenhuis afkomstig zouden kunnen zijn, andere typen CPE komen op een meettijdstip alleen in RWZI influent of ziekenhuisafvalwater voor. In conclusie toont het huidige onderzoek daarmee aan dat CPE dragerschap niet alleen voorkomt in ziekenhuizen maar ook daarbuiten, en dat de relatieve bijdrage per meettijdstip en CPE type varieert. Door aanvullende zuivering van ziekenhuisafvalwater zou de lozing van CPE vanuit ziekenhuizen verminderd kunnen worden. Dit is echter geen methode om de vrachten van CPE substantieel te verlagen, omdat de meerderheid van CPE (behalve dan in enkele metingen) in dit onderzoek niet afkomstig was van het ziekenhuis.

5 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).
- 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.
- Bello Gonzalez Tde, J., Zuidema, T., Bor, G., Smidt, H. and van Passel, M.W. (2015) Study of the Aminoglycoside Subsistence Phenotype of Bacteria Residing in the Gut of Humans and Zoo Animals. *Front Microbiol* 6, 1550.
- Berendsen, B.J., Gerritsen, H.W., Wegh, R.S., Lameris, S., van Sebille, R., Stolker, A.A. and Nielen, M.W. (2013) Comprehensive analysis of beta-lactam antibiotics including penicillins, cephalosporins, and carbapenems in poultry muscle using liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* 405(24), 7859-7874.
- Berendsen, B.J., Wegh, R.S., Memelink, J., Zuidema, T. and Stolker, L.A. (2015) The analysis of animal faeces as a tool to monitor antibiotic usage. *Talanta* 132, 258-268.
- 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>.
- Doi, Y. and Paterson, D.L. (2015) Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Semin Respir Crit Care Med* 36(1), 74-84.
- Haverkate, M.R., Platteel, T.N., Fluit, A.C., Cohen Stuart, J.W., Leverstein-van Hall, M.A., Thijsen, S.F.T., Scharringa, J., Kloosterman, R.C., Bonten, M.J.M. and Bootsma, M.C.J. (2017) Quantifying within-household transmission of extended-spectrum beta-lactamase-producing bacteria. *Clin Microbiol Infect* 23(1), 46 e41-46 e47.
- Reuland, E.A., Overdeest, 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.
- 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 antibioticaresistentie in het milieu en mogelijke maatregelen. RIVM rapport 2017-0058.

- 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 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.

6 Annex

6.1 Analyse van antibioticaresiduen

6.1.1

Analysis of tetracyclines, sulfonamides, macrolides and quinolones

Analysis of tetracyclines, sulfonamides, macrolides and quinolones were performed as in Berendsen et al. (2015), with adaptations as summarized in the following paragraphs:

Sample pre-treatment

Two 40 ml portions of each sample of sewage were weighed into separate 50 mL tubes, after which internal standards were added. To one of these portions antibiotics were added at a level of 25 ng/L for the sulfonamides and 100 ng/L for the tetracyclines, quinolones and macrolides. Four mL of EDTA-McIlvain buffer (0.1 M, pH 4.0) were added, after which the samples were shaken for 5 minutes head-over-head. The residue was taken up in 100 µL MeOH, after which 400 µL water was added.

LC-MS / MS

The following gradient was applied: 0-0.5 min 1% B; 0.5-2.5 min linear increase to 25% B; 2.5-5.4 min linear increase to 70% B; 5.4-5.5 min linear increase to 100% B, with a final hold of 1.0 min. The injection volume was 5 µL. Detection was carried out by an AB Sciex (Ramingham, MA, USA) Q-Trap 5500 or a Q-Trap 6500 mass spectrometer in positive electrospray ionisation (ESI). The parameters used for the Q-Trap 5500 and the Q-Trap 6500 were: capillary voltage, -4.0 kV; declustering potential, 10 V; source temperature, 450 °C; GAS 1 and 2, 50 (arbitrary units).

6.1.2

Analysis of aminoglycosides

Analysis of aminoglycosides was performed as in Bello Gonzalez Tde et al. (2015), with adaptations as summarized in the following paragraphs:

Sample pre-treatment

Two 10 ml portions of each sample of sewage were weighed into separate 50 mL tubes, after which internal standards were added. To one of these portions aminoglycosides were added at a level of 50 µg/L. Twenty mL of extraction liquid (10 mM KH₂PO₄ with 0.4 mM EDTA and 2% TCA) were added, samples were mixed by means of a vortex and shaken head-over-head for 10 min. The extract was then brought to pH 7.6-7.9 and centrifuged (15 min, 3600 g). The complete extract was transferred to a conditioned CBX cartridge, followed by washing with 4 mL of water and drying. The aminoglycosides were eluted with 3 mL acetic acid (10% in MeOH). The eluate was dried at 60°C, evaporated under N₂ and taken up in 400 µL HFBA (0.065%).

LC-MS / MS

The following gradient was applied: 0-0.5 min, 0% B; 0.5-5 min, linear increase to 45% B; 5-8 min, linear increase to 60% B; 8-10 min, linear increase to 100% B. The injection volume was 40 µL. Detection was carried out by a Waters (Milford, MA, USA) Quattro Ultima mass

spectrometer in positive electrospray ionization (ESI) mode. The parameters used were: capillary voltage, 2.7 kV; desolvation temperature, 500 ° C; source temperature, 120 ° C; cone gas, 150 L/h and desolvation gas 550 L/h.

6.1.3

Analysis of β -lactams

Analysis of β -lactams was performed as in Berendsen et al. (2013), with adaptations as summarized in the following paragraphs:

Sample pre-treatment

Two 10 ml portions of each sample of sewage were weighed into separate 50 mL tubes, after which internal standards were added. To one of these portions β -lactams were added at a level of 50 μ g/L for the penicillins and 500 μ g/L for the cephalosporins and carbapenems.

LC-MS / MS

Detection was carried out by a Waters model Xevo TQS or an AB Sciex (Ramingham, MA, USA) Q-Trap 6500 mass spectrometer in positive electrospray ionization (ESI) mode. The parameters used for the QTrap 6500 were: capillary voltage, 2.0 kV; cone voltage, 25 V; source offset, 20 V; source temperature, 150 ° C; desolvation temperature, 550 ° C; cone gas flow, 150 L/h and desolvation gas, 600 L/h.

RIVM

De zorg voor morgen begint vandaag