



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

**Inventarisatie Screening
carbapenemase-producerende bacteriën
in dieren en dierlijke producten:
is de huidige screening toereikend?**

RIVM Briefrapport 2017-0088
C.M. Dierikx et al.

Dit rapport bevat een erratum op de laatste
pagina



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

**Inventarisatie Screening
carbapenemase-producerende bacteriën
in dieren en dierlijke producten:
is de huidige screening toereikend?**

RIVM Briefrapport 2017-0088
C.M. Dierikx et al.

Dit rapport bevat een erratum op de laatste
pagina

Colofon

© RIVM 2017

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-2017-0088

B. Wit (auteur), NVWA, Utrecht
K. Veldman (auteur), WBVR, Lelystad
J. Hordijk (auteur), FD, Utrecht
J. Wagenaar (auteur), FD, Utrecht
A. Heuvelink(auteur), GD, Deventer
P. Vellema (auteur), GD, Deventer
C.M. Dierikx (auteur), RIVM
J.A. Backer (auteur), RIVM
K. Takumi (auteur), RIVM
E. van Duijkeren (auteur), RIVM

Contact:
Cindy Dierikx
CIB-Z&O
cindy.dierikx@rivm.nl

Dit onderzoek werd verricht in opdracht van VWS, in het kader van Antimicrobiële Resistentie

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

Publiekssamenvatting

Inventarisatie Screening carbapenemase-producerende bacteriën in dieren en dierlijke producten: is de huidige screening toereikend?

In dit onderzoek is gekeken of de huidige monitoring van carbapenemase-producerende bacteriën (CPE) voldoende is om betrouwbare uitspraken te kunnen doen over het vóórkomen van deze bacteriën in dieren en/of dierlijke producten. De conclusie van dit rapport is dat méér en gericht monsters van dieren en dierlijke producten genomen zouden moeten worden om lage prevalenties (vóórkomen) van CPE te kunnen monitoren. Daarmee wordt tevens de kans verhoogd besmettingen met CPE te ontdekken, voordat het verspreid is naar meerdere bedrijven, dieren en/of (dierlijke) producten.

Het gaat om antibioticaresistente bacteriën die resistent zijn tegen het soms nog laatste redmiddel bij infecties, carbapenem antibiotica. Deze bacteriën worden gezien als bedreiging voor de volksgezondheid. Gelukkig komen deze nog niet zo vaak bij mensen in Nederland voor. Als dit type bacteriën in ziekenhuizen wordt aangetroffen, worden maatregelen getroffen om ervoor te zorgen dat ze zich niet verder kunnen verspreiden naar risicogroepen.

Hoewel CPE tot nu toe in Nederland nog niet in dieren en/of dierlijke producten zijn aangetroffen, kunnen ook dieren en/of dierlijke producten een rol spelen bij de verspreiding ervan naar de mens. CPE zijn in het buitenland al wel incidenteel gevonden bij dieren. In de Nederlandse veestapel, onder gezelschapsdieren en in (dierlijke) producten vindt op dit moment een monitoring plaats naar CPE. Het is echter onzeker of deze monitoring voldoende is om veranderingen in het vóórkomen van CPE te bepalen en om CPE te vinden, op het moment dat deze nog niet verspreid zijn naar meerdere bedrijven, dieren en/of (dierlijke) producten. Daarom heeft het ministerie van VWS het RIVM gevraagd voorliggend onderzoek te doen. Het brengt de huidige monitoring van CPE in de Nederlandse veestapel, gezelschapsdieren en dierlijke producten gedetailleerd in kaart, geeft een overzicht van de betrouwbaarheid van deze metingen en inventariseert mogelijke verbeteringen.

Uit het onderzoek blijkt dat de aantallen monsters die van dieren en producten genomen worden te klein zijn om betrouwbare uitspraken te doen over de afwezigheid van CPE in de veestapel en om veranderingen bij een lage prevalentie te kunnen waarnemen. Daarom wordt aanbevolen om in de monitoring meer monsters te onderzoeken. Ook is het zinvol om te analyseren waar de grootste risico's voor introductie van CPE in dieren en/of dierlijke producten liggen, zodat de aanvullende metingen zo gericht mogelijk kunnen worden uitgevoerd. Een eerste verkennende risico inventarisatie laat zien dat import van dieren en/of dierlijke producten uit gebieden waar CPE voorkomt, een mogelijk risico is voor invoer van CPE naar Nederland. Productiedieren kunnen ook besmet worden door overdracht vanuit bedrijven hoger in de

productieketen, waar op dit moment geen monitoring plaatsvindt. Daarnaast kan er ook overdracht plaats vinden via besmette mensen.

Door méér en gericht monsters van dieren en (dierlijke) producten te nemen kan de afwezigheid van CPE met een betere betrouwbaarheid worden bepaald. Daarmee wordt tevens de kans verhoogd besmettingen met CPE te ontdekken, voordat het verspreid is naar meerdere bedrijven, dieren en/of (dierlijke) producten.

Kernwoorden: CPE, carbapenemase producerende Enterobacteriaceae, monitoring, antimicrobiële resistentie, veehouderij, vlees, gezelschapsdieren, dierlijke producten, detectielimiet

Synopsis

Overview of Screening carbapenemase-producing bacteria in animals and animal products: is the current screening sufficient?

This study examined whether current monitoring of carbapenemase-producing bacteria (CPE) can reliably detect the presence or absence of CPE in animals and/or animal products. The report concludes that it is necessary to take more samples of animals and animal products in a more targeted manner to be able to monitor a low prevalence of CPE. This will also increase the chance of finding CPE before it has spread to different farms, animals and/or (animal) products.

CPE are antibiotic-resistant bacteria that are resistant to the last resort in infections, carbapenem antibiotics. These bacteria are seen as a threat to public health. Fortunately, they are not often found in humans in the Netherlands as yet. When this type of bacteria is found in hospitals, measures are taken to ensure they cannot spread further to risk groups.

Although CPE have not been found in animals and/or animal products in the Netherlands as yet, animals and/or animal products can play a role in spreading it to humans. CPE are occasionally found in animals abroad. Dutch livestock, pets and animal products are currently monitored for CPE. However, it is uncertain whether this monitoring is sufficient to detect changes in CPE presence and to find CPE when they are not yet widely distributed among farms, animals and/or (animal) products. For this reason, the Ministry of Health, Welfare and Sport has asked RIVM to conduct a preliminary study. It gives a detailed assessment of current monitoring of CPE in Dutch livestock, pets and animal products, provides an overview of the reliability of these measurements and identifies potential improvements.

The study shows that the numbers of samples taken from animals and products are too low to make reliable statements about the absence of CPE among livestock and to detect trends when the prevalence is low. Therefore more samples will have to be examined in order to monitor these trends. It is also useful to investigate where the greatest risks for the introduction of CPE in animals and/or animal products lie so that additional measurements can be carried out in the most targeted manner. A first exploratory risk inventory shows that import of animals and/or animal products from areas where CPE occurs is a potential risk for CPE entry into the Netherlands. Production animals can also acquire CPE through transmission from farms higher in the production chain. No monitoring currently takes place in the farms higher in the production chain. In addition, transmission can also occur via human carriers.

Absence of CPE can be investigated more reliably by taking more samples from animals and (animal) products in a more targeted manner. This will also increase the chance of finding CPE before it has spread to more farms, animals and/or (animal) products.

Keywords: CPE, carbapenemase-producing Enterobacteriaceae, monitoring, antimicrobial resistance, livestock, meat, pets, animal products, detection limit

Inhoudsopgave

Samenvatting – 9

1 Achtergrond, doel en opbouw – 13

2 Plan van aanpak – 15

3 Huidige antibioticaresistentie (CPE) screening in dieren en dierlijke producten – 17

3.1 CPE screening in landbouwhuisdieren (WBVR) – 17

3.1.1 Nationaal – 17

3.1.2 Internationaal – 20

3.2 CPE screening in gezelschapsdieren (UU-FD) – 21

3.2.1 Nationaal – 21

3.2.2 Internationaal – 23

3.3 CPE screening in veterinaire pathogenen (landbouwhuisdieren) (GD) – 23

3.3.1 Beschrijving AR monitoring dierlijke pathogenen – 23

3.4 CPE screening in vlees (NVWA) – 26

3.4.1 Nationaal – 26

3.5 CPE screening in import vis en kruiden (NVWA) – 29

3.5.1 Nationaal – actief – 29

4 Berekening detectielimieten – 31

4.1 Detectielimieten CPE screening landbouwhuisdieren – 33

4.1.1 Passieve CPE screening in landbouwhuisdieren – 33

4.1.2 Actieve CPE screening in landbouwhuisdieren – 34

4.2 Detectielimieten CPE screening gezelschapsdieren – 34

4.2.1 Passieve CPE screening in gezelschapsdieren – 34

4.2.2 Actieve CPE screening in gezelschapsdieren – 35

4.3 Detectielimieten CPE screening vlees – 35

4.3.1 Passieve CPE screening in vlees – 35

4.3.2 Actieve ESBL screening met CPE screening in vlees – 36

4.4 Detectielimieten CPE screening in import vis en kruiden – 37

4.4.1 Actieve CPE screening in import vis en kruiden – 37

4.5 Verlagen detectielimiet – 38

4.6 Interpretatie detectielimiet – 39

5 Aanpassing screening voor eerdere detectie CPE in dieren in Nederland – 41

5.1 Actieve/passieve screening – 41

5.2 Inventarisatie bestaande monsterstromen – 41

5.3 Isolatiemethodes – 47

5.4 Recente ontwikkeling in de Europese monitoring relevant voor Nederland – 49

5.5 Inventarisatie risicogroepen – 50

5.6 Inrichting monitoring voor eerdere detectie van CPE – 51

6 Discussie/conclusie – 53

7 Referenties – 57

Bijlage tabellen – 60

Samenvatting

Achtergrondinformatie, historie

Carbapenemresistente bacteriën zijn bacteriën die ongevoelig zijn voor de carbapenem antibiotica. Deze antibiotica zijn belangrijk voor behandeling van infecties met bijzonder resistente micro-organismen (BRMO), bijvoorbeeld ESBL-producerende bacteriën. Vaak zijn carbapenems de laatste antibiotica die dan nog ingezet kunnen worden. Op dit moment is het aantal infecties met carbapenemresistente bacteriën in Nederland nog laag (Nethmap/MARAN 2016) en beperkt tot infecties in het ziekenhuis. Een stijging van het aantal infecties met deze bacteriën is een dreiging voor de curatieve en publieke gezondheidszorg. Ook dieren kunnen gekoloniseerd raken en een reservoir gaan vormen met carbapenemresistente organismen en transmissie van deze bacteriën tussen mens en dier is mogelijk. Daarom is het belangrijk om in het beleid van preventie en bestrijding van carbapenemresistentie de veehouderij (inclusief dierlijke producten) en gezelschapsdieren mee te nemen.

Onder carbapenemresistente bacteriën met risico voor verspreiding vanuit dieren naar de mens vallen: 1) bacteriën die enzymen (carbapenemases) produceren (zogenaamde CPE: carbapenemase producerende Enterobacteriaceae), waardoor ze resistent zijn voor carbapenem antibiotica; 2) de genen die coderen voor de aanmaak van deze enzymen als deze op mobiele stukjes DNA (plasmiden) liggen. Ook niet-horizontaal overdraagbare carbapenemase genen in bacteriën, die zoönotisch kunnen zijn voor de mens (zoals bijvoorbeeld Salmonella), vallen onder de casus definitie van carbapenemresistente bacteriën.

Huidige situatie

Carbapenemresistentie wordt in Nederland zowel in landbouwhuisdieren en voedsel/dierlijke producten (sinds 2013) als in gezelschapsdieren (sinds 2015) actief gemonitord. Voor landbouwhuisdieren gaat het om een actieve screening, waarbij alle faecesmonsters (caeca) genomen op het slachthuis voor resistentieonderzoek (minimaal 170 per diersoort per jaar) gescreend worden op CPE. Dit wordt uitgevoerd bij Wageningen Bioveterinary Research (WBVR, het voormalig Central Veterinary Institute (CVI)) in Lelystad.

Actieve monitoring in gezelschapsdieren wordt uitgevoerd op de faculteit Diergeneeskunde (FD) van de Universiteit Utrecht (UU), waarbij monsters van klinisch zieke honden, die langdurig behandeld worden met antibiotica, gescreend worden op CPE. Daarnaast worden ook kattenmonsters onderzocht, zonder verdere selectie. Deze monsters worden door gezelschapsdierenklinieken ingestuurd naar het Veterinair Microbiologisch Diagnostisch Centrum (VMDC) van de UU.

In voedsel/dierlijke producten wordt door de NVWA op dit moment risico-gericht gescreend op CPE in geïmporteerde kruiden en vis. In vlees worden alle ESBL-positieve isolaten onderzocht voor CPE. In klinische isolaten van landbouwhuisdieren die bij de Gezondheidsdienst (GD) in Deventer worden onderzocht vindt nog geen screening plaats op CPE, maar wel op ESBL-producerende bacteriën.

Aanleiding tot het onderzoek

Momenteel komt carbapenemresistentie sporadisch voor in de humane populatie en is het nog niet gesignaleerd in de veehouderij in Nederland. Veterinaire en humane experts hebben tijdens een bijeenkomst op 16 december 2013 geconcludeerd dat de monitoring in dieren op dit moment voldoende is. Echter, dit gaat over de huidige monitoring, die vooral is ingericht om veranderingen in resistentie over de tijd te kunnen detecteren. Het is de vraag of de screening ook voldoende is om een lage prevalentie van carbapenemresistentie op te sporen en te kunnen monitoren. Recente cases in Duitsland laten zien dat CPE al jaren in de veehouderij aanwezig kan zijn, voordat het in de huidige monitoring ontdekt wordt. Het belang van het nauwgezet monitoren van opkomende resistenties (waaronder CPE) wordt onderstreept door het Gezondheidsraadadvies (eind 2015, update van 2011).

Vraagstelling en doel

Het ministerie van VWS heeft het RIVM/CIB in 2016 opdracht gegeven de huidige CPE monitoring in dieren en voedsel/dierlijke producten gedetailleerd in kaart te brengen om zo meer inzicht te krijgen in de betrouwbaarheid van de huidige monitoring. Het doel daarvan is tevens 1) een antwoord te vinden op de vraag of deze monitoring voldoende is om ervoor te zorgen dat we CPE vroegtijdig (dat wil zeggen als het slechts op enkele bedrijven, dieren en/of (dierlijke) producten aanwezig is) vinden in dieren en/of (dierlijke) producten en 2) een inventarisatie te doen van mogelijke verbeteringen.

Opzet van het rapport

In het rapport wordt eerst een overzicht gegeven van de huidige werkwijze en diagnostische laboratoriummethoden die worden toegepast voor de screening van CPE in landbouwhuisdieren, gezelschapsdieren en voedsel/dierlijke producten. Op basis van deze gegevens is berekend met welke grens (detectielimiet) het voorkomen van CPE in de verschillende groepen dieren en/of producten betrouwbaar kan worden bepaald. Tot slot is een inventarisatie gedaan voor het verbeteren van de CPE screening, opdat eventueel voorkomen en verspreiding van CPE in de dierhouderij mogelijk eerder kan worden ontdekt.

Resultaten, discussie, conclusies

Tot op heden zijn in Nederland geen CPE positieve monsters gevonden in dieren en/of dierlijke producten. Met de huidige aantallen dieren die actief gescreend worden op CPE kan met 95% betrouwbaarheid een prevalentie van 1% worden opgepikt in landbouwhuisdieren. In gezelschapsdieren is dit ongeveer 2% en in vlees is dit afhankelijk van de aantallen onderzochte monsters per vleessoort tussen 0,44% en 62%. Deze 'detectielimieten' lijken niet voldoende om CPE te detecteren op een moment dat slechts enkele dieren, bedrijven en/of (dierlijke) producten besmet zijn. Daartoe zou het wenselijk zijn een lagere prevalentie, bijvoorbeeld 0,1%, met 95% betrouwbaarheid te kunnen bepalen. Om dat te realiseren zouden 3327 monsters per (dier)soort/product onderzocht moeten worden. De kans om deze prevalentie met de huidige monitoring te missen is 76%. Recentelijk is een aantal gevallen van CPE in varkens in Duitsland ontdekt. De prevalentie op basis van deze gevallen wordt geschat op

0,5% en ook dat laat zien dat een intensievere monitoring in Nederland wenselijk is als men CPE vroegtijdig wil opsporen.

Concluderend kan worden gezegd dat de huidige CPE screening voldoet voor trendanalyse, maar nog verbeterd zou kunnen worden. Door een groter aantal monsters te nemen, kunnen lagere prevalenties van CPE betrouwbaar gedetecteerd en gemonitord worden. Daarmee wordt tevens de kans verhoogd besmettingen met CPE te ontdekken, voordat het verspreid is naar meerdere bedrijven, dieren en/of (dierlijke) producten, al kan niet gegarandeerd worden dat elke CPE besmetting vroegtijdig wordt ontdekt. Naast het nemen van meer monsters, wordt de kans hierop ook vergroot door risico-gebaseerd te screenen en waar mogelijk aan te sluiten bij al bestaande monsterstromen. De mogelijkheid daarvoor zal verder onderzocht moeten worden.

Het grootste risico op insleep van CPE in Nederland in dieren en/of dierlijke producten wordt geschat via de import van dieren en/of dierlijke producten uit endemische gebieden. Daarom is het belangrijk om dierstromen goed in kaart te brengen en te monitoren. Daarnaast is het goed om in het achterhoofd te houden dat productiedieren ook besmet kunnen worden door transmissie uit eerdere schakels in de productieketen en er op dit moment geen screening in dieren hoger in de productiepiramide plaatsvindt. Overwogen kan worden om deze op te nemen in de huidige monitoring. Daarnaast kan er overdracht plaatsvinden via besmette mensen. Indien mogelijk, zou een kwantitatieve inschatting van een mogelijke blootstelling vanuit verschillende bronnen helpen om de huidige monitoring aan te passen. Dit geldt voor alle bronnen (mensen, dieren, milieu, vlees), waarbij de huidige systematiek kan blijven bestaan.

Ook zal er eerst consensus moeten komen over de gewenste betrouwbaarheid van de prevalentieschattingen in de verschillende domeinen, die nu gescreend worden.

1 Achtergrond, doel en opbouw

Carbapenemresistente bacteriën zijn bacteriën die ongevoelig zijn voor carbapenem antibiotica. Deze antibiotica zijn belangrijk voor behandeling van infecties bij de mens met bijzonder resistente micro-organismen (BRMO), bijvoorbeeld ESBL-producerende bacteriën. Vaak zijn carbapenems de laatste antibiotica die dan nog ingezet kunnen worden. Op dit moment is het aantal infecties met carbapenemresistente bacteriën in Nederland nog laag (Nethmap/MARAN 2016) en beperkt tot infecties in het ziekenhuis. Een stijging van het aantal infecties met deze bacteriën is een dreiging voor de curatieve en publieke gezondheidszorg.

Ook dieren kunnen gekoloniseerd raken met carbapenemresistente organismen en transmissie van deze bacteriën tussen mens en dier is mogelijk. Daarom is het belangrijk om in het beleid van preventie en bestrijding van carbapenemresistentie de veehouderij en gezelschapsdieren mee te nemen. Belangrijk in dit beleid is ook de omschrijving van een casus-definitie. Deze is omschreven in het advies Preventie en bestrijding van carbapenemresistentie in Nederland van 2014 (1). Onder carbapenemresistente bacteriën met risico voor verspreiding vanuit dieren naar de mens vallen: bacteriën die enzymen (carbapenemases) produceren (veelal CPE: carbapenemase producerende *Enterobacteriaceae*), waardoor ze resistent zijn tegen carbapenem antibiotica. De genen die coderen voor de aanmaak van deze enzymen liggen op mobiele stukjes DNA (plasmiden), waardoor de genen overdraagbaar zijn. Ook niet-horizontaal-overdraagbare carbapenemase genen in bacteriën, die zoönotisch zijn en dus ook ziekteverwekkend kunnen zijn voor de mens (zoals bijvoorbeeld *Salmonella*), vallen onder de casus definitie van carbapenemresistente bacteriën.

Carbapenemresistentie wordt in Nederland zowel in landbouwhuisdieren als in gezelschapsdieren actief gemonitord, ondanks dat carbapenems niet geregistreerd zijn voor dieren en in Nederland ook niet in dieren gebruikt mogen worden ((2)). Voor landbouwhuisdieren gaat het om een actieve screening (advies van het BIO-HAZ panel van EFSA (3)) waarbij alle faecesmonsters (caeca) genomen voor resistentieonderzoek (minimaal 170 per diersoort per jaar (4)) met PCR gescreend worden op de meest voorkomende carbapenemase genen (OXA-48, VIM, NDM, KPC, IMP). Dit wordt uitgevoerd bij Wageningen Bioveterinary Research (WBVR, het voormalig Central Veterinary Institute (CVI)) in Lelystad waar de monitoring van antibioticaresistentie bij dieren wordt gedaan op het Nationaal Referentielaboratorium voor antibioticaresistentie bij dieren.

Actieve monitoring in gezelschapsdieren wordt uitgevoerd op de faculteit Diergeneeskunde (FD) van de Universiteit Utrecht (UU), waarbij monsters van klinisch zieke dieren die langdurig behandeld worden met antibiotica, gescreend worden op CPE. Deze monsters worden door gezelschapsdierenklinieken ingestuurd naar het Veterinair Microbiologisch Diagnostisch Centrum (VMDC) van de UU. Voor honden betreft dit o.a. dieren met een huidontsteking, die vaak weken tot maanden met antibiotica worden behandeld. Voor katten worden monsters uit de routinediagnostiek gebruikt waarvan in ieder geval een

deel met antibiotica behandeld is. Daarnaast worden multiresistente bacteriën die bij het VMDC tijdens de routinediagnostiek aangetroffen worden onderzocht op carbapenemase vorming.

In voedsel/dierlijke producten wordt door de NVWA op dit moment risico-gericht gescreend op CPE in geïmporteerde kruiden en vis. Van klinische isolaten van landbouwhuisdieren die bij de Gezondheidsdienst (GD) in Deventer worden onderzocht vindt nog geen screening plaats op CPE, maar wel op ESBL-producerende bacteriën.

Aanleiding

In het advies Preventie en bestrijding van carbapenemresistentie in Nederland uit 2014, wat opgesteld is in opdracht van het ministerie van EZ en VWS staat dat 'omdat carbapenemresistentie sporadisch voorkomt in de humane populatie en nog niet gesignaleerd is in de veehouderij in Nederland, hebben veterinaire en humane experts tijdens een bijeenkomst op 16 december 2013 geconcludeerd dat de monitoring in dieren op dit moment voldoende is.'(1). Echter deze uitspraak is verder niet onderbouwd en gaat over de huidige monitoring, die vooral is ingericht om veranderingen in resistentie over de tijd te kunnen detecteren. Het is onwaarschijnlijk dat deze screening ook voldoende is om een lage prevalentie van carbapenemresistentie op te sporen en te kunnen monitoren. Het belang van het nauwgezet monitoren van opkomende resistenties (waaronder CPE) wordt onderstreept door het Gezondheidsraadadvies (eind 2015, update van 2011).

Doel

Het ministerie van VWS heeft het RIVM/CIB in 2016 opdracht gegeven de huidige CPE monitoring in dieren en dierlijke producten gedetailleerd in kaart te brengen om zo meer inzicht te krijgen in de betrouwbaarheid van de huidige monitoring. Het doel daarvan is tevens 1) een antwoord te vinden op de vraag of deze monitoring voldoende is om ervoor te zorgen dat we CPE vroegtijdig vinden (dat wil zeggen als het slechts op enkele bedrijven, dieren en/of (dierlijke) producten aanwezig is) in dieren en/of dierlijke producten en 2) een inventarisatie te doen van mogelijke verbeteringen.

Opbouw van het rapport

In hoofdstuk 2 is het plan van aanpak beschreven. In hoofdstuk 3 wordt in detail de huidige CPE screening beschreven voor landbouwhuisdieren, gezelschapsdieren en in dierlijke producten. In hoofdstuk 4 zijn voor alle monsterstromen de CPE detectielimieten berekend, rekening houdend met de gevoeligheid van de gebruikte test en de aantallen monsters die getest zijn. In hoofdstuk 5 worden de verschillende punten van de huidige manier van screenen op een rij gezet (testmethode, detectielimiet en welke populaties worden gescreend), bestaande alternatieve (anders dan beschreven in hoofdstuk 3) monsterstromen en recente ontwikkelingen in Europa beschreven en besproken welke aanpassingen tot een eerdere detectie van CPE zouden kunnen leiden. Vervolgens wordt dit in hoofdstuk 6 bediscussieerd.

2 Plan van aanpak

Aan het begin van het project heeft bij het RIVM een overleg plaatsgevonden tussen vertegenwoordigers van de faculteit Diergeneeskunde (FD), Wageningen Bioveterinary Research (WBVR), Gezondheidsdienst voor Dieren (GD), NVWA en het RIVM. De bijeenkomst had tot doel het project toe te lichten en taken te verdelen onder de aanwezigen.

In dit overleg hebben alle partijen aangegeven wat er op dit moment globaal aan CPE-screening wordt gedaan binnen de verschillende instituten (zie ook hoofdstuk 1).

Voor de bijeenkomst was een voorlopige inhoudsopgave voor het einddocument opgesteld, welke in de bijeenkomst is besproken. RIVM heeft vervolgens een raamwerk rondgestuurd met daarin omschreven welke gegevens vermeld moeten worden in de hoofdstukken. Het document is in drie fasen geschreven:

Fase 1: Gezamenlijk met alle instituten is in hoofdstuk 3 de huidige monitoring beschreven. Hiervoor zijn aantallen gescreende monsters per jaar per diersoort in 2012-2015/16 opgenomen en de methoden die hiervoor gebruikt zijn.

Fase 2: Met de gegevens uit hoofdstuk 3 zijn door het RIVM in hoofdstuk 4 de detectielimieten berekend voor de huidige screening.

Fase 3: Na fase 1 en 2 zijn de partijen weer bij elkaar gekomen om te discussiëren over hoofdstuk 5 (plan voor aanpassing van de monitoring) en 6 (discussie en conclusie). Met de input van deze bijeenkomst is door het RIVM afgestemd met het ministerie van VWS en EZ over de betekenis van deze data. Vervolgens is het rapport aangevuld met de interpretatie van de berekende detectielimieten. Het concept rapport is voorgelegd aan experts.

3 Huidige antibioticaresistentie (CPE) screening in dieren en dierlijke producten

3.1 CPE screening in landbouwhuisdieren (WBVR)

3.1.1 Nationaal

Door het nationaal referentie laboratorium voor antibioticaresistentie in dieren van Wageningen Bioveterinary Research (WBVR) in Lelystad wordt er passief en actief gemonitord op antimicrobiële resistentie (AMR) in landbouwhuisdieren. Met passieve CPE screening bedoelen we dat monsters gekweekt worden op niet-selectieve platen. Eén isolaat van deze niet-selectieve plaat wordt vervolgens verder onderzocht op carbapenemresistentie. Met een actieve screening wordt bedoeld, een screening waarbij direct gericht naar carbapenemresistentie gekeken wordt. Dit kan door het screenen op carbapenemase genen met RT-PCR of door het uitplaten van de monsters op selectieve platen waar alleen carbapenemresistente isolaten op kunnen groeien.

AMR screening E. coli in landbouwhuisdieren

Sinds 1998 worden door het WBVR faeces onderzocht t.b.v. monitoring van AMR in bacteriën uit faeces afkomstig van kippen, kalveren, melkkoeien en varkens (EU Besluit 2013/652/EC). In 2012 zijn ook kalkoenen meegenomen in de monitoring en in 2014 ook legkippen (extra onderzocht, niet volgens EU besluit). Deze faecesmonsters (sinds 2015 caeca monsters) worden op het slachthuis genomen. Dit gebeurt volgens EFSA-richtlijnen (5), waarbij minimaal 170 monsters per diersoort per jaar onderzocht worden. Ieder monster is representatief voor één koppel dieren dat op een bepaalde dag wordt geslacht. Voor de afgelopen vier jaar ging het bij het onderzoek van faecesmonsters op *E. coli* om de aantallen zoals vermeld in Tabel 3.1.1.

Tabel 3.1.1 Overzicht van totaal aantal faecesmonsters onderzocht voor monitoring antimicrobiële resistente bacteriën per jaar (E. coli).

	Vlees- varkens	Vlees- kalveren	Melk- koeien	Vlees- kuikens	Leg- kippen	Kal- koeien
2012	284	285	274	292	-	79
2013	289	317	271	494	-	-
2014	392	292	268	377	190	-
2015	298	293	292	400	-	-

- : in dat jaar heeft geen antimicrobiële monitoring plaatsgevonden in deze diersoort.

170 dieren per jaar per diersoort is gebaseerd op een sample size berekening van Snedecor en Cochran (6). De steekproef (sample size) van minimaal 170 dieren per diersoort per jaar is in staat om met een vastgestelde zekerheid (95% zekerheid, maximale fout 8%) een verschil van 15% te kunnen meten in een situatie waar de prevalentie rond 50% ligt. Dit geldt ook voor een toename in prevalentie van 5% als de prevalentie laag is (0.1%) (4). De resultaten worden jaarlijks in de MARAN rapportage (sinds 2012 Nethmap/MARAN rapport) gepubliceerd.

Laboratorium methode AMR monitoring

Ten behoeve van de AMR monitoring wordt vanuit een 10% w/v suspensie van caecuminhoud in pepton glycerolmedium na incubatie overnacht 10 µl afgeënt op MacConkey agar. Uit de faecesmonsters wordt random één *E. coli* per monster geïsoleerd als representant van de Gram-negatieve flora in de darm.

AMR screening Salmonella

Voor de monitoring van antibioticaresistentie worden meer dan 1500 Salmonella isolaten per jaar onderzocht op hun gevoeligheid voor antibiotica. Deze Salmonella isolaten zijn afkomstig uit verschillende bronnen (humaan, dieren en dierlijke producten), die naar het RIVM zijn gestuurd voor verdere typering. Deze isolaten kunnen afkomstig zijn uit diagnostische monsters of uit lopende monitoringsprogramma's. In Tabel 3.1.2 zijn de aantallen geteste Salmonella per diersoort weergegeven.

Tabel 3.1.2 Overzicht van totaal aantal Salmonella isolaten onderzocht voor algemene monitoring antimicrobiële resistente bacteriën per jaar (Nethmap/MARAN 2013-2016).

	Vlees- varkens	Rundvee (vleeskalveren + melkkoeien + overig rund)	Vlees- kuikens	Leg- kippen	Overig kip/kip- product
2012	175	72	97	79	256
2013	73	52	119	50	276
2014	74	45	91	50	222
2015	51	54	60	37	160

Passieve CPE screening van E. coli en Salmonella

De passieve screening bestaat uit een 2-trapstest:

1. De verkregen isolaten worden getest op hun gevoeligheid (Minimale Inhiberende Concentratie (MIC) bepaling) met behulp van de microbouillon verdunningstest (Sensititre). Daarbij wordt een panel antibiotica gebruikt dat Europees-breed gebruikt wordt voor de AMR monitoring in isolaten van landbouwhuisdieren (EUVSEC). Daarin zijn cefotaxime en ceftazidime opgenomen voor screening van ESBL/AmpC producerende stammen en meropenem (een carbapenem) voor screening van CPE.

2. Alle cefotaxime en/of ceftazidime resistente isolaten (2012) en/of meropenem resistente isolaten (vanaf 2013) worden aanvullend getest op carbapenem resistentie met behulp van een disk diffusietest met meropenem, imipenem en ertapenem (2012) en sinds 2013 met een aanvullend MIC panel (EUVSEC2). Dit panel bevat verschillende cefalosporines en carbapenems (meropenem, imipenem en ertapenem). Alle carbapenem resistente isolaten worden met moleculaire technieken geconfirmeerd als zijnde CPE, waarbij het gen en de locatie van het gen worden bevestigd.

In Tabel 3.1.3 en 3.1.4 zijn de aantallen isolaten weergegeven, die met deze methode in de afgelopen jaren zijn onderzocht.

De gevoeligheid van deze methode is zeer laag, de specificiteit is 100%.

Tabel 3.1.3 Overzicht van aantal *E. coli* isolaten gescreend voor carbapenemases (alle ESBL-verdachte isolaten) in passieve monitoring op carbapenemase producerende *E. coli*.

	Vlees- varkens	Vlees- kalveren	Melk- koeien	Vlees- kuikens	Leg- kippen	Kal- koeien
2012	0	2	1	18	-	1
2013	5	1	0	8	-	-
2014	2	3	1	11	1	-
2015	1	0	1	10	-	-

- : in dat jaar heeft geen antimicrobiële monitoring plaatsgevonden in deze diersoort.

Tabel 3.1.4 Overzicht van aantal *Salmonella* isolaten gescreend voor carbapenemases (alle cefotaxime en/of meropenem resistente isolaten) in passieve monitoring op carbapenemase producerende *Salmonella*.

	VV	VKa	MK	OR	VKu	LK	K	OK/KP
2012	0	0	0	0	0	0	0	16
2013	0	0	0	0	7	3	1	29
2014	0	0	0	0	5	0	0	15
2015	0	0	0	1	1	0	0	6

VV:Vleesvarkens; VKa:Vleeskalveren; MK:Melkkoeien; OR:Overig rund; VKu:Vleeskuikens; LK:Legkippen; K:Kalkoeien; OK/KP:Overig kip/kipproducten

Laboratorium methode actieve CPE monitoring landbouwhuisdieren

Vanaf 2013 zijn alle monsters uit de monitoring, naast de passieve screening, zoals hierboven beschreven, gericht (dus actief) onderzocht op de aanwezigheid van carbapenemase genen door gezuiverd DNA afkomstig van pools van vijf overnacht geïncubeerde gebufferd pepton water (BPW) ophopingen van de oorspronkelijke faecesmonsters te testen met een RT-PCR (Check-Points, Check-MDR Carba kit). Deze methode detecteert de meest voorkomende carbapenemase genen (*bla_{KPC}*, *bla_{NDM}*, *bla_{VIM}*, *bla_{IMP}*, en *bla_{OXA-48}*) in het monstermateriaal (dus niet in een vooraf geïsoleerde bacterie). Indien een positief signaal gevonden wordt in de RT-PCR vindt alsnog kweek plaats om te kijken in welke bacterie het gen zich bevindt. Daarnaast zijn alle caecummonsters onderzocht op CPE d.m.v. kweek conform EURL-AR protocollen (<http://eurl-ar.eu/233-protocols.html>) voor ESBL en CPE detectie. Dezelfde aantallen monsters als vermeld in Tabel 3.1.1 voor de jaren 2013-2015 zijn actief gescreend voor CPE. Zie kader voor details van de gebruikte laboratoriummethode.

Resultaten passieve en actieve CPE-screening in dieren

In de periode 2012-2015 zijn geen CPE gekweekt uit coecuminhoud. Echter jaarlijks werd in enkele monsters een positief OXA-48 signaal gevonden met RT-PCR. Dit signaal werd bevestigd met klassieke PCR en sequencing (zie Tabel 3.1.5). Uit aanvullend onderzoek bleek dat *Shewanella* aanwezig was in deze monsters. Moleculair onderzoek heeft aangetoond dat de OXA genen afkomstig van de monsters uit 2014 en 2015 in alle gevallen chromosomaal gelegen waren op *Shewanella* spp. Over het algemeen zijn *Shewanella* spp. omgevingsbacteriën die niet ziekmakend zijn. Om deze reden wordt deze bevinding niet beschouwd als een potentieel gevaar voor de volksgezondheid. Er is naar aanleiding hiervan dan ook geen verdere actie ondernomen. De gevoeligheid en de specificiteit van de actieve screening is hoog.

De EURL-AR protocollen schrijven voor om vanuit een overnacht geïncubeerde bouilloncultuur (BPW) een MacConkey plaat met 1 mg/L cefotaxime (voor ESBL detectie) te beënten. Op deze MacConkey plaat groeien alle cefotaxime resistente Enterobacteriaceae. Dit kunnen zowel ESBL/AmpC producenten zijn als mogelijke CPE. Voor selectieve isolatie van CPE worden twee platen beënt, te weten: ChromID Carba, ChromID OXA-48 (beiden van BioMerieux). Bij WBVR wordt bij een positieve OXA-48 uitslag gekweekt op bloedplaten met 0,125 mg/L ertapenem om de omgevingsbacterie *Shewanella* te isoleren. Vanaf deze media worden isolaten met verschillende koloniemorfologiën nader onderzocht: species typering met MALDItoF, confirmatie van CP-genen met PCR, chromosomale of plasmide locatie van het gen door S1-pulse field gel electrophoresis (PFGE) en hybridisatie, conjugatie en transformatie van plasmiden, minimale inhiberende concentratie (MIC) bepaling van de originele stam en zijn transconjuganten/transformanten en plasmide karakterisering door PCR gebaseerde plasmide typering (PBRT), en eventueel subtypering door middel van plasmide multi locus sequence typing (pMLST).

Gedetailleerde beschrijving laboratorium methode actieve CPE screening in landbouwhuisdieren

Tabel 3.1.5 Overzicht van aantal CPE verdachte (pool)monsters (allemaal in *Shewanella* spp.) uit de actieve CPE monitoring.

	Vlees- varkens	Vlees- kalveren	Melk- koeien	Vlees- kuikens	Leg- kippen
2013	2 (<i>bla</i> _{OXA-48} , <i>bla</i> _{Oxa-48b})	0	0	1 (<i>bla</i> _{OXA-48b})	-
2014	1 (<i>bla</i> _{OXA-252})	0	0	0	0
2015	0	1 (<i>bla</i> _{OXA-48b})	0	2 (<i>bla</i> _{OXA-48b})	-

Opmerking: in 2012 werd nog geen actieve monitoring voor CPE uitgevoerd.

- : in dat jaar heeft geen antimicrobiële monitoring plaatsgevonden in deze diersoort.

Naast onderzoek in faeces is er ook gekeken in oppervlaktewater en geïmporteerde siervissen (7). Hieruit blijkt dat *Shewanella* bacteriën met genen, die op OXA-48 lijken regelmatig voorkomen in transportwater van vissen, maar ook in oppervlaktewater in Nederland. Aangezien dit rapport gericht is op CPE uit dieren en/of dierlijke producten zullen we hier verder niet op ingaan.

3.1.2 Internationaal

Voor zover bekend (nagevraagd bij de EURL-AR in Lyngby) wordt sinds 2014 in de meeste (EU-)landen alleen een passieve monitoring uitgevoerd, waarbij alle isolaten die verminderd gevoelig worden gevonden voor meropenem als CPE-verdachte isolaten worden beschouwd. Uitzondering hierop zijn enkele landen (zoals o.a. Noorwegen, Zweden en Denemarken) die (zelf) actief screenen op CPE (8-10). Meropenem resistente isolaten worden door het Nationaal Referentie Laboratorium (NRL) doorgestuurd naar het EU-referentie laboratorium (EURL) ter confirmatie. In de literatuur is een aantal publicaties te vinden, waarbij monsters van landbouwhuisdieren onderzocht zijn voor CPE. Deze zijn samengevat in Tabel 1 van de bijlage.

3.2 CPE screening in gezelschapsdieren (UU-FD)

3.2.1 Nationaal

Screening op CPE in gezelschapsdieren wordt uitgevoerd bij de afdeling Klinische Infectiologie van de Faculteit Diergeneeskunde op de Universiteit Utrecht. Vanuit de diagnostiek loopt hier het 'Project monitoring zoönosen gezelschapsdieren' dat is gericht op het volgen van trends en het oppikken van ongebruikelijke signalen betreffende zoönosen en antimicrobiële resistentie bij gezelschapsdieren. De CPE screening loopt parallel aan dit project en wordt prospectief uitgevoerd (waarbij nieuwe isolaten worden onderzocht); er is eenmalig een retrospectieve studie uitgevoerd (waarbij isolaten verkregen in het verleden werden onderzocht).

Voor de CPE screening wordt gescreend voor de aanwezigheid van de genen *bla*_{OXA}, *bla*_{NDM}, *bla*_{VIM}, *bla*_{KPC} en *bla*_{IMP}. De case definitie van een CPE positief isolaat is dat één van deze genen aanwezig is en aangetoond is dat deze op een plasmide ligt.

Retrospectieve passieve CPE screening

Bij de retrospectieve passieve screening is gebruik gemaakt van bacteriële isolaten afkomstig van het Veterinair Microbiologisch Diagnostisch Centrum (VMDC) van de Faculteit Diergeneeskunde. Alle opgeslagen ESBL-verdachte isolaten (op basis van antibiogram), geïsoleerd van 2009 t/m 2015, zijn meegenomen in de CPE screening. Deze zijn afkomstig uit klinische monsters. Alle monsters zijn ingezonden door dierenartspraktijken voor diagnostiek. Indien klinisch geïndiceerd, wordt een antibiogram uitgevoerd voor (potentieel) pathogene bacteriën. Selectiecriteria voor "ESBL-verdacht" is dat de species valt onder Enterobacteriaceae of *Acinetobacter* spp., en de isolaten zijn resistent tegen 3^e generatie cefalosporinen (ceftiofur). De monsters omvatten zeer uiteenlopende matrices, echter de voorname matrices zijn urine en buik- of wondvocht (zie Tabel 3.2.1).

Tabel 3.2.1 Percentage isolaten voor CPE screening per matrix per jaar.

Matrix	2009 (%)	2010 (%)	2011 (%)	2012 (%)	2013 (%)	2014 (%)	2015 (%)
Urine	33	36	58	44	42	59	54
Wond / buikvocht	26	31	12	29	26	12	15
Overig*	40	33	29	27	32	29	31

* Betreft voornamelijk: pus, gal, luchtweg spoeling/swabs, uterus-secreet (paarden), abces, melk (runderen).

Laboratorium methode

Alle ESBL-verdachte stammen worden gescreend d.m.v. disk diffusietest (imipenem (10 mg), ertapenem (10 mg), meropenem (10 mg)). De zones worden geïnterpreteerd zoals beschreven door Cohen-Stuart *et al.*(11). In Tabel 3.2.2 staan de aantallen monsters per diersoort die zijn geïncubeerd voor de CPE-screening (alle ceftiofur resistente isolaten) en het aantal ingezonden monsters voor bacteriologisch onderzoek.

Tabel 3.2.2 Overzicht van aantal ESBL-verdachte monsters (kweek ceftiofur resistente isolaten) meegenomen voor CPE-screening t.o.v. totaal aantal ingestuurde monsters.

	Hond	Kat	Paard	Rund	Overig	Totaal
2009	25 (5333)	8 (1994)	3 (1230)	5 (819)	1 (1642)	42 (11018)
2010	42 (5519)	13 (1948)	11 (918)	0 (409)	1 (1406)	67 (10200)
2011	44 (5839)	11 (1981)	9 (844)	1 (270)	0 (1356)	65 (10290)
2012	50 (5836)	13 (1964)	12 (750)	1 (290)	1 (1737)	77 (10577)
2013	47 (6488)	14 (2053)	6 (622)	1 (240)	1 (2401)	69 (11804)
2014	45 (6826)	10 (2057)	3 (943)	1 (193)	0 (3068)	59 (13087)
2015	28 (6601)	4 (2050)	5 (761)	0 (168)	2 (1962)	39 (11542)
Totaal	281 (42442)	73 (14047)	49 (6068)	9 (2389)	6 (13572)	418 (78518)

(getal) = Aantal monsters ingezonden voor bacteriologisch onderzoek. Dit omvat zowel Gram negatieve als Gram positieve bacteriën.

Actieve CPE screening

De actieve screening is in 2015 en 2016 uitgevoerd op faeces van honden en katten. Voor honden is gebruik gemaakt van dieren die behandeld worden met antibiotica, de week vóór, of op het moment van monsternamen. Dit betrof voornamelijk dermatologiepatiënten, in de 2^e helft van de studie werden ook patiënten van interne geneeskunde geïnculdeerd en faecesmonsters die via het VMDC waren binnen gekomen. Inclusiecriteria was 'behandeling met antibiotica'. Voor katten zijn faecesmonsters van het VMDC gebruikt, zonder verdere selectie. Er is alleen actief gescreend op CPE. Er is verder geen antibiogram voor andere antibiotica ingezet. De aantallen staan in Tabel 3.2.3.

Tabel 3.2.3 Aantal monsters actief gescreend op de aanwezigheid van CPE (aantal positief).

	Hond	Kat
2015	101(0)	201(0)
2016	145 (0)	178 (0)

Faecesmonsters die zijn ingezonden na rekrutering via specialisten dermatologie of interne geneeskunde zijn verzameld door de hondeneigenaar zelf en vervolgens rechtstreeks naar het laboratorium gestuurd voor analyse. Faecesmonsters afkomstig van het VMDC zijn ingezonden voor diagnostiek door dierenartsen verdeeld over Nederland.

Laboratoriummethode actieve CPE screening

Van ieder faecesmonster wordt 0,5 gram afgewogen en gesuspenseerd in 4,5 ml TSB Bouillon met 50 mg/L vancomycine. Vervolgens wordt de suspensie afgeënt op een ChromID Carba-Smart agar (BioMerieux). Deze plaat bestaat uit 2 delen. De ene kant komt overeen met de ChromID Carba agarplaat en kan met name KPC en NDM-

carbapenemases detecteren en de andere kant van de plaat komt overeen met de ChromID OXA-48 agarplaat en is bedoeld voor de detectie van OXA-varianten (zie ook Tabel 5.5.1). De ophopingsbouillon wordt na overnacht incubatie nogmaals afgeënt op de Carba-Smart agar. Daarnaast wordt ook het DNA van de ophoping geïsoleerd en vervolgens gescreend op de aanwezigheid van de belangrijkste carbapenemase genen *bla*_{OXA}, *bla*_{NDM}, *bla*_{VIM}, *bla*_{KPC} en *bla*_{IMP} met behulp van RT-PCR (Check-Points Check-MDR carba kit, zie ook paragraaf 3.1.1).

Resultaat actieve en passieve CPE screening in gezelschapsdieren

Alle gescreende isolaten uit de actieve en de passieve screening waren negatief voor carbapenem resistentie.

3.2.2 *Internationaal*

Voor zover bekend zijn er geen actieve monitoringsprogramma's voor CPE in gezelschapsdieren internationaal. Er zijn wel verschillende studies beschreven waar werd gescreend voor CPE in gezelschapsdieren. In enkele studies zijn positieve isolaten gevonden. Deze studies zijn samengevat in Tabel 2 van de bijlage.

3.3 CPE screening in veterinaire pathogenen (landbouwhuisdieren) (GD)

3.3.1 *Beschrijving AR monitoring dierlijke pathogenen*

Monsters voor bacteriologisch onderzoek

De Gezondheidsdienst voor Dieren (GD) ontvangt jaarlijks tienduizenden monsters voor bacteriologisch onderzoek. Dit aantal is exclusief monsters verzameld in het kader van projecten. Het betreft hoofdzakelijk materiaal van zieke dieren, maar in het kader van monitoringprogramma's wordt ook materiaal ingestuurd van niet-zieke dieren. Het betreft verschillende matrices, zoals melk, faeces en orgaanmateriaal, afkomstig van verschillende diersoorten. Daarnaast worden ook water- en omgevingsmonsters ingestuurd voor bacteriologisch onderzoek.

Post mortem monsters

Het aantal runderen, kleine herkauwers, varkens en koppels pluimvee dat de afgelopen vijf jaar is aangeboden voor pathologisch onderzoek is samengevat in Tabel 3.3.1. Tevens is in deze tabel het aantal bedrijfsbezoeken per jaar opgenomen. Van de dieren aangeboden voor pathologisch onderzoek wordt van circa 70% materiaal verzameld voor bacteriologisch onderzoek. Jaarlijks zijn dit in totaal circa 15.000 monsters. Ongeveer 40% betreft materiaal van varkens, 30% van runderen en 20% van pluimvee. De rest is vooral afkomstig van schapen, geiten en gezelschapsdieren.

Tabel 3.3.1 Aantal secties en bedrijfsbezoeken uitgevoerd door GD per jaar.

Jaar	Rundvee		Kleine herkauwers	
	Secties	Bedrijfs-bezoeken	Secties	Bedrijfs-bezoeken
2011	2.664	269	789	358
2012	2.905	226	696	569
2013	3.291	216	549	290
2014	3.104	244	552	291
2015	2.852	184	505	255

Jaar	Varken		Pluimvee*	
	Secties	Bedrijfs-bezoeken	Secties	Bedrijfs-bezoeken
2011	3.341	52	1.430	43
2012	2.975	53	1.450	54
2013	3.131	45	1.138	56
2014	3.216	30	974	46
2015	2.528	27	1.087	33

*Koppels

Overig materiaal

Jaarlijks worden ruim 40.000 melkmonsters bacteriologisch onderzocht. Daarnaast worden bijna 15.000 andere monsters afkomstig van runderen opgestuurd voor bacteriologisch onderzoek:

- Circa tweederde hiervan betreft faecesmonsters waarvan de helft verzameld is van niet zieke runderen voor het opsporen van Salmonella dragers;
- De resterende monsters bestaan met name uit preputiaal (=voorhuid) spoelsels en longspoelingen.

Van schapen, geiten, paarden en gezelschapsdieren worden jaarlijks circa 100 tot 250 monsters per diersoort ingestuurd voor bacteriologisch onderzoek. Daarnaast worden maandelijks tankmelkmonsters ontvangen van alle circa 380 melk leverende schapen- en geitenbedrijven. Het aantal ingestuurde monsters verzameld van varkens betreft jaarlijks circa 1500, waarvan ongeveer tweederde faecesmonsters en verder zijn het vooral neus- en keelwabs. In principe is het materiaal afkomstig van zieke dieren, maar dit wordt niet altijd aangegeven bij de inzendingen.

Materiaal ingestuurd van pluimvee betreft jaarlijks circa 16.000 monsters voor bacteriologisch onderzoek, voornamelijk voor onderzoek op Salmonella (veelal faeces).

De aantallen zijn samengevat in Tabel 3.3.2.

Tabel 3.3.2 Aantal ingestuurde monsters per jaar (bij benadering).

Diersoort	Soort monster	Aantal
Rund	Melkmonsters	40.000
	Faeces	10.000
	Voornamelijk preputiaalspoelsels/longspoelingen	5.000
Schapen	Niet gespecificeerd	100 - 250
Geiten	Niet gespecificeerd	100 - 250
Paarden	Niet gespecificeerd	100 - 250
Gezelschapsdieren	Niet gespecificeerd	100 - 250
Varkens	Faeces	1000
	Voornamelijk neus- en keelwabs	500
Pluimvee	Voornamelijk faeces voor Salmonella onderzoek	16.000

Antibioticumgevoeligheid veterinaire pathogenen

Het antibioticumgevoeligheidsonderzoek dat volgt op de kweek, helpt de dierenarts in het veld een onderbouwde keuze te maken voor een bepaald antibioticum ter behandeling van de betreffende bacteriële infectie. Met de resultaten van alle uitgevoerde gevoeligheidsbepalingen kan over langere perioden de ontwikkeling van de gevoeligheidspatronen van bacteriën worden gevolgd. Deze (overzichten van) gevoeligheidspatronen worden onder andere gebruikt bij het opstellen van de KNMvD-formularia en worden jaarlijks gerapporteerd in de GD Monitoringsrapportage. Het is belangrijk te beseffen dat de onderzochte isolaten afkomstig zijn van dieren die gestorven/geëthanaseerd zijn (isolaten uit materiaal van dieren die voor pathologisch onderzoek zijn aangeboden) of klinisch ziek waren (overige isolaten) en dat daardoor de weergegeven resistentiepercentages niet noodzakelijk representatief zijn voor de gehele Nederlandse veehouderij. Ook is meestal niet bekend of de isolaten afkomstig zijn van behandelde of onbehandelde dieren. Vanaf het vierde kwartaal van 2012 wordt voor het bepalen van de gevoeligheid van bacteriën voor antibiotica gebruik gemaakt van een microbouillonverduunningsmethode, waarmee per antimicrobieel middel een MIC-waarde wordt bepaald. Met behulp van klinische breekpunten worden de isolaten op basis van de vastgestelde MIC-waarden ingedeeld in klinisch gevoelige, intermediair-gevoelige en resistente isolaten. De antibioticumpanelen zijn zodanig samengesteld dat ze zo goed mogelijk aansluiten bij de KNMvD formularia: een panel voor Gram-positieve mastitisverwekkers, voor Gram-negatieve mastitisverwekkers, voor Gram-positieve ziekteverwekkers geïsoleerd uit materialen anders dan melk en voor Gram-negatieve ziekteverwekkers uit materialen anders dan melk. Gram-negatieve isolaten worden standaard gescreend op ESBL-productie door het bepalen van de MIC-waarde van cefotaxime. De panelen bevatten geen antibiotica waarmee specifiek wordt gescreend op aanwezigheid van carbapenemase activiteit. Jaarlijks worden meer dan 8500 antibiogrammen gemaakt (exclusief isolaten uit projectmonsters): circa 6000 van runderisolaten, waarvan ongeveer driekwart mastitisverwekkers, 1800 van varkensisolaten, 150 van geiten- en schapenisolaten, 60 van isolaten uit paarden en 600 uit pluimvee (zie Tabel 3.3.3).

Tabel 3.3.3 Gemiddeld aantal isolaten per diersoort per jaar die getest worden voor hun gevoeligheid voor antibiotica (betreft Gram-positieve en Gram-negatieve isolaten).

Diersoort	Soort isolaat	Gemiddeld aantal per jaar
Rund	Mastitisverwekkers	4000
	Anders	2000
Varkens	Niet gespecificeerd	1800
Geiten/Schape	Niet gespecificeerd	150
Paarden	Niet gespecificeerd	60
Pluimvee	Monitoringspilot	500
	Anders	600

Daarnaast worden in het kader van een monitoringspilot van GD door verschillende dierenartsenpraktijken pluimvee isolaten ingestuurd voor een MIC-bepaling. Doel van deze pilot is het ontwikkelen van een systematiek waarmee de pluimveedierenarts beschikt over actuele, landelijk betrouwbare gegevens over de gevoeligheden voor verschillende antibiotica van de meest voorkomende pluimveepathogenen in de vlees- en recent ook de legsector: *E. coli*, *Enterococcus* spp. en *Staphylococcus aureus*. De bacteriën zijn verzameld uit koppels met specifieke ziekteverschijnselen, zoals verhoogde uitval en kreupelheid en door de praktijk geïdentificeerd als één van de bovenstaande bacteriesoorten. Jaarlijks betreft dit circa 500 isolaten.

Een actieve screening van het eigenlijke monstermateriaal op ESBL-producerende *Enterobacteriaceae* heeft alleen plaatsgevonden in het kader van projecten. Tot dusverre zijn geen monsters, noch isolaten gescreend op carbapenemresistentie resp. carbapenemase productie.

3.4 CPE screening in vlees (NVWA)

3.4.1 Nationaal

Bij de Nederlandse Voedsel- en Warenautoriteit (NVWA) wordt vlees onderzocht in het kader van antimicrobiële resistentie monitoring in vlees afkomstig uit de detailhandel van kippen, kalveren, runderen, varkens, lammeren en kalkoenen (en incidenteel van exotische dieren zoals krokodillen en struisvogels) beschreven in EU Directive 2003/99/EC9, besluit 2013/652/EU. Dit gebeurt, net als de screening in dieren beschreven in H3.1 volgens EFSA-richtlijnen (5). De vleesmonsters zijn afkomstig uit de Nederlandse detailhandel. Het betreft monsters van vers vlees en daar waar aangegeven ook bewerkte producten. Uit het vlees worden *E. coli* isolaten geïsoleerd als representant van de Gram-negatieve flora aanwezig op het vlees. Er vindt tot op heden (2016) alleen een passieve CPE screening plaats in vlees dat in de Nederlandse winkels ligt. In het advies carbapenem resistentie uit 2014 is vastgelegd dat een actieve screening op CPE alleen risico-gebaseerd zal gebeuren (1). Met andere woorden als er aanwijzingen zijn dat er mogelijk carbapenem resistente bacteriën aanwezig kunnen zijn op vlees (doordat dit bijvoorbeeld in andere landen is gevonden of in de veestapel in Nederland danwel in het buitenland) zal begonnen worden met het gericht onderzoeken van vlees

op de aanwezigheid van bacteriën die resistent zijn voor carbapenem antibiotica. Tot op heden is dit niet het geval geweest. Wel wordt er sinds 2012 actief gescreend op de aanwezigheid van ESBL-producerende *E. coli* en deze screening wordt gebruikt om de gevonden ESBL-isolaten ook te testen op hun gevoeligheid voor carbapenems. De passieve monitoring in producten is conform EU besluit 652.2013/EU (ESBL- of AmpC- of carbapenemase-producerende *E. coli* in vlees). Al het onderzoek wat daar buiten valt (zoals bijvoorbeeld de actieve screening naar ESBL producerende *E. coli*) wordt betaald door het Ministerie van Volksgezondheid, Welzijn en Sport.

Passieve screening op ESBL-producerende Enterobacteriaceae en CPE in vlees

Per vleesmonster wordt 25 gram vlees onderzocht. In 2012 en 2013 werd 25 gram vlees gespoeld met 225 ml gebufferd pepton water (BPW). 10 ml van het spoelsel werd in 90 ml MacConkey-, of laurylsulfaat bouillon gebracht. Na overnacht incubatie bij 44°C wordt 10 µl van de bouillon afgeënt op Coli-ID agar (BioMerieux). Dit wordt 24 uur bij 44°C bebroed. Vanaf 2014 wordt een 1:10 verdunning in fysiologisch zout van het vlees gemaakt. Vervolgens wordt 10 ml hiervan bij 90 ml MacConkey bouillon gebracht en 22 ±2 uur bebroed bij 44±0,5°C. Dit wordt afgestreken op TBX agar (BioTrading) en 24 uur bebroed bij 44±0,5°C. *E. coli* verdachte isolaten worden bevestigd voor *E. coli* species m.b.v. indoltest. Van één isolaat per monster wordt de gevoeligheid voor een panel antibiotica bepaald met behulp van een microbouillon verdunningstest (Sensititre EUVSEC) om de MIC vast te stellen. Zoals beschreven in H3.1 bevat dit antibioticapanel sinds 2014 ook meropenem. In 2012 en 2013 werden cefotaxime resistente isolaten verder onderzocht op carbapenem resistentie met behulp van een disk diffusietest met imipenem, ertapenem en meropenem. Sinds 2014 worden isolaten resistent tegen cefotaxime, ceftazidime en/of meropenem in een vervolg panel antibiotica verder onderzocht (Sensititre EUVSEC2). Dit panel is verder uitgebreid met verschillende cefalosporines en carbapenem antibiotica (meropenem, ertapenem en imipenem). Verdachte ESBL en/of CPE isolaten worden voor moleculaire bevestiging naar WBVR in Lelystad gestuurd.

In de afgelopen drie jaar ging het bij *E. coli* om de aantallen zoals vermeld in Tabel 3.4.1. In de tabel zijn ook de aantallen cefotaxime en/of ceftazidime resistente isolaten in relatie tot het totaal aantal geteste isolaten aangegeven. Dit zijn allemaal monsters genomen van vers vlees dat bewerkt (zoals gemalen, gekruid of behandeld met een kiemreducerende behandeling zoals verhitten of drogen) en onbewerkt kan zijn. Sinds het begin van de screening zijn geen CPE verdachte isolaten gevonden.

Tabel 3.4.1 Overzicht totaal aantal vleesmonsters onderzocht voor algemene monitoring antimicrobiële resistente bacteriën per jaar (*E. coli*). En aantal ESBL-verdachte isolaten (cefotaxime en/of ceftazidime resistent) van het totaal per diersoort die verder onderzocht zijn voor carbapenem resistentie (**passieve CPE screening**).

	Soort vlees	Kalf	Rund	Varken	Lam	Kip	Kalkoen
2012	vers	14	40	54	21	158	25
	Bereiding	4	83	44	6	17	4
	ESBL/tot(%)	0/18 (0%)	2/123 (2%)	1/98 (1%)	0/27 (0%)	14/175 (8%)	1/29 (3%)
2013	vers	7	68	75	10	390	44
	Bereiding	12	180	81	4	86	10
	ESBL/tot(%)	0/19 (0%)	6/248 (2%)	2/156 (1%)	0/14 (0%)	51/476 (11%)	2/54 (4%)
2014	Vers	9	111	141	9	529	44
	Bereiding	10	259	190	9	2	0
	ESBL/tot(%)	0/19 (0%)	10/370 (3%)	3/331 (1%)	1/18 (1%)	16/531 (3%)	3/44 (7%)
2015	vers	6	137	119	16	563	77
	Bereiding	0	0	0	0	35	3
	ESBL/tot(%)	0/6 (0%)	4/137 (3%)	2/119 (2%)	0/16 (0%)	30/598 (5%)	2/80 (3%)

Passieve CPE screening Salmonella uit vlees

Monitoring voor antimicrobiële resistentie in Salmonella wordt uitgevoerd waar mogelijk volgens EFSA richtlijnen. EFSA schrijft voor om Salmonella-isolaten uit nationale controleprogramma's te analyseren aangevuld met screening op Salmonella in slachthuizen op karkassen van vleeskuikens, kalkoenen, varkens en kalveren jonger dan 1 jaar (5). Voor ESBLs betreft het alleen een passieve screening, waarbij alle ceftazidime en/of cefotaxime resistente isolaten verder moleculair onderzocht worden bij het RIVM of WBVR. Net als de *E. coli* isolaten worden de Salmonella-isolaten sinds 2012 ook standaard onderzocht op resistentie tegen carbapenem antibiotica, zoals beschreven bij *E. coli*. De Salmonella resultaten beschreven in H3.1 betreft voor een deel ook vleesproducten (kip) (zie Tabel 3.1.2 en 3.1.4).

Actieve monitoring ESBL producerende E. coli in vlees

Sinds 2012 wordt er ook actief gescreend op de aanwezigheid van ESBL-producerende bacteriën in vlees. De aantallen vleesmonsters, die actief gescreend worden op de aanwezigheid van ESBL-producerende *E. coli* bacteriën zijn weergegeven in Tabel 3.4.2.

Tabel 3.4.2 Aantal ESBL bevestigde monsters per totaal aantal vleesmonsters onderzocht d.m.v. **actieve ESBL monitoring** (*E. coli*). Tussen haakjes het percentage ESBL bevestigde monsters (ref. Nethmap/MARAN).

	Soort vlees	Kalf	Rund	Varken	Lam	Kip	Kalkoen
2012	Vers+ bewerkt	-	17/265 (6%)	3/298 (1%)	-	138/188 (73%)	8/28 (29%)
2013	Vers+ bewerkt	-	20/408 (5%)	11/695 (2%)	-	112/728 (83%)	16/80 (35%)
2014*	vers	2/16 (3%)	36/403 (2%)	85/757 (3%)	0/31 (0%)	376/526 (67%)	19/35 (51%)
	bewerkt	4/13 (21%)	59/514 (8%)	32/549 (4%)	0/17 (0%)	-	-
	import	-	-	-	-	38/39 (84%)	7/9 (58%)
2015	vers	0/21 (0%)	8/467 (2%)	6/779 (0,8%)	1/47 (2%)	231/587 (39%)	18/80 (23%)
	bewerkt	1/26 (4%)	28/585 (5%)	8/559 (1%)	0/26 (0%)	290/674 (43%)	2/12 (17%)
	import	-	-	-	-	26/43 (61%)	2/3 (67%)

*aantal **verdachte** (niet bevestigde) monsters t.o.v. totaal geteste monsters, tussen haakjes percentage **bevestigde** monsters; - niet meegenomen in monitoring.

Voor de actieve screening op ESBL-producerende *E. coli* bacteriën in vlees werd van 2012 t/m 2014 25 gram vlees gebracht in 225 ml Luria Bertani bouillon (LB) met 1 mg/L cefotaxime. Deze werd 22 uur±2 uur geïncubeerd bij 44 °C±0,5°C. In 2015 is overgestapt op een incubatie van 18-22 uur bij 37°C in een niet selectief ophopingsmedium (BPW). Na incubatie wordt 10 µl afgeënt op MacConkey agar plaat met 1 mg/L cefotaxime. Deze wordt 22 uur±2 uur bebroed bij 44 °C±0,5°C. *E. coli* verdachte isolaten worden bevestigd.

Alle ESBL-isolaten worden vervolgens getest op carbapenemase productie door middel van een disk diffusietest (alleen in 2012) en MIC bepalingen met Sensititre panel EUVSEC2 (sinds 2013). Onder deze isolaten is geen enkel isolaat gevonden dat ook resistent was tegen carbapenems. De gevonden ESBL-verdachte isolaten zijn naar WBVR gestuurd voor moleculaire typering.

3.4.2 Internationaal

Voor zover bekend wordt op dit moment (sinds 2014) in de meeste (EU-)landen alleen een passieve monitoring uitgevoerd, waarbij alle isolaten die verminderd gevoelig worden gevonden voor meropenem als CPE-verdachte isolaten worden beschouwd. Dit is vergelijkbaar met de internationale screening beschreven voor landbouwhuisdieren in paragraaf 3.1.2.

3.5 CPE screening in import vis en kruiden (NVWA)

3.5.1 Nationaal – actief

In verschillende projecten heeft de NVWA in de afgelopen jaren actief d.m.v. een selectieve kweekmethode gekeken naar CPE in andere producten dan vlees. Het betreft hierbij Aziatische kruiden in 2012, import kruiden in 2013 t/m 2015, import kweekvis in 2015 en tropische

garnalen in 2016. De monsters zijn actief onderzocht op cefotaxime en carbapenem resistente isolaten volgens de opgestelde EURL-AR protocollen (<http://eurl-ar.eu/233-protocols.html>) voor ESBL en carbapenemase detectie, zie ook H3.1.1. Verdachte isolaten worden d.m.v. moleculaire technieken bij WBVR of RIVM bevestigd. In Tabel 3.5.1 zijn de aantallen monster, die getest zijn voor ESBL en CPE opgenomen en het aantal ESBL-verdachte monsters. Tot nu toe is geen enkel monster positief bevonden voor CPE (resultaten niet opgenomen in Tabel 3.5.1).

*Tabel 3.5.1 Aantal ESBL verdachte monsters per totaal aantal monsters (kruiden/vis/garnalen) onderzocht d.m.v. **actieve ESBL** monitoring (*E. coli*).*

Jaar	Aziatische kruiden	Import kruiden	Import kruiden vers	Import kweekvis	Tropische garnalen
2012	6/130	-	-	-	-
2013	-	2/45	14/91	-	-
2014	-	21/30	-	-	-
2015	-	10/38	-	6/197	-
2016	-	-	-	-	0/13

*Opmerking: Zelfde aantallen zijn ook **actief op CPE** onderzocht, maar daarvan was geen enkel monster CPE positief.*

4 Berekening detectielimieten

Sinds de screening op CPE is gestart in Nederland is geen enkel positief monster gevonden. De puntschatter voor de CPE prevalentie is dan ook 0, maar het is belangrijker ook de betrouwbaarheid van deze schatting te kennen. Daarvoor wordt de bovengrens van het eenzijdig 95% betrouwbaarheidsinterval berekend die in dit rapport de detectielimiet genoemd wordt. In dit hoofdstuk wordt verder uitgelegd welke aannames bij de berekening van de detectielimiet zijn gebruikt, hoe deze verder is berekend en wat de uitkomsten zijn voor de verschillende monitoringsprogramma's.

Aannames

1. De geteste monsters zijn representatief voor de onderliggende populatie. Dit betekent dat de monsters gespreid over het jaar, over Nederland en over batches/bedrijven genomen zijn.
2. De onderliggende populatie is veel groter dan het aantal geteste monsters.
3. De testspecificiteit is 100%: bij een positieve uitslag sluit een serie vervolgtesten de mogelijkheid voor een vals positieve uitslag uit.
4. Voor de passieve monitoring is aangenomen dat alleen werkelijk positieve monsters met cefotaxime/meropenem resistente *E. coli* ook CPE-positief kunnen zijn.
5. In de berekeningen in dit rapport wordt aangenomen dat de sensitiviteit van de gebruikte RT-PCR test om CPE te detecteren, 90% is, sensitiviteit van een gevoeligheidstest (fenotypische test) op CPE 85% is en de sensitiviteit om een cefotaxime/meropenem resistent isolaat te detecteren op een niet-selectieve plaat 0.1% is, op een selectieve plaat 99,9% en de detectie van CPE's op een selectieve plaat (ChromID OXA-48) 75.8% is (zie ook Tabel 4.1).

Tabel 4.1 Gebruikte sensitiviteiten bij detectielimiet berekeningen.

Monitorings programma	Direct	Tweetraps Stap 1	Stap 2	Tabel
Passieve screening landbouwhuisdieren (WBVR)		0,1% ³	85% ⁵	3.1.7
Actieve screening landbouwhuisdieren (WBVR)	90% ¹			3.1.8
Passieve screening gezelschapsdieren (FD)		0,1% ³	85% ⁵	3.2.3
Actieve screening gezelschapsdieren (FD)	90% ¹			3.2.4
Passieve screening vlees (NVWA)		0,1% ³	85% ⁵	3.4.3
Actieve screening vlees (NVWA)		99,9% ⁴	85% ⁵	3.4.4
Actieve screening import vis en kruiden (NVWA)	75,8% ²			3.5.2

¹RT-PCR voor detectie van bekende, meest voorkomende CPE-genen. De gevoeligheid is onbekend en wordt nog onderzocht. 90% is gebaseerd op het feit dat de RT-PCR niet alle CPE-genen detecteert, maar de meest voorkomende. Mogelijk is de test nog gevoeliger dan hier aangegeven.

² Ophoping en daarna kweek op ChromID Carba en ChromID OXA-48. Deze waarde is uit de literatuur gehaald (zie Tabel 5.5.1)

³ Eén kolonie van een niet-selectieve plaat wordt getest op cefotaxime en/of meropenem resistentie. We weten voor ESBL-producerende *E. coli*, dat als ESBL –producerende *E. coli*'s aanwezig zijn dat ongeveer bij 1 op de 1000 *E. coli*'s een ESBL-producerende *E. coli* is. Daarom gebruiken we hier 0.1% voor de detectie.

⁴ Eén kolonie van een selectieve plaat (MacConkey + cefotaxime) voor detectie van ESBLs. In principe is alles wat groeit op een selectieve plaat resistent tegen cefotaxime en komt bij de 2-traps test in aanmerking om verder te testen voor carbapenemresistentie. Daarom is de waarde 99,9% gebruikt.

⁵ Gevoeligheidstest op carbapenemresistentie. Het is niet bekend hoe gevoelig deze methode is om alle CPE te detecteren. Daar zijn geen gegevens over bekend. We denken dat deze methode ongevoeliger is dan de RT-PCR, omdat niet alle CPE resistent zijn voor de geteste carbapenems. Waarschijnlijk is de methode gevoeliger dan 85%, maar omdat data ontbreekt, houden we deze waarde aan.

Actieve monitoring

In een actief monitoringsprogramma wordt een steekproef van n monsters direct getest op CPE met een testsensitiviteit van se . Als geen enkel monster positief wordt bevonden ($t=0$) is de kans op deze observatie:

Vergelijking 1:

$$p(T = 0) = \sum_{i=0}^n \binom{n}{i} q^i (1-q)^{n-i} (1-se)^i = (1-qse)^n$$

waarin q de werkelijke prevalentie is. Deze kans sommeert alle mogelijkheden dat er i werkelijk positieve monsters in de steekproef n zitten maar dat die door de niet-perfecte testsensitiviteit se vals negatief testen. Het aantal werkelijk positieve monsters i in de steekproef is binomiaal verdeeld (wegens aanname 2) en de kans dat ze allemaal vals negatief testen is $(1-se)^i$.

Het 95% betrouwbaarheidsinterval omvat alle waarden van q waarbij de kans op 0 positieve uitslagen 5% of groter is. De detectielimiet q_{det} is de bovengrens van dat interval en wordt berekend met:

Vergelijking 2:

$$(1 - q_{det} se)^n = 0.05 \leftrightarrow q_{det} = \frac{1 - 0.05^{1/n}}{se}$$

De kans dat de werkelijke prevalentie groter is dan deze detectielimiet is 5% of minder. Als bijvoorbeeld 300 monsters getest worden met een sensitiviteit van 90% en 0 positief worden gevonden is de detectielimiet 1.1%. Merk op dat de detectielimiet onafhankelijk is van de grootte van de onderliggende populatie. Het maakt dus niet uit of de steekproef van 300 monsters uit 1 miljoen of 10 miljoen dieren is genomen. De detectielimiet blijft gelijk, maar de interpretatie in absolute aantallen verschilt: met 95% zekerheid is het aantal CPE-positieve dieren in Nederland minder dan 11000 (1.1% van 1 miljoen) of 110000 (1.1% van 10 miljoen).

Passieve monitoring

In het huidige passieve monitoring programma worden n_{tot} monsters eerst getest op de aanwezigheid van cefotaxime (en sinds 2013 meropenem) resistente *E. coli*. Alleen de n positieve en -verdachte monsters met deze resistente *E. coli*'s worden vervolgens met RT-PCR

getest op de aanwezigheid van (bekende en meest voorkomende) CPE-genen. Omdat we ervan uitgaan dat werkelijk negatieve monsters met deze resistente *E. coli*'s ook geen CPE kunnen produceren (aanname 4), kan de verhouding n/n_{tot} gebruikt worden in de detectielimietberekening. Deze aanname is niet geheel juist. Er zijn isolaten die carbapenemases produceren beschreven, die toch nog gevoelig zijn voor cefotaxime en/of meropenem (sommige OXA-varianten), echter deze worden hier buiten beschouwing gelaten. Hierbij moet wel rekening gehouden worden met de sensitiviteit se_{ESBL} om cefotaxime en/of meropenem resistente *E. coli*'s te detecteren in de eerste test.

Vergelijking 3:

$$q_{\text{det}}^{\text{passief}} = \frac{\min\left(\frac{n}{se_{\text{ESBL}}}, n_{\text{tot}}\right)}{n_{\text{tot}}} q_{\text{det}} = \frac{\min\left(\frac{n}{se_{\text{ESBL}}}, n_{\text{tot}}\right)}{n_{\text{tot}}} \frac{1 - 0.05^{1/n}}{se}$$

Omdat voor de eerste test op cefotaxime/meropenem resistentie één kolonie van een niet-selectieve plaat wordt gebruikt is de sensitiviteit se_{ESBL} erg laag; in het rapport zal 0.1% gebruikt worden. In veel gevallen (als $n/se_{\text{ESBL}} > n_{\text{tot}}$) betekent dat dat de eerste term 1 is en de detectielimiet $q_{\text{det}}^{\text{passief}}$ reduceert tot q_{det} .

4.1 Detectielimieten CPE screening landbouwhuisdieren

4.1.1 Passieve CPE screening in landbouwhuisdieren

Zoals eerder beschreven in paragraaf 3.1.1 bestaat de passieve screening uit een 2-trapstest, waarbij eerst de isolaten die verkregen worden bij de monitoring voor antibioticaresistentie in dieren, die resistent zijn voor cefotaxime (voor detectie van ESBLs) en/of meropenem in een tweede stap extra onderzocht worden op resistentie voor carbapenem antibiotica. De eerste stap heeft een lage testgevoeligheid voor het vinden van cefotaxime en/of meropenem resistentie (0,1%), omdat at random één kolonie getest wordt voor deze antibiotica, afkomstig van een niet-selectieve plaat. De lage testgevoeligheid om cefotaxime en/of meropenem resistentie te detecteren van 0.1% betekent dat voor elk ESBL-verdacht isolaat er 999 werkelijk cefotaxime/meropenem resistente isolaten gemist zijn. De niet al te grote aantallen geteste isolaten per diergroep per jaar, zorgen ervoor dat alleen de isolaten die getest worden in de PCR iets kunnen zeggen over de detectielimiet ($q_{\text{det}}^{\text{passief}}$ reduceert tot q_{det}). Omdat die aantallen erg klein zijn, zijn de berekende detectielimieten erg hoog (zie Tabel 4.1.1). Bij slechts 1 getest isolaat (bijvoorbeeld bij melkkoeien in 2012) is de detectielimiet zelfs 1. Wat betekent dat met een kans van 95% de prevalentie lager is dan 100% en dus niet zoveel informatie geeft. Omdat bij vleeskuikens relatief veel cefotaxime resistente isolaten worden getest, hebben die daardoor (contra intuïtief) juist een lagere detectielimiet, nl. 0,17 in 2012, dat betekent dat met een kans van 95% de prevalentie lager is dan 17%. Om een beeld te krijgen bij de getallen zijn (waar bekend) de aantallen slachtdieren weergegeven. De detectielimiet voor bijvoorbeeld vleeskuikens in 2015 is 0,29, dit betekent dat met de passieve CPE screening met 95% betrouwbaarheid in minder dan 29% van 591 miljoen slachtdieren (=171 miljoen dieren) CPE aanwezig is.

Tabel 4.1.1 Detectielimiet (bovengrens eenzijdig 95% betrouwbaarheidsinterval) uit **passieve CPE monitoring** met sensitiviteiten van 0,1% om cefotaxime/meropenem resistentie te detecteren en 85% om CPE te detecteren in landbouwhuisdiermonsters (data uit Tabel 3.1.1 en 3.1.3).

	VV	Vka	MK	VKu	LK	K
Aantal slachtdieren (peiling 2015, x1000)	15.481	1,8	0,1	591.574	nb	nvt
2012	np	0,91	1	0,18	nvt	1
2013	0,53	1	np	0,37	nvt	nvt
2014	0,91	0,74	1	0,28	1	nvt
2015	1	np	1	0,30	nvt	nvt

VV: Vleesvarkens; Vka: Vleeskalveren; MK: Melkkoeien; VKu: Vleeskuikens; LK: Legkippen; K: Kalkoenen

np: not possible (geen ESBL verdachte isolaten), nb: niet bekend

nvt: niet van toepassing (geen screening/slachting in NL)

4.1.2 Actieve CPE screening in landbouwhuisdieren

Voor de actieve monitoring geldt dat de gevoeligheid van de test toeneemt, doordat gericht gekeken wordt naar carbapenemase genen. De precieze gevoeligheid van de test is onbekend, maar wordt geschat op 90%. Daarmee worden de detectielimieten een stuk lager (zie Tabel 4.1.2). Met de aantallen geteste monsters van rond de 300 per diersoort per jaar, waarin 0 carbapenemase verdachte *E. coli*'s worden gevonden leidt dit tot een detectielimiet van rond 0,011. Voor vleeskuiken ligt die iets lager (0,0083). Dat betekent dat voor de 591 miljoen vleeskuikens in 2015 in Nederland de kans dat minder dan 4,9 miljoen vleeskuikens CPE bij zich dragen 95% is. De kans dat dit meer is, is 5%. Dus door actief te screenen kun je de 95% betrouwbaarheid die eerst lag bij minder dan 171 miljoen dieren verlagen naar minder dan 4,9 miljoen dieren, die mogelijk CPE drager zijn.

Tabel 4.1.2 Detectielimiet (bovengrens eenzijdig 95% betrouwbaarheidsinterval) uit **actieve CPE monitoring** met sensitiviteit van 90% om CPE te detecteren in landbouwhuisdiermonsters (data uit Tabel 3.1.5 en 3.1.6).

	Vlees- varkens	Vlees- kalveren	Melk- koeien	Vlees- kuikens	Legkippen	Kalkoenen
Aantal slachtdieren (peiling 2015, x1000)	15.481	1,8	0,1	591.574	nvt	nvt
2012	nvt	nvt	nvt	nvt	nvt	nvt
2013	0,011	0,010	0,012	0,0067	nvt	nvt
2014	0,0085	0,011	0,012	0,0088	0,017	nvt
2015	0,011	0,011	0,011	0,0083	nvt	nvt

nvt: niet van toepassing (geen screening)

4.2 Detectielimieten CPE screening gezelschapsdieren

4.2.1 Passieve CPE screening in gezelschapsdieren

Net als bij de passieve screening in landbouwhuisdieren (paragraaf 4.1.1) geldt hier dat de detectielimiet vooral bepaald wordt door de aantallen geteste isolaten in de RT-PCR en niet door de aantallen ESBL-

verdachte isolaten. Daardoor zijn detectielimieten voor honden waar jaarlijks rond de 50 ESBL-verdachte isolaten op CPE worden getest, lager dan voor de andere diergroepen (zie Tabel 4.2.1). In 2015 geldt dat met de passieve screening aangetoond kan worden dat met 95% kans het CPE-dragerschap minder is dan 180.000 honden, 1,6 miljoen katten en 62.540 paarden.

Tabel 4.2.1 Detectielimiet (bovengrens eenzijdig 95% betrouwbaarheidsinterval) uit **passieve CPE monitoring** met sensitiviteiten van 0,1% om ESBL-verdachte isolaten te detecteren en 85% om CPE te detecteren (data uit Tabel 3.2.2).

	Hond	Kat	Paard	Rund	Overig
Aantal dieren in 2015 (x1000)	1.500¹	2.600¹	118²	4.315³	Niet bekend
2009	0,13	0,37	0,74	0,53	0,61
2010	0,081	0,24	0,28	np	0,71
2011	0,077	0,50	0,33	1	np
2012	0,068	0,24	0,26	1	0,58
2013	0,073	0,23	0,46	1	0,42
2014	0,076	0,30	0,74	1	np
2015	0,12	0,62	0,53	np	0,91

np: not possible (geen ESBL verdachte isolaten)

¹ (12)² statline.cbs.nl ³http://ec.europa.eu/eurostat/data/database

4.2.2 Actieve CPE screening in gezelschapsdieren

Net als bij de actieve monitoring voor CPE in monsters van landbouwhuisdieren geldt dat de gevoeligheid van de test toeneemt door het gericht testen op CPE. Hierdoor neemt de detectielimiet af, waardoor in honden met 95% kans de CPE-prevalentie minder is dan 3,2% (Tabel 4.2.2). In katten ligt de detectielimiet nog iets lager (minder dan 1,6%) door het grotere aantal monsters dat getest is. Dit betekent dat op basis van de actieve monitoring in 2015 met 95% kans het CPE dragerschap minder is dan 48.000 honden en minder dan 41.600 katten. Dus voor honden is dit getal van 180.000 met de passieve screening verkleind naar 48.000 door actief te screenen en voor katten van 1,6 miljoen naar 41.600.

Tabel 4.2.2 Detectielimiet (bovengrens eenzijdig 95% credible interval) uit **actieve CPE monitoring** met sensitiviteit van 90% om CPE te detecteren in honden en katten monsters (data uit Tabel 3.2.3).

	Hond	Kat
Aantal dieren (x1000)	1.500¹	2.600¹
2015	0,032	0,016
2016	0,023	0,019

¹ (12)

4.3 Detectielimieten CPE screening vlees

4.3.1 Passieve CPE screening in vlees

Net als bij de passieve monitoring in landbouwhuisdieren heeft de passieve monitoring in vlees een erg lage gevoeligheid. Ook hier vindt een twee-traps test plaats, waarbij eerst gekeken wordt met een lage

gevoeligheid (geschat op 0,1%, zie Tabel 4.1) voor de detectie van ESBL-producerende *E. coli*. Vervolgens wordt een MIC bepaling uitgevoerd met een gevoeligheid van ongeveer 85% om carbapenem resistentie te vinden. In Tabel 4.3.1 staan de berekende detectielimieten voor de passieve CPE screening in vlees. Ook hier zien we (net als bij de passieve screening in faeces van landbouwhuisdieren) dat de detectielimiet soms oploopt tot 1 (bijv. varkens- en kalkoenvlees in 2012). Dit komt omdat de screening dan is gedaan op slechts 1 ESBL-verdacht isolaat. Bij vlees is het wat moeilijker om de detectielimiet om te zetten in een getal. In Tabel 4.3.1 (en 4.3.2) is ook de vleesproductie in miljoen kilo in 2015 opgenomen. Hiermee is niet bekend hoeveel porties vlees daadwerkelijk in de winkel ligt, aangezien in de winkel niet alleen in Nederland geproduceerde porties liggen en een deel wat in Nederland wordt geproduceerd ook geëxporteerd wordt. Als we dit even buiten beschouwing laten en ervan uitgaan dat de miljoen kilo's weergegeven in Tabel 4.3.1 en 4.3.2 is wat in de Nederlandse winkel ligt, kunnen we per vleessoort een standaard gewicht gebruiken wat door de NVWA getest is. Eén product geselecteerd door de NVWA per vleessoort bedraagt ongeveer 200 gram. Dan kunnen we de aantallen porties uitrekenen en dan weten we wat een detectielimiet betekent. Voor de passieve screening in rundvlees in 2015 is de detectielimiet 0,62. Als we uitgaan van 790 miljoen porties (158 miljoen kilo gedeeld door 200 gram) betekent dit dat voor de passieve screening, waarbij 137 negatieve porties rundvlees zijn gevonden de kans 95% is dat er CPE aanwezig is op minder dan 490 miljoen porties (van 200 gram) rundvlees.

Tabel 4.3.1 Detectielimiet (bovengrens eenzijdig 95% betrouwbaarheidsinterval) uit **passieve CPE monitoring** in vlees met sensitiviteiten van 0,1% om ESBL-verdachte isolaten te detecteren en 85% om CPE te detecteren (data uit Tabel 3.4.1).

	Kalf	Rund	Varken	Lam	Kip	Kalkoen
Vleesproductie in 2015¹ (miljoen kilo)	225	158	1456	nb	834*	nb#
2012	np	0,91	1	np	0,23	1
2013	np	0,46	0,91	np	0,067	0,91
2014	np	0,30	0,74	1	0,20	0,74
2015	np	0,62	0,91	np	0,11	0,91

np: not possible (geen ESBL verdachte isolaten); nb: niet bekend

¹statline.cbs.nl; *data van 2000; # kalkoenen worden niet in Nederland geslacht.

4.3.2

Actieve ESBL screening met CPE screening in vlees

In vlees vindt geen actieve CPE screening plaats. Er vindt wel een actieve ESBL screening plaats en de ESBL-verdachte isolaten worden getest voor carbapenem resistentie. Dit is ook een twee-traps test, waarbij de eerste test met 99,9% ESBLs kan detecteren in een monster en vervolgens kan met een gevoeligheid van ongeveer 85% carbapenem resistentie in een ESBL-verdacht isolaat worden aangetoond. In Tabel 4.3.2. staan de detectielimieten weergegeven voor deze screening in vlees. De detectielimieten worden erg verlaagd t.o.v. de passieve screening door de actieve ESBL-screening te gebruiken, maar is ook afhankelijk van het aantal monsters dat onderzocht is. Waardoor

vleessoorten, waarvan slechts enkele monsters zijn onderzocht een hoge detectielimiet hebben. Voor de actieve screening in rundvlees in 2015 is de detectielimiet voor vers vlees 0,0063. Als we weer uitgaan van 790 miljoen porties, betekent dit dat voor de screening, waarbij een actieve ESBL screening gebruikt wordt de kans 95% is dat er CPE aanwezig is op minder dan 5 miljoen porties (van 200 gram) rundvlees (ter vergelijking: met de passieve screening is dit 490 miljoen porties).

Tabel 4.3.2 Detectielimiet (bovengrens eenzijdig 95% betrouwbaarheidsinterval) uit **actieve ESBL monitoring** in vlees met sensitiviteiten van 99,9% om ESBL-isolaten selectief te kweken en 85% om CPE te detecteren (data uit Tabel 3.4.2).

		Kalf	Rund	Varken	Lam	Kip	Kalkoen
Vleesproductie in 2015¹ (miljoen kilo)		225	158	1456	nb	834*	Nb[#]
2012	Vers+ bewerkt	nvt	0,012	0,0075	nvt	0,019	0,11
2013	Vers+ bewerkt	nvt	0,0080	0,0044	nvt	0,0048	0,040
2014	vers	0,11	0,0084	0,0046	np	0,0067	0,093
	bewerkt	0,19	0,0067	0,0061	np	nvt	nvt
	import	nvt	nvt	nvt	nvt	0,087	0,32
2015	vers	np	0,0063	0,0036	0,021	0,0060	0,041
	bewerkt	0,039	0,0057	0,0053	np	0,0052	0,15
	import	nvt	nvt	nvt	nvt	0,077	0,61

nvt: niet van toepassing (geen screening); nb: niet bekend

¹statline.cbs.nl *not possible (geen ESBL-verdachte isolaten)

*Data uit 2000, #Kalkoenen worden niet in Nederland geslacht.

4.4 Detectielimieten CPE screening in import vis en kruiden

4.4.1 Actieve CPE screening in import vis en kruiden

In de actieve CPE screening in import vis en kruiden wordt selectief gekweekt voor de detectie van CPE. Deze test heeft een gevoeligheid van ongeveer 75,8% en is daarmee iets minder gevoelig dan de RT-PCR gebruikt bij de actieve CPE screening in landbouwhuisdieren en gezelschapsdieren. De detectielimieten worden bepaald door het aantal geteste monsters, daarom is deze in 2014 in importkruiden, waarbij 30 monsters zijn onderzocht, hoger (0,13) dan in 2015 in import kweekvis (0,020) waar 197 monsters zijn onderzocht. Helaas zijn er alleen aantallen bekend van import kweekvis (zie Tabel 4.4.1).

Tabel 4.4.1 Detectielimiet (bovengrens eenzijdig 95% betrouwbaarheidsinterval) uit **actieve CPE monitoring** met sensitiviteit van 75.8% om carbapenemresistentie te detecteren in *E. coli* isolaten (data uit Tabel 3.5.1).

	Aziatisch	Import kruiden	Import kruiden vers	Import kweekvis	Tropische garnalen
Aantallen geïmporteerd in 2013 (in tonnen)	nb	nb	nb	103.107	nb
2012	0,030	-	-	-	-
2013	-	0,085	0,053	-	-
2014	-	0,13	-	-	-
2015	-	0,10	-	0,020	-
2016	-	-	-	-	0,27

Aziatisch: Aziatische kruiden

nb: niet bekend; -: niet onderzocht

4.5 Verlagen detectielimiet

De detectielimieten van de actieve monitoring kan op twee manieren verlaagd worden: ofwel door een grotere steekproef te nemen, ofwel door de testsensitiviteit te verhogen. Doordat de testsensitiviteit in de actieve screening al vrij hoog is (90% aangenomen) wordt zelfs bij een perfecte test (sensitiviteit van 100%) de detectielimiet niet veel verlaagd (Fig. 4.5.1). Een groter aantal dieren bemonsteren heeft een groter effect op de detectielimiet (bij bijvoorbeeld 1000 monsters wordt de detectielimiet $0,003 = 0,3\%$), maar dit wordt beperkter naarmate de steekproefgrootte toeneemt. De detectielimiet gaat asymptotisch naar 0, maar zal deze nooit bereiken.

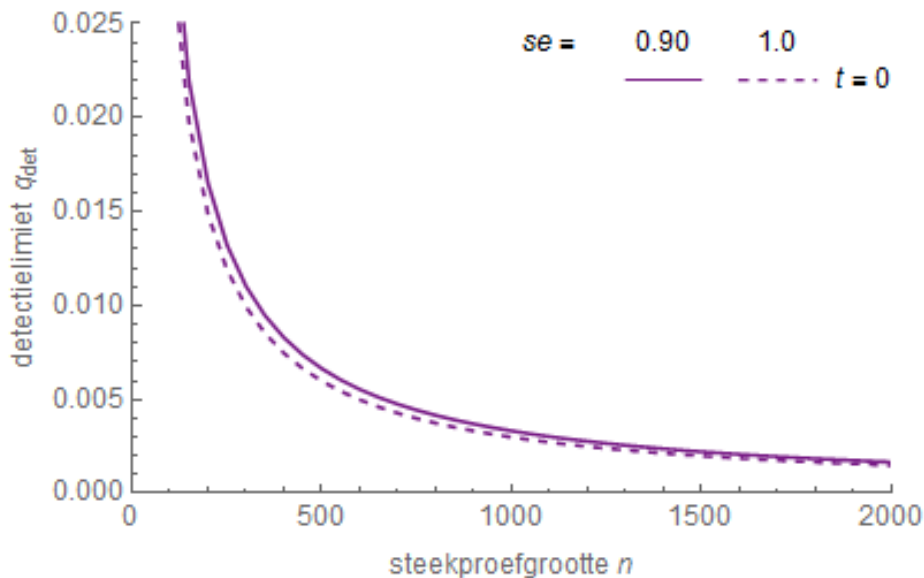


Fig. 4.5.1 Detectielimiet q_{det} als functie van steekproefgrootte n , als geen enkel monster positief wordt gevonden ($t = 0$) voor de aangenomen testsensitiviteit ($se = 0.90$, getrokken lijn) en een perfecte testsensitiviteit ($se = 1$, gebroken lijn).

Als er in de toekomst positieve monsters in de actieve monitoring worden gevonden, betekent dit dat de puntschatter voor de CPE prevalentie niet meer 0 is. De kans om t positieve monsters te vinden in een steekproef van grootte n is binomiaal verdeeld:

Vergelijking 4:

$$p(T = t) = \sum_{i=t}^n \binom{n}{i} q^i (1 - q)^{n-i} \binom{i}{t} se^t (1 - se)^{i-t} = \binom{n}{t} (q se)^t (1 - q se)^{n-t}$$

waarin q de werkelijke prevalentie is. Deze kans sommeert alle mogelijkheden dat er i werkelijk positieve monsters in de steekproef n zitten waarvan er t positief testen en $n-t$ vals negatief. Hierbij kan ook weer de bovengrens van het eenzijdig 95% betrouwbaarheidsinterval uitgerekend worden uit:

Vergelijking 5:

$$\binom{n}{t} (q_{\text{det}} se)^t (1 - q_{\text{det}} se)^{n-t} = 0.05$$

Figuur 4.5.1 kan worden aangevuld met de detectielimieten die gelden wanneer er 1 of meer positieve monsters worden gevonden (Fig. 4.5.2).

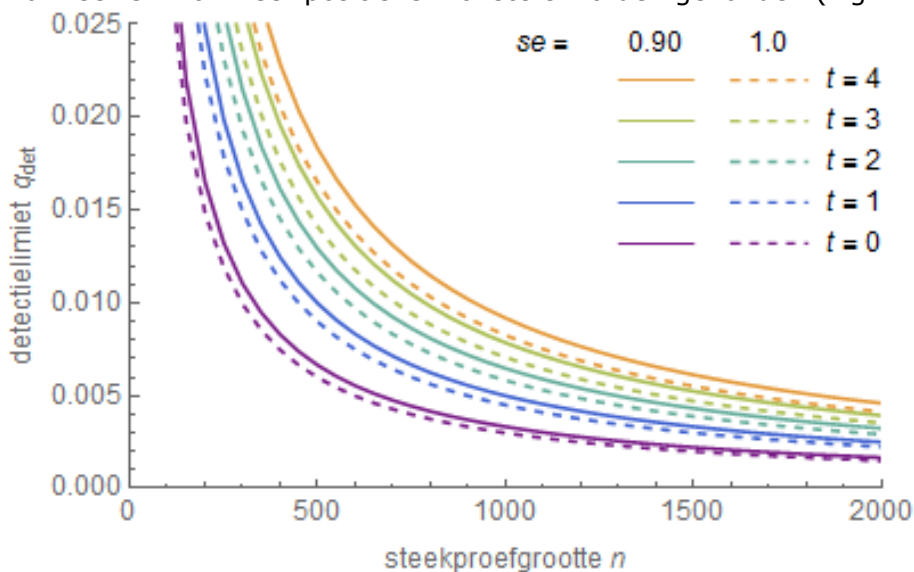


Fig. 4.5.2 Detectielimiet q_{det} als functie van steekproefgrootte n , als er 0, 1, 2, 3 of 4 positieve monsters worden gevonden (verschillende kleuren) voor de aangenomen testsensitiviteit ($se = 0.90$, getrokken lijn) en een perfecte testsensitiviteit ($se = 1$, gebroken lijn).

4.6 Interpretatie detectielimiet

Met het testen van ongeveer 300 dieren per jaar, met een actieve screening, kan een prevalentie van rond de 1% worden opgepikt (met 95% betrouwbaarheid). Voor vlees (waar de gevoeligheid van de test groter is, door de combinatie van een hele selectieve screening op ESBLs, gevolgd door een gevoeligheidstest op carbapenem resistentie) ligt dit over het algemeen onder de 1%, bij gezelschapsdieren (waar minder dieren onderzocht worden) ligt dit rond de 2% en bij import vis en kruiden nog hoger (tot 27%). Het lijkt er echter op dat de prevalentie heel laag is. EFSA definieert een prevalentie als "laag" bij een prevalentie van 0,1% (zie paragraaf 3.1.1). Met de huidige screening

van ongeveer 300 dieren per jaar en een gevoeligheid van de test van 90% is de kans om een lage prevalentie van 0,1% te detecteren 24% (zie *vergelijking 1*). Om de detectiekans te verhogen en deze lage prevalentie op te pikken met 95% betrouwbaarheid zouden meer dan 10 keer zoveel monsters (namelijk 3327) moeten worden onderzocht in de actieve screening.

Inmiddels zijn er gegevens over Duitsland, waarbij in 2015 in de EU monitoring één positief varkensmonster is gevonden (zie paragraaf 5.4). Er waren 212 monsters getest. Als we uitgaan van een prevalentie van $1/212 = 0,5\%$, dan is de kans om deze prevalentie op te pikken door 300 monsters actief te onderzoeken 72%. Om deze prevalentie met 95% zekerheid te kunnen detecteren met een testsensitiviteit van 90%, zouden 707 dieren onderzocht moeten worden.

5 Aanpassing screening voor eerdere detectie CPE in dieren in Nederland

5.1 Actieve/passieve screening

De huidige monitoring op antibiotica resistentie in isolaten van landbouwhuisdieren, gezelschapsdieren en vlees is gericht op het detecteren van verschillen in prevalentie van antibiotica resistentie in de tijd. Uit hoofdstuk 3.1 komt duidelijk naar voren dat de passieve screening in landbouwhuisdieren (dit geldt ook voor de monitoring in gezelschapsdieren en in vlees) tot een hoge maximale detectielimiet voor CPE leidt. Dit heeft te maken met de ongevoeligheid van deze methode om eerst een cefotaxime/meropenem resistent isolaat te detecteren, door een willekeurig *E. coli* isolaat te onderzoeken, waarna pas gekeken wordt of dit isolaat ook resistent is voor (andere) carbapenem antibiotica. Als er weinig cefotaxime/meropenem resistente isolaten uit de eerste screening komen, en dus weinig isolaten verder op CPE gescreend kunnen worden, is de meting erg onbetrouwbaar. Duidelijk is dat de passieve screening niet toereikend is om een lage prevalentie van CPE te kunnen detecteren.

Door gebruik te maken van dezelfde aantallen faeces- en vleesmonsters die nu in de huidige monitoring voor antibioticaresistentie onderzocht worden, maar deze door middel van een gerichte methode (**actieve** screening) te onderzoeken op carbapenem resistentie worden de maximale detectielimieten teruggebracht tot maximale detectielimieten die voor mestonderzoek bij landbouwhuisdieren liggen tussen 0,67 en 1,7 % (zie paragraaf 3.1.2). Duidelijk hierbij is dat een selectieve test die met een hoge gevoeligheid CPE in de monsters kan detecteren van belang is voor het betrouwbaar detecteren van CPE. Daarbij zorgt een **actieve** monitoring voor een verhoging van de kans op het detecteren van CPE. Een punt van aandacht hierbij is wel dat het onbekend is wat de beste manier is om selectief (alle verschillende soorten) CPE te vinden. Hier zal verder op worden ingegaan in paragraaf 5.3 (isolatiemethoden).

5.2 Inventarisatie bestaande monsterstromen

Zoals beschreven in H3 wordt in het kader van monitoring antimicrobiële resistentie in dieren en vlees een steekproef genomen van de Nederlandse veestapel en vleesproducten in de winkel met als doel resistentieniveaus over de tijd te monitoren. Nederland is één van de weinige landen, die naast de reguliere monitoring ook een actieve screening voor CPE uitvoert in zowel landbouwhuisdieren (via de monsters genomen voor de monitoring van resistentie in landbouwhuisdieren) als gezelschapsdieren en in mogelijke risicoproducten, zoals import vis en kruiden. Op dit moment is deze monitoring niet verplicht voor EU-landen. Er zijn een paar landen (o.a. Noorwegen, Denemarken en Zweden (8-10)), die een vergelijkbare CPE-screening uitvoeren in dieren en/of dierproducten.

Ondanks dat Nederland in dit opzicht voorop loopt in vergelijking tot andere EU-landen is de huidige monitoring mogelijk niet voldoende om CPE te detecteren op een moment dat het nog niet wijd verspreid is

onder de veestapel (zie hoofdstuk 3). Ook de huidige screening in gezelschapsdieren is beperkt, met slechts 101 en 145 monsters uit honden en 201 en 178 monsters uit katten in respectievelijk 2015 en 2016 (zie H3.2 en Tabel 4.2.2). Een inventarisatie van bestaande monsterstromen kan inzichtelijk maken waar intensivering van CPE monitoring relatief makkelijk plaats zou kunnen vinden.

Bestaande monitoringsprogramma's in landbouwhuisdieren anders dan de huidige AMR screening

Op dit moment zijn er bestaande programma's voor monsternames in pluimvee, rundvee, schaaap/geit en varken (zie ook Tabel 5.2.1). Ieder moment dat er door een dierenarts monsters op een bedrijf genomen worden, zou dit een potentieel moment kunnen zijn om ook een monster voor CPE onderzoek mee te nemen. Zo geldt voor pluimvee de regeling preventie, bestrijding en monitoring besmettelijke dierziekten, zoonosen en TSEs, waarbinnen regelmatig gemonitord wordt op Salmonella en Mycoplasma in een koppel pluimvee. Dit zou een moment kunnen zijn waarop ook een monster voor CPE detectie wordt meegenomen. Zeker de monitoring op Salmonella biedt mogelijkheden, omdat hierbij een monster genomen wordt, wat ook ingezet kan worden voor CPE monitoring. In rundvee wordt gebruik gemaakt van bloed- of melkonderzoek. Deze monsters zijn niet geschikt voor CPE screening. Indien men de bestaande monitoring bij runderen zou willen gebruiken voor CPE screening zouden dus relatief meer aanpassingen gedaan moeten worden vergeleken met pluimvee. Hetzelfde geldt voor schapen, geiten en varkens (zie Tabel 5.2.1).

Tabel 5.2.1 Overzicht bestaande monsternames in landbouwhuisdieren.

Diersoort	Soort monitoring	Soort monster	Monster nemen van	Monsternemer	Onderzoeksinstituut	Opmerking
Pluimvee	Monitorings-systeem voor Aviaire influenza (AI)	bloed	Levende dieren	Eigen dierenarts	GD	Bij verdenking worden ook swabs ingestuurd, verder regelmatig serologie monsters.
	Monitoring Salmonella pluimvee	gepoolde bootswabs	Levende dieren, vermeerderingsdieren, vleeskuikens, vleeskalkoenen en/of legkippen	Eigen dierenarts	GD	Regeling preventie, bestrijding en monitoring besmettelijke dierziekten, zoönosen en TSE's.
	Monitoring Mycoplasma	trachea swab	Levende dieren, bedrijfsmatig gehouden kippen en kalkoenen.	Eigen dierenarts	GD	Regeling preventie, bestrijding en monitoring besmettelijke dierziekten, zoönosen en TSE's.
	Newcastle disease (NCD)	bloed	Levende dieren, Gevaccineerde dieren	Eigen dierenarts	GD	Regeling van de Minister van Economische Zaken van 5 juni 2014, nr. WJZ/14045056
Rundvee	Prevalentieonderzoek van endemische aandoeningen		Levende dieren, steekproef van rundvee		GD	
	Prevalentieonderzoek gE-negatieve BHV1 veldstammen	swab van neusslijmvlies	Levende dieren klinisch verdacht van BHV1	Eigen dierenarts	GD	Voor de bewaking van het voorkomen van gE-negatieve BHV1 veldstammen

Diersoort	Soort monitoring	Soort monster	Monster nemen van	Monsternemer	Onderzoeksinstituut	Opmerking
	<i>Brucella abortus</i> bewakingsonderzoek	bloed	Levende dieren, verwerpers	Eigen dierenarts	GD	In 1999 heeft Nederland de officieel EU-runderbrucellose-vrije status verkregen volgens Beschikking 2003/467/EG
	Leucose bewakingsonderzoek	? En tankmelk	Steekproef van rundvee, slachthuismonsternamen en tankmelkonderzoek		GD	
	BSE	Hersensmateriaal?	in nood geslachte dieren en kadavers ouder dan 48 maanden		WBVR	
	Leptospirose	melk	Levende dieren van melk leverende en niet-melk leverende bedrijven die meedoen aan leptospirose-vrij programma van de GD		GD	
	Para-tuberculose	individuele melk van melkgevend e koeien	Dieren op alle melkveebedrijven		GD	Paratuberculose Plan Nederland (PPN)
	Salmonella	Melk	3x per jaar tankmelk van alle melkgevend e bedrijven en bedrijven die meedoen aan Salmonella onverdacht programma		GD	
	Blauwtong	bloed	Elk jaar in november-december steekproefonderzoek van ongevaccineerde runderen geboren na 2009		GD/ WBVR	

Diersoort	Soort monitoring	Soort monster	Monster nemen van	Monster-nemer	Onderzoeks-instituut	Opmerking
Schaap/ geit	Q-fever	tankmelk	Bij melkgeiten-en melkschapebedrijven met meer dan 50 dieren: tussen 1 december en 1 juni eenmaal per twee weken een monster uit de melktank. Tussen 1 juni en 1 december, eenmaal per maand een tankmelkmonster. Op besmette bedrijven en op bedrijven die vanuit geloofsovertuiging niet willen vaccineren: tussen 1 juni en 1 december elke twee weken een tankmelkmonster.		GD	
	<i>Brucella melitensis</i>	bloed	steekproef		GD	
geit	Scrapie	kop	1% van de dieren (minimaal één kop van een geit) per jaar, geit moet minimaal twee jaar oud zijn en op het bedrijf zijn geboren of daar minimaal twee jaar hebben verbleven.		WBVR	Voor geiten is nog geen fokprogramma, daarom worden deze dieren onderzocht
Varken	Monitoring Klassieke Varkenspest (KVP)	bloed	op alle fok-, opfok- en biggenbedrijven, 4-wekelijks		WBVR	
	Monitoring Salmonella op varkensbedrijven	bloed	Alle varkenshouders met 31 of meer vleesvarkens moeten deelnemen, per periode van 4 maanden 12 bloedmonsters		GD	Sinds begin 2005 bestaat er een landelijk monitoringsprogramma voor Salmonella bij vleesvarkens.

Diersoort	Soort monitoring	Soort monster	Monster nemen van	Monster-nemer	Onderzoeks-instituut	Opmerking
	Monitoringsprogramma blaasjesziekte (SVD) en Ziekte van Aujeszky (ZvA)	bloed	Alle varkenshouders met 31 of meer varkens moeten deelnemen, per periode van 4 maanden 3 bloedmonsters op SVD.		GD	monitoringsprogramma op SVD en ZvA van IKB. Volgens de Verordening Varkenslevering en (VVL) geldt dat er maandelijks 12 bloedmonsters op ZvA moeten worden geanalyseerd. De verplichting (3 per 4 maanden) komt dan automatisch te vervallen.
	<i>Brucella suis</i>	Bloed	KI-beren, voordat de beer op een quarantainestal van een KI-station wordt aangevoerd, tijdens het verblijf in de quarantainestal en jaarlijks ter controle van beren die op KI-stations aanwezig zijn en bij beren die worden afgevoerd van het station.		GD	
Monitoring Landbouwhuisdieren		Faeces	Per jaar wisselende diersoort, 2014 vleesvarkens 2015 leghennen 2016 kleine herkauwers 2017 vleesrunderen (excl. kalf)			Verschillende zoönotische pathogenen en ESBL

Bron:GD

Bestaande monitoringsprogramma's in vlees

Per jaar vindt een wisselende monitoring plaats naar verschillende pathogene micro-organismen in detailhandel vlees en vleesbereidingen van diverse diersoorten. Hierbij wordt in relevante projecten ook actief gescreend op de aanwezigheid van ESBL en/of CPE-producerende bacteriën. Dit kan zowel in detailhandel als in relevante bedrijven of importstromen plaats vinden.

Bestaande monitoringsprogramma's in gezelschapsdieren

Het Beleids Ondersteunend project genoemd in paragraaf 3.2 wat gericht is op een actieve prospectieve screening van CPE in gezelschapsdieren, loopt door in 2017. Verder zijn er geen programma's om bij aan te haken.

5.3 Isolatiemethodes

De RT-PCR is een hele specifieke methode om CPE-genen te detecteren: als de RT-PCR positief is, is het 100% zeker dat het monster een carbapenemase gen bevat (specificiteit van de test). De precieze gevoeligheid (sensitiviteit) van de RT-PCR is op dit moment niet bekend. Met de gevoeligheid van de test bedoelen we het percentage positieve monsters gevonden met de test van het werkelijk totaal aantal positieve monsters. De gevoeligheid van de test heeft invloed op het wel/niet vinden van CPE. Bij de berekening in het rapport is voor de RT-PCR uitgegaan van een gevoeligheid van 90%. Dit is gebaseerd op het feit dat het een gevoelige methode is (de test kan minimaal 10 kolonie vormende eenheid (kve) per gram faeces detecteren (ongepubliceerde WBVR data)) om een set van meest voorkomende CPE genen te vinden. Echter het kan niet alle CPE genen detecteren. Dus monsters met minder dan 10 kve/gram faeces en monsters met een ander CPE gen (inclusief een nog onbekend CPE gen) dan dat in de test voorkomt zullen gemist worden. Door gebruik te maken van kweekmethoden zijn ook nieuwe resistentie mechanismen op te pikken. Echter door de diversiteit van de verschillende carbapenemases in hun affiniteit voor verschillende carbapenem antibiotica is het moeilijk om een gevoelige selectieve kweekmethode te vinden, die alle carbapenemases zou kunnen detecteren. In de literatuur zijn wel gevoeligheden te vinden van testen gebaseerd op kweek (zie Tabel 5.5.1).

Tabel 5.5.1 Overzicht sensitiviteit en specificiteit van verschillende isolatiemethoden van peri-anaal swabs (13).

Methode	Aantal geteste monsters	Carbapenemases (aantal isolaten)	Sensitiviteit (%)	Specificiteit (%)
CDC protocol*	177	KPC (85)/VIM (1)	98.8	80.2
	200	KPC (63)/VIM (29)	89.1	86.4
	149	KPC (33)	65.6	49.6
	126	KPC (46)	78.3	100
	302	OXA-48 (33)	57.6	95.2
MacConkey agar met carbapenem disk	139	KPC (33)	75.8	89.6
	122	KPC (41)	92.7	95.9
	187	KPC (54)	87	100

Method	Aantal geteste monsters	Carbapenemases (aantal isolaten)	Sensitiviteit (%)	Specificiteit (%)
	150	KPC (47)	83	73.8
	189	KPC (60)/VIM (9)/KPC & VIM (26)/OXA-48 (3)	96.9	98.9
MacConkey agar met imipenem in de agar	139	KPC (33)	84.9	94.3
	755	KPC (64)	87.5	99.4
	177	KPC (85)/VIM (1)	89.5	31.9
	126	KPC (33)/VIM (13)	78.3	97.5
MacConkey agar met meropenem in de agar	200	KPC (63)/VIM (29)	89.1	85.2
CHROMagar KPC (CHROMagar)	139	KPC (33)	84.9	88.7
	122	KPC (41)	100	98.4
	95	KPC (66)	77.3	100
	150	KPC (47)	76	75.7
	126	KPC (33)/VIM (13)	97.8	98.7
ChromID Carba (BioMerieux)	177	KPC (85)/VIM (1)	96.5	91.2
	200	KPC (63)/VIM (29)	92.4	96.9
	302	OXA-48 (33)	57.6	98.9
ChromID OXA-48 (BioMerieux)	302	OXA-48 (33)	75.8	99.3
Brilliance CRE (Oxoid)	77	OXA-48 (10)	80	86.6
HardyChrom (Hardy Diagnostics)	126	KPC (46)	76.1	100
Supercarba (CHROMagar)#	77	OXA-48 (10)	80	98.5
SpectraCRE (Remel)	150	KPC (47)	97.8	86.4

**CDC-protocol: overnacht incubatie van een rectale swab in 5 ml trypticase soy broth (TSB) met 10 ug carbapenem (mero- of ertapenem) disk. Vervolgens kweek op MacConkey agar met een carbapenem disk. Kolonies die rond de disk groeien worden getest voor carbapenemase productie. #Bevat ertapenem, cloxacilline en zinksulfaat*

De meeste media hebben een vrij hoge sensitiviteit voor het vinden van KPC en VIM carbapenemases, maar deze media zijn vaak relatief slecht in het detecteren van OXA-varianten, die (humaan) relatief vaker in Nederland voorkomen. Door platen te combineren is een grotere gevoeligheid te behalen. Zo wordt bij de actieve screening in faecale monsters in landbouwhuisdieren, in gezelschapsdieren en in import vis en kruiden gebruik gemaakt van een combinatie van de Chrom ID carba (met sensitiviteit van 57.6% voor OXA-varianten) en de Chrom ID OXA-48 (met een sensitiviteit van 75.8% voor OXA-varianten). Het is op dit moment niet duidelijk wat de meest gevoelige methode is om

carbapenemases te detecteren. De RT-PCR lijkt heel gevoelig, maar heeft als nadeel dat alleen bekende carbapenemases gevonden kunnen worden. Omdat de voorkeur uitgaat naar een gevoelige fenotypische test, waarbij heel gevoelig carbapenem resistentie kan worden aangetoond, maar deze nog niet is ontwikkeld, zal in 2018 een European Joint Programme (EJP) project starten, genaamd IMPART (WBVR is projectleider en RIVM en UU zijn twee van de partners binnen dit Europees breed project), waarbij onderzoek zal plaatsvinden naar het ontwikkelen van een gevoelige methode voor CPE detectie.

5.4 Recente ontwikkeling in de Europese monitoring relevant voor Nederland

Het enige land waar, voorzover bekend, op dit moment in de EU monitoring CPE is ontdekt, is in Duitsland. In 2015 is daar de eerste carbapenemase producerende stam (VIM-1) gevonden in landbouwhuisdieren in een caecummonster van een varken. Zoals beschreven in hoofdstuk 3 bestaat het verplichte EU-monitoringsprogramma voor een deel uit een actieve screening op ESBL. Eén van de gevonden ESBL-producerende isolaten bleek ook resistent tegen carbapenem antibiotica. In Duitsland was in 2011 al op een vergelijkbare manier VIM-1 producerende bacteriën aangetroffen op twee varkensbedrijven en één vleeskuikenbedrijf(14-16). Daarbij ging het om een additioneel project naast de EU monitoring. Opvallend is dat het isolaat gevonden in 2015 sterke overeenkomsten vertoont met de isolaten gevonden in 2011. Naast één isolaat gevonden in de EU monitoring in 2015, zijn in 2016 vijf dieren op het slachthuis getest, afkomstig van het positieve bedrijf en daarvan was één dier positief voor CPE(17).

Uit de resultaten van Duitsland zijn een paar conclusies te trekken:

1. In de monitoring in 2015 op het slachthuis is één dier positief gevonden. Er zijn 212 slachthuismonsters onderzocht, dus de geschatte prevalentie in Duitsland is lager dan de detectielimiet van 1% (namelijk 0,5%).
2. Gezien de overeenkomst van de stammen uit 2011 en 2015, lijken deze VIM-1 positieve *E. coli*'s zich voornamelijk klonaal te verspreiden (ondanks dat VIM-1 zowel in 2015 als in 2011 ook op plasmiden werden gevonden). De *E. coli* stam is of al vier jaar aanwezig geweest in de Duitse veehouderij, of er is een gemeenschappelijke bron, die zowel in 2011 als 2015 ervoor heeft gezorgd dat dieren besmet zijn geraakt. Helaas heeft er zowel in 2011 als in 2015 geen uitgebreider onderzoek plaatsgevonden op de positieve bedrijven, zodat de prevalentie op bedrijfsniveau onbekend is en onbekend is of de bedrijven nog steeds CPE op het bedrijf hebben. De bevindingen in Duitsland laten echter zien dat CPE aanwezig kan zijn en zich kan verspreiden in de veehouderij. Aangezien Nederland regelmatig dieren (waaronder varkens) uit Duitsland importeert (in 2016 bijna 60.000 varkens, ref www.rvo.nl) is waakzaamheid geboden.

Er is recent in het EU-monitoringsprogramma ook melding gemaakt van één CPE in vlees in België, maar details hierover ontbreken nog (17).

5.5 Inventarisatie risicogroepen

Naast het zorgen voor een zo goed mogelijke manier van testen kan ook gekeken worden naar de dierpopulaties die getest worden. Vragen die daarbij centraal staan: waar ligt het grootste risico van insleep/vóórkomen van deze bacteriën, en wat zijn logische plekken om te monitoren op het vóórkomen van CPE.

Waar ligt grootste risico van insleep/vóórkomen van CPE?

Insleep van een micro-organisme in (voedselproductie)dieren kan op verschillende manieren plaatsvinden:

1. Via directe dierstromen (naast voedselproducerende dieren: ook bijvoorbeeld gezelschapsdieren die geïmporteerd worden uit endemische gebieden¹(18)). Daarbij is het belangrijk dat in productiedieren ook insleep kan plaatsvinden via besmette (groot-)ouderdieren (zoals bijvoorbeeld bij vleeskuikens en vleesvarkens). Op dit moment worden dieren hoger in de productieketen niet meegenomen in de screening naar antibioticaresistentie.
2. Via import van besmette producten.
3. Via CPE dragende mensen die direct contact met de dieren en/of dierlijke producten hebben, of die geen direct contact hebben, maar de besmetting wel op een bedrijf brengen, waarna het door een andere route alsnog bij de dieren kan komen. CPE dragende mensen, kunnen mensen zijn, die gereisd hebben naar een endemisch gebied (18, 19) of mensen die in een ziekenhuis of zorginstelling besmet zijn geraakt.
4. Via het milieu (denk hierbij bijvoorbeeld aan overstort en besmetting van het oppervlaktewater bij extreme regenval, maar ook aan bijvoorbeeld besmette plaagdieren).

Om een inschatting te kunnen maken van het grootste risico voor insleep of het vóórkomen van CPE uit het buitenland is het mogelijk om verschillende scenario's te modelleren. Daarbij zijn systemen als TRACES (Trade Control and Expert System) (http://ec.europa.eu/food/animals/traces_en) en I&R (Identificatie en Registratie systeem), die alle dierstromen bijhouden, aan elkaar te koppelen om zo inzicht te krijgen wat er Nederland binnenkomt en waar het zich in Nederland bevindt. Door middel van prevalentieschattingen van CPE in de verschillende herkomstlanden kan zo bijvoorbeeld een inschatting gemaakt worden op de kans van insleep van CPE.

Wat zijn logische plekken om te monitoren op het vóórkomen van CPE?

Op dit moment vindt monitoring plaats in productiedieren, vlees en gezelschapsdieren. In beperkte mate worden ook import vis en kruiden onderzocht op CPE. Deze plekken zijn vanuit volksgezondheidsoogpunt logisch om mee te nemen in de monitoring. Additioneel kan nagedacht worden over het screenen van vermeerderingsdieren. Deze dieren worden op dit moment niet meegenomen in de monitoring, omdat deze dieren slechts een kleine bijdrage leveren aan het totaal aantal slachtdieren en daarmee een veel kleiner risico voor de volksgezondheid vormen. Echter door de structuur van bijvoorbeeld de vleeskuikenproductieketen kan een besmetting in (groot-)ouderdieren tot een enorme verspreiding in de productieketen leiden.

¹ Endemische gebieden voor CPE zijn Zuid-Europese landen (o.a. Italië, Spanje, Griekenland), Azië, Zuid-Amerika, Noord-Afrika

Voor het monitoren van vlees, vis en kruiden lijkt additionele screening van importproducten uit landen waar CPE in landbouwhuisdieren en/of producten is aangetroffen logisch om mee te nemen in de screening. Ook kan insleep via import van dieren uit endemische gebieden optreden, waar mogelijk zouden deze naast de bestaande monitoring kunnen worden toegevoegd. Door contact van mens en dier, kan de mens ook een rol spelen bij de overdracht naar gezelschapsdieren of landbouwhuisdieren. Indien men net terug is uit een land waar CPE endemisch onder de bevolking voorkomt of indien men als drager terug komt uit een zorginstelling kan men een bron vormen voor de eigen dieren. Het is dan ook belangrijk om hierover voorlichting te geven.

Aansluiting bij bestaande monitoringsprogramma's anders dan de AMR monitoring

Op dit moment lijkt het enige monitoringsprogramma (anders dan uitbreiding van de AMR monitoring) wat aansluit bij een uitbreiding van een CPE screening de Salmonella monitoring in pluimvee te zijn (zie paragraaf 5.2). Deze is aantrekkelijk in meerdere opzichten. Ten eerste worden bij deze monitoring ook vermeerderingsbedrijven onderzocht. Insleep naar productiedieren kan dan mogelijk nog voorkomen worden. Ten tweede sluit het onderzoek naar Salmonella goed aan bij het onderzoek naar CPE. Voor beiden zijn faecesmonsters nodig, die met dezelfde ophopingsmethode verder onderzocht kunnen worden. Er zijn op dit moment geen monitoringsprogramma's specifiek gericht op importdieren om bij aan te sluiten. Hiervoor is het van belang te kijken naar de importstromen en vervolgens in te schatten wat de risico's per importland zijn.

Een ander monitoringsprogramma wat geschikt is om CPE te onderzoeken is het programma 'Monitoring landbouwhuisdieren', waarbij ieder jaar één diersector intensief onderzocht wordt op mogelijke zoönotische aandoeningen. Hierbij wordt al naar ESBL-producerende *E. coli*'s gekeken. Een uitbreiding naar CPE zou mogelijk zijn. Echter dit programma heeft een vijf jaarlijkse cyclus waarbij ieder jaar een andere diersoort meegenomen wordt. Er wordt dan dus alleen één keer in de vijf jaar naar de verschillende diersoorten gekeken.

5.6 Inrichting monitoring voor eerdere detectie van CPE

Voor het inrichten van een monitorings systeem, waarbij men CPE eerder ontdekt en daarmee ook trends in lage prevalenties gevolgd kunnen worden, zal een actieve en gerichte screening voor CPE, het liefst een combinatie van een fenotypische methode met een genotypische methode, die ook in staat is om nieuwe resistentiemechanismen op te kunnen pikken gewenst zijn. Daarom is het belangrijk, dat er duidelijkheid komt over de specificiteit en selectiviteit van verschillende fenotypische methoden.

De huidige screening zegt alleen iets over de prevalentie in productiedieren, gezelschapsdieren en vlees, waarbij er een grote kans is, dat op dit moment een lage prevalentie gemist wordt. Voor een monitoring, waarbij met een 95% betrouwbaarheid een prevalentie van 0,1% kan worden opgepikt zullen iets meer dan 3300 monsters onderzocht moeten worden. Daarbij kan men meenemen dat insleep zou kunnen plaatsvinden via import van zowel landbouwhuisdieren als ook van gezelschapsdieren, danwel via besmette (groot-)ouderdieren. Ook is

het belangrijk voorlichting te geven over de risico's van dragerschap van mensen voor transmissie naar dieren. Hoe uiteindelijk een monitoring systeem eruit moet zien, hangt in hoge mate af van de gewenste nauwkeurigheid van de gemeten prevalenties.

6 Discussie/conclusie

Infecties met CPE zijn een bedreiging voor de volksgezondheid aangezien therapie opties voor een infectie met een dergelijke bacterie beperkt zijn. Daarom is het belangrijk om de mogelijke blootstelling aan deze bacteriën zo veel mogelijk in te perken, zodat zo min mogelijk mensen drager kunnen worden van een dergelijke resistente bacterie. Omdat ook dieren drager kunnen worden van CPE en transmissie van deze bacteriën en/of resistentiemechanismen mogelijk is tussen mens en dier is het belangrijk om een beeld te hebben van het voorkomen van CPE bij dieren en deze in een zo vroeg mogelijk stadium te detecteren. In Nederland vindt in vergelijking tot andere Europese landen een relatief uitgebreide CPE screening plaats in voedselproducerende dieren, gezelschapsdieren en dierlijke producten. Sinds 2013 wordt er aselectief (*passief*) en gericht (*actief*) gescreend op CPE. *Passief* (in landbouwhuisdieren/gezelschapsdieren/(vlees)producten) = alle isolaten die resistent waren tegen 3^e generatie cephalosporinen (ESBL-verdachte isolaten), testen op resistentie tegen carbapenems. *Actief* (in landbouwhuisdieren en gezelschapsdieren) = gezuiverd DNA van faecesmonsters testen op CPE-genen en selectief kweken op CPE. Tot nu toe zijn er nog geen CPE positieve monsters gevonden. Echter de huidige monitoring, die daarvoor gebruikt wordt, is in eerste instantie bedoeld om resistentieniveaus te vergelijken tussen de verschillende EU landen en over de jaren heen en niet gericht op het vroeg detecteren van bijvoorbeeld CPE. In hoofdstuk 3 en 4 is daarom gekeken naar de huidige monitoring en of deze verbeterd kan worden, om CPE bij lagere prevalenties te kunnen detecteren. Hieronder zullen we verschillende onderdelen bediscussiëren:

1. Welke laboratoriummethode wordt gebruikt en hoe gevoelig is deze om CPE te kunnen detecteren in de onderzochte monsters?

Zoals hierboven vermeldt, wordt er op dit moment *passief* en *actief* naar CPE gezocht in de genomen monsters. In hoofdstuk 3 komt duidelijk naar voren dat de *passieve* (aselecte) CPE screening erg ongevoelig is om CPE in de onderzochte monsters van landbouwhuisdieren, vlees en gezelschapsdieren aan te tonen. Doordat bij deze methode één willekeurige *E. coli* van een niet-selectieve plaat onderzocht wordt op zijn gevoeligheid voor 3^e generatie cephalosporines en één carbapenem is de gevoeligheid van deze methode erg laag (in de eerste stap is er 0.1% kans om een resistente *E. coli* te vinden). Door met een *actieve methode* (gericht) te screenen wordt de meting veel gevoeliger (90% kans om een carbapenem resistente stam te vinden). Er is nog verder onderzoek nodig om de precieze gevoeligheid van de kweekmethodes te bepalen voor alle verschillende CPE's.

De huidige (actieve) methode lijkt met een sensitiviteit van 90% of hoger gevoelig genoeg om de meest voorkomende CPE te kunnen detecteren. Mogelijk kan deze methode nog verbeterd worden, maar daar is verder onderzoek voor nodig. Dit zal in een EU project uit het European Joint Programme (EJP) genaamd IMPART verder onderzocht worden. De uitkomsten uit dat project kunnen gebruikt worden om de detectiemethode voor de CPE monitoring nog verder te optimaliseren.

2. De detectielimieten (afhankelijk van het aantal monsters en de gevoeligheid van de gebruikte laboratoriummethode) die met de huidige screening binnen de verschillende domeinen (landbouwhuisdieren, (vlees)producten en gezelschapsdieren) bereikt worden, zijn die toereikend om CPE te ontdekken?

In hoofdstuk 3 zijn de aantallen monsters, die de laatste jaren gescreend zijn voor CPE en de resultaten van deze screening samengevat. Daarna zijn in hoofdstuk 4 alle detectielimieten weergegeven. Deze is afhankelijk van de gevoeligheid van de gebruikte laboratorium test en van de aantallen monsters, die getest zijn. Voor de actieve screening in landbouwhuisdieren ligt de detectielimiet bij alle diersoorten iets onder of iets boven de 1%. Dit betekent dat met de huidige screening met een betrouwbaarheid van 95% een prevalentie van 1% kan worden opgepikt. In Nederland worden miljoenen vleeskuikens en vleesvarkens geproduceerd. Een prevalentie van 1% kan daarom in het slechtste geval betekenen dat duizenden dieren CPE bij zich dragen op het moment dat het gevonden wordt.

Detectielimieten kun je verder omlaag brengen door a) de testsensitiviteit te verhogen (voor de bekende CPE's is deze al hoog) of b) door een grotere steekproef te nemen.

De detectielimiet voor CPE screening in gezelschapsdieren is iets hoger (rond de 2%). De CPE screening in (vlees)producten varieert nogal tussen de onderzochte producten, doordat het aantal producten dat is onderzocht varieert van 3 tot 779. Hoe meer producten zijn onderzocht, hoe lager de detectielimiet. Die varieert dan ook van 0,36% (varkensvlees, 779 monsters onderzocht) tot 61% in kalkoenvlees (3 monsters onderzocht) (zie hoofdstuk 4).

De vraag is, of deze detectielimieten voldoende zijn om CPE te vinden op een moment dat het nog niet overal in de keten zit. Voor de monitoring in landbouwhuisdieren moet men zich afvragen of het oppikken van 1% prevalentie voldoende is. De gegevens uit Duitsland laten een prevalentie van 0,5% in varkens zien. De kans dat een dergelijke prevalentie op dit moment gemist zou worden (met het screenen van 300 dieren en een testsensitiviteit van 90%) is 28%. Deze kans is te verkleinen door meer dieren te bemonsteren. Om een betrouwbaarheid van 95% te krijgen om een dergelijke prevalentie wel op te kunnen pikken, zouden iets meer dan 700 dieren bemonsterd moeten worden. De gegevens uit Duitsland laten zien, dat het misschien verstandig is om nog eens kritisch naar de huidige CPE monitoring in Nederland te kijken. CPE was immers al aanwezig in Duitsland, voordat dit met de EU-monitoring werd opgepikt. Als we voor de situatie in Nederland uitgaan van een lage prevalentie, die door EFSA als 0,1% is gedefinieerd, dan is de kans op het kunnen oppikken van deze lage prevalentie met de huidige monitoring in landbouwhuisdieren 24%. Als men deze prevalentie zou willen oppikken met een betrouwbaarheid van 95%, zou men 3327 monsters (per diersoort/soort monster) moeten onderzoeken.

Voor de monitoring in vlees verschillen de aantallen geteste monsters per vleessoort en daarmee ook de detectielimieten. Rund-, varkens- en kippenvlees worden heel intensief onderzocht, terwijl andere vleessoorten minder uitgebreid gescreend worden. Dit heeft te maken met het feit dat de eerste drie vleessoorten het meest geconsumeerd worden. De detectielimieten liggen bij deze vleessoorten allemaal onder

de 1%, maar liggen nog wel boven de 0,1%, wat door EFSA gedefinieerd is als 'lage prevalentie'.

Bij het onderzoek in gezelschapsdieren kan met een betrouwbaarheid van 95% een prevalentie van ongeveer 2% worden opgepikt. Als we ook weer van een lage prevalentie van 0,1% uitgaan, is met de huidige aantallen de kans 86% en 88% dat een prevalentie van 0,1% onder respectievelijk katten of honden gemist zal worden.

3. Zou de monitoring kunnen verbeteren door andere groepen dieren/(dier)producten in de screening op te nemen?

Op dit moment wordt er gescreend op de aanwezigheid van CPE bij landbouwhuisdieren (in productiedieren op het slachthuis), (vlees-) producten (vlees uit de winkel en import vis en kruiden) en gezelschapsdieren (honden behandeld met antibiotica, grotendeels ingestuurde monsters naar het VMDC en kattenmonsters zonder selectie, die ingestuurd waren naar het VMDC)). Naast het verhogen van de steekproef in de huidige monitoring, lijkt het daarnaast zinvol om een eventuele uitbreiding van CPE monitoring risico-gebaseerd te doen (wat in (dierlijke) producten al gebeurt door importvis en kruiden te monitoren).

Voor landbouwhuisdieren kan gedacht worden aan het in kaart brengen van importstromen en vervolgens importdieren met een mogelijk verhoogd risico op dragerschap te screenen (zie ook hoofdstuk 5). Op dit moment zou bijvoorbeeld een extra screening op varkens, die uit Duitsland worden geïmporteerd naar Nederlandse bedrijven, overwogen kunnen worden. Men kan ook denken aan het opnemen van vermeerderingsdieren in de huidige monitoring. Op dit moment vindt namelijk geen screening in deze dieren plaats. Een monitoringsprogramma in dieren hoger in de productiepiramide kan een bijdrage leveren aan een vroeg detectie van CPE. Het is niet zo dat er op dit moment aanwijzingen zijn dat de kans op het voorkomen van CPE hoger ligt bij dieren hoger in de productiepiramide, maar deze dieren kunnen wel een bron vormen voor de productiedieren. Door boven in de keten te screenen, kan mogelijk voorkomen worden dat het zich verspreidt naar de productiedieren (van vaak verschillende productiebedrijven).

Het overzicht van de huidige monitoringsprogramma's (hoofdstuk 5) geeft niet veel aanknopingspunten om in plaats van of naast uitbreiding van de huidige AMR monitoring makkelijk aan te haken bij een bestaand programma anders dan de AMR monitoring. De enige andere monitoring, die mogelijk een rol zou kunnen spelen, is de Salmonella monitoring in pluimvee (inclusief vermeerderingsdieren). Bij deze monitoring worden faecesmonsters onderzocht, wat het beste aansluit bij de detectie van CPE. De mogelijkheden hiervoor zouden moeten worden uitgezocht.

Daarnaast is het interessant om te onderzoeken of het mogelijk zou zijn gebruik te maken van de grote jaarlijkse monsterstroom van de GD (zie paragraaf 3.3). Faecesmonsters (voor een actieve screening) en/of gevoeligheidstesten (voor een passieve screening) zouden een bijdrage kunnen leveren aan een uitbreiding van de CPE monitoring.

Om insleep via besmette mensen te voorkomen, is het belangrijk voorlichting te geven over de risico's van dragerschap. Op bedrijven (dit geldt ook voor slachthuizen en vleesverwerkingsbedrijven) moet men bewust zijn, dat men een extra risico vormt voor insleep op een bedrijf

indien men net terug is uit een land waar CPE endemisch onder de bevolking voorkomt (19) of indien men als drager terugkomt uit een zorginstelling.

In de monitoring voor (vlees-)producten wordt al risico-gebaseerd gescreend. Producten, die een mogelijk risico vormen zoals import vis en kruiden worden al meegenomen in de CPE screening.

Bij de screening van gezelschapsdieren is het goed ook te kijken naar de populatie die tot nu toe gescreend is. Voor honden bijvoorbeeld zijn het dieren die langdurig behandeld zijn geweest met antibiotica. Mogelijk vergroot dit de kans op de aanwezigheid van CPE, maar gegevens hierover ontbreken. Verwacht wordt, dat overdracht naar honden vooral plaats zal vinden via de mens. Het zou interessant zijn om informatie te hebben van humane CPE dragers en hun huisdieren te onderzoeken, of hun dieren ook CPE drager zijn en deze kunnen verspreiden naar andere gezelschapsdieren (en mensen). Daarnaast kunnen ook honden, die geïmporteerd worden uit landen waar CPE vaker onder mensen gevonden wordt (of in honden is gevonden) CPE drager zijn. Met een screening van importdieren zouden deze dieren in beeld gebracht kunnen worden. Ook hier zijn echter geen bestaande monitoringsprogramma's waarbij aangehaakt kan worden.

Concluderend kan worden gezegd dat de huidige CPE screening voldoet voor trendanalyse, maar nog verbeterd zou kunnen worden. Door een groter aantal monsters te nemen, kunnen lagere prevalenties van CPE betrouwbaar gedetecteerd en gemonitord worden. Daarmee wordt tevens de kans verhoogd besmettingen met CPE te ontdekken, voordat het verspreid is naar meerdere bedrijven, dieren en/of (dierlijke) producten, al kan niet gegarandeerd worden dat elke CPE besmetting vroegtijdig wordt ontdekt. Naast het nemen van meer monsters, wordt de kans hierop ook vergroot door risico-gebaseerd te screenen en waar mogelijk aan te sluiten bij al bestaande monsterstromen. De mogelijkheid daarvoor zal verder onderzocht moeten worden. Het grootste risico op insleep van CPE in Nederland in dieren en/of dierlijke producten wordt geschat via de import van dieren en/of dierlijke producten uit endemische gebieden. Daarom is het belangrijk om dierstromen goed in kaart te brengen en te monitoren. Daarnaast is het goed om in het achterhoofd te houden dat productiedieren ook besmet kunnen worden door transmissie uit eerdere schakels in de productieketen en er op dit moment geen screening in dieren hoger in de productiepiramide plaatsvindt. Overwogen kan worden om deze op te nemen in de huidige monitoring. Daarnaast kan er overdracht plaatsvinden via besmette mensen. Indien mogelijk, zou een kwantitatieve inschatting van een mogelijke blootstelling vanuit verschillende bronnen helpen om de huidige monitoring aan te passen. Dit geldt voor alle bronnen (mensen, dieren, milieu, vlees), waarbij de huidige systematiek kan blijven bestaan.

Ook zal er eerst consensus moeten komen over de gewenste betrouwbaarheid van de prevalentieschattingen in de verschillende domeinen, die nu gescreend worden.

7 Referenties

1. Anonymous. Advies Preventie en bestrijding van carbapenemresistentie in Nederland. RIVM, Infectieziektebestrijding C; 2014 26 juni 2014.
2. WVAB-richtlijn classificatie van veterinaire antimicrobiële middelen versie 3.0, (2015).
3. Anonymous. Scientific Opinion on Carbapenem resistance in food animal ecosystems. EFSA Journal. 2013;11(12):70.
4. (EFSA) EFSA. Technical specifications on the harmonised monitoring and reporting of antimicrobial resistance in *Salmonella*, *Campylobacter* and indicator *Escherichia coli* and *Enterococcus* spp. bacteria transmitted through food. EFSA Journal. 2012;10(6).
5. (EFSA) EFSA. Technical specifications on randomised sampling for harmonised monitoring of antimicrobial resistance in zoonotic and commensal. EFSA Journal. 2014;12(5).
6. Snedecor GW, Cochran, W.G. Statistical Methods: Wiley Blackwell; 2014.
7. Ceccarelli D, van Essen-Zandbergen A, Veldman KT, Tafro N, Haenen O, Mevius DJ. Chromosome-encoded *bla*_{OXA-48}-like variants in *Shewanella* spp. from food-producing animals, fish and the aquatic environment. Antimicrob Agents Chemother. 2016.
8. Akselsen PE, Andersen, C.T., Astrup, E., Blix, H.G., Caugant, D., Grave, K., Hermansen, N.O., Johannessen, G., Larssen, K.W., Lindbaek, M., Neteland, M., Norström, M., Radtke, A., Ronning, K., Slette-meas, J.S., Simonsen, G.K., Skaare, D., Steinbakk, M., Urdahl, A.M., Vestrheim, D., Width-Gran, F. NORM/NORM-VET 2015. Usage of Antimicrobial Agents and Occurrence of Antimicrobial Resistance in Norway 2016.
9. Bager F, Bortolaia, V., Ellis-Iversen, J., Hendriksen, R.S., Hog, B.B., Jensen, L.B., Jensen, A.N., de Knecht, L., Korsgaard, H., Dalby, T., Hammerum, A.M., Hasman, H., Kuhn, K.G., Hoffmann, S., Larsen, A.R., Laursen, M., Nielsen, E.M., Olsen, S.S., Petersen, A., Roer, L., Sönksen, U.W., Skov, R.L., Skovgaard, S., Torpdahl, M. DANMAP 2015 - Use of antimicrobial agents occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from food animals, food and humans in Denmark. 2016.
10. Aspevall O. SWEDRES/SVARM 2015, Consumption of antibiotics and occurrence of antibiotic resistance in Sweden. 2015.
11. Cohen Stuart J, Leverstein-Van Hall MA. Guideline for phenotypic screening and confirmation of carbapenemases in Enterobacteriaceae. Int J Antimicrob Agents. 2010;36(3):205-10.
12. anonymous. Feiten & Cijfers Gezelschapsdierensector 2015. In: Zaken MvE, editor. Den Haag: Rijksoverheid; 2015.
13. Richter SS, Marchaim D. Screening for carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: Who, When, and How? Virulence. 2016:1-10.
14. Fischer J, Rodriguez I, Schmogger S, Friese A, Roesler U, Helmuth R, et al. *Escherichia coli* producing VIM-1 carbapenemase isolated on a pig farm. J Antimicrob Chemother. 2012;67(7):1793-5.

15. Fischer J, Rodriguez I, Schmoger S, Friese A, Roesler U, Helmuth R, et al. *Salmonella enterica* subsp. *enterica* producing VIM-1 carbapenemase isolated from livestock farms. *J Antimicrob Chemother.* 2013;68(2):478-80.
16. Fischer J, San Jose M, Roschanski N, Schmoger S, Baumann B, Irrgang A, et al. Spread and persistence of VIM-1 Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in three German swine farms in 2011 and 2012. *Vet Microbiol.* 2016.
17. (EFSA) EFSA. The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2015. *EFSA Journal.* 2017;15(2):4694.
18. Lee CR, Lee JH, Park KS, Kim YB, Jeong BC, Lee SH. Global Dissemination of Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae*: Epidemiology, Genetic Context, Treatment Options, and Detection Methods. *Front Microbiol.* 2016;7:895.
19. van Hattem JM, Arcilla MS, Bootsma MC, van Genderen PJ, Goorhuis A, Grobusch MP, et al. Prolonged carriage and potential onward transmission of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in Dutch travelers. *Future Microbiol.* 2016;11:857-64.
20. Poirel L, Bercot B, Millemann Y, Bonnin RA, Pannaux G, Nordmann P. Carbapenemase-producing *Acinetobacter* spp. in Cattle, France. *Emerg Infect Dis.* 2012;18(3):523-5.
21. Wang Y, Wu C, Zhang Q, Qi J, Liu H, Wang Y, et al. Identification of New Delhi metallo-beta-lactamase 1 in *Acinetobacter lwoffii* of food animal origin. *PLoS One.* 2012;7(5):e37152.
22. Zhang WJ, Lu Z, Schwarz S, Zhang RM, Wang XM, Si W, et al. Complete sequence of the bla(NDM-1)-carrying plasmid pNDM-AB from *Acinetobacter baumannii* of food animal origin. *J Antimicrob Chemother.* 2013;68(7):1681-2.
23. Braun SD, Ahmed MF, El-Adawy H, Hotzel H, Engelmann I, Weiss D, et al. Surveillance of Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing *Escherichia coli* in Dairy Cattle Farms in the Nile Delta, Egypt. *Front Microbiol.* 2016;7:1020.
24. Liu BT, Song FJ, Zou M, Hao ZH, Shan H. Emergence of colistin resistance gene mcr-1 in *Cronobacter sakazakii* producing NDM-9 and *Escherichia coli* from the same animal. *Antimicrob Agents Chemother.* 2016.
25. Ewers C, Klotz P, Scheufen S, Leidner U, Gottig S, Semmler T. Genome sequence of OXA-23 producing *Acinetobacter baumannii* IHIT7853, a carbapenem-resistant strain from a cat belonging to international clone IC1. *Gut Pathog.* 2016;8:37.
26. Abraham S, O'Dea M, Trott DJ, Abraham RJ, Hughes D, Pang S, et al. Isolation and plasmid characterization of carbapenemase (IMP-4) producing *Salmonella enterica* Typhimurium from cats. *Sci Rep.* 2016;6:35527.
27. Gonzalez-Torralba A, Oteo J, Asenjo A, Bautista V, Fuentes E, Alos JI. Survey of Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae in Companion Dogs in Madrid, Spain. *Antimicrob Agents Chemother.* 2016;60(4):2499-501.
28. Shaheen BW, Nayak R, Boothe DM. Emergence of a New Delhi metallo-beta-lactamase (NDM-1)-encoding gene in clinical *Escherichia coli* isolates recovered from companion animals in the

- United States. Antimicrob Agents Chemother. 2013;57(6):2902-3.
29. Smet A, Boyen F, Pasmans F, Butaye P, Martens A, Nemeč A, et al. OXA-23-producing *Acinetobacter species* from horses: a public health hazard? J Antimicrob Chemother. 2012;67(12):3009-10.
 30. Stolle I, Prenger-Berninghoff E, Stamm I, Scheufen S, Hassdenteufel E, Guenther S, et al. Emergence of OXA-48 carbapenemase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in dogs. J Antimicrob Chemother. 2013;68(12):2802-8.

Bijlage tabellen

Tabel 1 Overzicht CPE gevonden in landbouwhuisdieren internationaal in projecten buiten EU-monitoringsprogramma.

Screenings-jaar	Land	Soort studie	Carbapenemase	Soort monster (n gescreend)	Diersoort	Matrix	Species	Laboratorium methode	Referentie
2010	Frankrijk	Prospectief	OXA-23 (chromosomaal)	Gezonde dieren	Melkvee (n=50)	Rectum swab	<i>Acinetobacter</i> spp (n=9)	Preculture in BPW. drigalski Agar met 1 ug/ml imipenem	(20)
2011	China	Prospectief	NDM-1 (n=1)	Gezonde dieren op kippenbedrijf (n=8), eendenbedrijf (n=6) en varkensslachthuizen (n=1), totaal 396 monsters	Kip (n=146), eend (n=50), varken (n=70), varkensslachthuizen (n=60 rectaal swabs, n=50 neusswabs en n=20 lymfeknoop swabs)	Cloaca-, neus-, lymfeknoop en rectaal swabs	<i>Acinetobacter lwoffii</i> (n=1, kip)	BHI agar met 8 ug/ml imipenem	(21)
2011-2012	China	Prospectief	NDM-1	5 Varkens-), 3 vleeskuiken- en 1 eendenbedrijf, 1293 monsters, gezonde en klinisch zieke dieren	Varken, vleeskuiken eend	Longen, levers, lymfeknopen, pericardiale vloeistof	<i>Acinetobacter baumannii</i> (n=1, varken (276 verdachte isolaten)	Agar met 2 mg/L meropenem	(22)
2011-2012	Duitsland	Prospectief en	VIM-1	Varkensbedrijf	Varken, overschoentjes, vliegen en mest	Faeces (n=26), overschoentje	<i>E. coli</i> (n=37)	ESBL isolaten gescreend for carbapenem	(14, 16)

Screenings-jaar	Land	Soort studie	Carbapenemase	Soort monster (n gescreend)	Diersoort	Matrix	Species	Laboratorium methode	Referentie
		retrospectief				es (n=3), gepoolde faeces (n=3), mest (n=2), vliegen (n=1)		resistentie.	
2011-2012	Duitsland	Prospectief en retrospectief	VIM-1	Varkensbedrijf (n=7) en vleeskuikenbedrijf (n=7), gezonde dieren	Varken (n=2)	Faeces, 100 meter naast een varkensbedrijf, stofmonster uit een vleeskuikenstal	<i>Salmonella</i>	ESBL isolaten gescreend for carbapenem resistentie.	(15, 16)
2014	Egypte	Prospectief	OXA-48, OXA-181	Rectale swabs en melkmonsters van gezonde dieren (n=210)	Melkvee	Rectale swabs	<i>E. coli</i> (OXA-48, n=5; OXA-181, n=1)	Non-selectieve ophoping in BPW, incubatie op Brilliance™ ESBL agar (Oxoid), MIC bepaling (VITEK-2) en CarbDetect AS-1 en <i>E. coli</i> PanType AS-2 kit (Alere)	(23)
2015	China	Prospectief	NDM-9	Niet bekend, zieke kip met diarree	Kip	Niet bekend	<i>Cronobacter sakazakii</i> (n=2)	MIC-bepaling	(24)

Tabel 2 Overzicht studies naar CPE in gezelschapsdieren.

Jaar	Land	soort studie	Carbapene-mase	Soort monster (n gescreend)	Diersoort	Matrix	Species	Labmethode	Referentie
2000	Duitsland	Retrospectief	OXA-23	klinisch monster (n=?)	kat	urine (cystitis)	<i>Acinetobacter baumannii</i> (n=1)	Onbekend	<i>Ewers et al.</i> , Gut Pathog (2016)8:37
2008-2009	USA	Retrospectief	NDM-1	klinische monsters(n=944)	hond en kat	verschillende matrices, wond, neus en urine	<i>E. coli</i> (n=6) van 5 honden en 1 kat	MIC bepalingen (verminderd gevoelig voor ceftazidime, cefotaxime of meropenem)	<i>Shaheen et al.</i> , AAC (2013); 57; 2902-2903
2012	België	Prospectief	OXA-23	gezonde dieren (n=20)	paard	2 gram faeces	<i>Acinetobacter</i> spp (n=1)	Ophoping in BPW daarna op macConkey + imipenem	<i>Smet et al.</i> , JAC (2012), 67;12;3009-3010
2012	Duitsland	Retrospectief	OXA-48	klinische monsters (n=3885)	hond	wond, luchtweg, faeces, urine, bloedcatheter	<i>E. coli</i> (n=3) en <i>Klebsiella</i> (n=5) van 6 honden	disk diffusie met imipenem en ertapenem	<i>Stolle et al.</i> , JAC(2013);68;2802-2808
2014-2015	Spanje	Prospectief	VIM-1	dieren bij aankomst op kliniek (n=160)	hond	rectaal swab	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (n=1)	ChromID Carba-SMART (BioMerieux), confirmatie door combinatie disk test	<i>González-Torralba et al.</i> , AAC(2016)60;4;2499-2501

MIC : minimale inhiberende concentratie

BPW : Gebufferd Pepton Water

Bilthoven: 12 December 2017

Onderwerp: Erratum bij briefrapport 2017-0088

In het RIVM briefrapport 2017-0088, getiteld: 'Inventarisatie Screening carbapenemase-producerende bacteriën in dieren en dierlijke producten: is de huidige screening toereikend?', is helaas een fout opgetreden. In het colofon op pagina 2 ontbreekt een auteur, namelijk J. Wagenaar (auteur), FD, Utrecht.

Met vriendelijke groet,

C. Dierikx

Projectleider RIVM rapport 2017-088

RIVM

De zorg voor morgen begint vandaag