



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

CPE en colistine resistentie

RIVM-briefrapport 2021-0030
C.M. Dierikx et al.



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

CPE en colistine resistentie

RIVM-briefrapport 2021-0030
C.M. Dierikx et al.

Colofon

© RIVM 2021

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-2021-0030

C. Dierikx (auteur), RIVM
E. Gijsbers (auteur), RIVM
E. van Duijkeren (auteur), RIVM
P. Hengeveld (auteur), RIVM
A. Meijs (auteur), RIVM

Contact:

Cindy Dierikx

Zoönosen en Omgevingsmicrobiologie\Dier en Vector

Cindy.dierikx@rivm.nl

Dit onderzoek werd verricht in opdracht van het ministerie van VWS, in het kader van onderzoek naar antibioticaresistentie. Een deel van het onderzoek is gefinancierd door European Union's Horizon 2020 onderzoek en innovatie programma (Grant Agreement No. 773830)

Dit is een uitgave van:

**Rijksinstituut voor Volksgezondheid
en Milieu**

Postbus 1 | 3720 BA Bilthoven

Nederland

www.rivm.nl

Publiekssamenvatting

CPE en colistine resistentie

Tegen bepaalde type bacteriën werken antibiotica niet meer. Ze zijn daar resistent tegen geworden. Voorbeelden zijn colistine-resistente bacteriën. Deze bacteriën kunnen in de ontlasting van mensen, vee, en huisdieren zitten en in vlees. Het RIVM heeft voor het eerst onderzocht hoe vaak deze resistente bacteriën voorkomen bij de Nederlandse bevolking. Van 661 mensen is de ontlasting onderzocht. Colistine-resistente bacteriën kwamen bij 36 mensen voor.

De gegevens zijn als controle gebruikt voor de AREND-studie. Daarin is onder andere onderzocht of colistine-resistente bacteriën even vaak bij dierenartsen en hun assistenten voorkomen dan bij de bevolking. Dat blijkt het geval te zijn.

Antibioticaresistente bacteriën kunnen in de darmen zitten van gezonde personen of dieren zonder dat zij daar last van hebben. Maar ze kunnen ook infecties veroorzaken. Infecties door deze bacteriën zijn moeilijker te behandelen met antibiotica. De bacteriën worden onder andere via de ontlasting of via besmet voedsel verspreid. Een goede hygiëne is dan ook belangrijk om besmetting te voorkomen.

Kernwoorden: ABR, antibioticaresistentie, colistine-resistentie, AREND-studie, bacteriën, infecties, ontlasting, hygiëne

Synopsis

CPE and colistin resistance

Antibiotics no longer work against certain types of bacteria. They have become resistant. Examples are colistin resistant bacteria. These bacteria can be found in the faeces of humans, livestock, pets and in meat. For the first time, RIVM has investigated how often these resistant bacteria occur in the Dutch population. The stools of 661 people were examined. Colistin resistant bacteria were found in 36 people.

This data was used as a control for the AREND study. This study investigated whether colistin-resistant bacteria occur just as often in veterinarians and their assistants as in the population at large. This appeared to be the case.

Antibiotic-resistant bacteria can be present in the intestines of healthy people or animals without causing any health problems, but they can also cause infections. Infections with these bacteria are more difficult to treat with antibiotics. The bacteria are spread for example through faeces or contaminated food. Good hygiene is therefore important to prevent contamination.

Keywords: ABR, antibiotic resistance, colistin resistance, AREND study, bacteria, infections, stool, hygiene

Inhoud

Samenvatting — 9

1 Achtergrond — 13

2 Literatuuronderzoek — 15

- 2.1 Verschillende typen screeningsmethoden om antibioticaresistentie in een monster aan te tonen — 15
- 2.2 Huidige screeningsmethoden CPE en colistine resistentie in dieren en dierlijke producten — 16
- 2.3 Literatuuroverzicht kweekmethodes voor detectie van colistine resistentie — 17
- 2.4 Literatuuroverzicht kweekmethodes voor detectie van CPE — 20

3 Materiaal en methoden — 23

- 3.1 Experimenten colistine resistentie — 23
- 3.2 Experimenten CPE — 23
- 3.3 IMPART project — 23
- 3.3.1 WP1 "Selective isolation, detection and characterization of colistin-resistant Enterobacteriaceae" — 24
- 3.3.2 WP2 "Selective isolation, detection and characterization of carbapenemase producing Enterobacteriaceae" — 26
- 3.4 Colistine prevalentie in de algemene bevolking en in veterinaire zorgmedewerkers — 28

4 Resultaten — 31

- 4.1 Experimenten Colistine resistentie — 31
- 4.1.1 Groei beoordelen op verschillende selectieve agarplaten. — 31
- 4.1.2 Uittesten van het effect van wel of geen verrijkingstap met een wel of niet- selectief ophopingsmedium. — 31
- 4.1.3 Gekozen methode uit 4.1.2 uittesten met faecesmonsters waaraan colistine resistente isolaten zijn toegevoegd. — 32
- 4.2 Experimenten CPE — 33
- 4.2.1 Groei beoordelen op verschillende selectieve agarplaten — 33
- 4.2.2 Uittesten van het effect van wel of geen verrijkingstap met een wel of niet- selectief ophopingsmedium met faecesmonsters waaraan CPE isolaten zijn toegevoegd — 34
- 4.3 IMPART project — 36
- 4.3.1 WP1 "Selective isolation, detection and characterization of colistin-resistant Enterobacteriaceae" — 36
- 4.3.2 WP2 "Selective isolation, detection and characterization of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae" — 36
- 4.4 Prevalentiestudie colistine resistentie in de algemene bevolking en bij veterinaire zorgmedewerkers — 39
- 4.4.1 Prevalentie — 39
- 4.4.2 Moleculaire analyse colistine resistentie mechanismen — 39

5 Conclusies/discussie — 43

6 Vervolg — 47

7	Dankwoord – 49
8	Referenties – 51
	Appendix 1 – 57
	Appendix 2 – 58

Samenvatting

Inleiding: Carbapenem antibiotica worden vaak ingezet als laatste redmiddel in de behandeling van bacteriële infecties met multiresistente organismen, waaronder multiresistente ESBL-producerende bacteriën. Bacteriën kunnen echter ook resistentie tegen carbapenem antibiotica ontwikkelen, o.a. door productie van carbapenemases. Deze enzymen breken de β -lactamring van de carbapenem antibiotica af, waardoor ze hun werkzaamheid verliezen. Er bestaan zeer veel verschillende carbapenemases, die door verschillende genen gecodeerd worden. Voorbeelden van carbapenemase genen zijn *bla*_{IMP}, *bla*_{NDM}, *bla*_{KPC}, *bla*_{VIM}, en *bla*_{OXA}.

Carbapenemase producerende *Enterobacterales* (CPE) zijn wereldwijd een probleem, en zijn endemisch in meerdere landen. Therapeutische opties voor de behandeling van infecties met een multiresistente CPE zijn zeer beperkt. Eén van de laatste behandelmogelijkheden van infecties met CPE is colistine. Tot voor kort was resistentie tegen colistine zeldzaam, waarbij enkel chromosomale mutaties werden gevonden. Deze mutaties zijn niet overdraagbaar naar andere bacteriën. Echter, in november 2015 werd aangetoond dat resistentie ook kan optreden door de aanwezigheid van een mobiel colistine resistentiegen (*mcr-1*) gelegen op een IncI2 plasmide. Deze was gevonden in bacteriën van mensen, vlees en varkens in China. Dit colistine resistentiegen *mcr-1* is inmiddels overal in de wereld gevonden. Naast het IncI2 plasmide, is *mcr-1* onder andere ook op IncX4 en IncHI2 plasmiden gevonden. Ook in Nederland is *mcr-1* gevonden in patiënten en reizigers en in dieren en in vlees van dieren. Recent is *mcr-1* uit vlees in Nederland op een IncI1 plasmide gevonden, dit was nog niet eerder gepubliceerd. Tot nu toe waren er geen gegevens over de prevalentie van colistine resistentie in de algemene bevolking in Nederland.

Voor zowel de detectie van carbapenem resistentie als colistine resistentie is niet bekend wat de meest gevoelige kweekmethode is. De huidige laboratoriummethode, die gebruikt wordt voor de screening van CPE en colistine resistente isolaten in de monitoring van dieren en dierlijke producten is deels gebaseerd op een moleculaire methode, waarbij stukjes DNA van bekende resistentiemechanismen worden aangetoond. Deze heeft als nadeel, dat niet bekende resistentiemechanismen gemist worden, terwijl er wel steeds nieuwe mechanismen worden ontdekt.

Doelstelling: Het doel van dit onderzoek was antwoord te geven op de volgende vragen:

1. Welke kweekmethodes zijn het meest gevoelig om carbapenem of colistine resistente bacteriën aan te tonen in de ontlasting van dieren en mensen.
2. Wat is de prevalentie van darmdragerschap van colistine resistente *Enterobacterales* in de algemene bevolking?
3. Wat is de prevalentie van darmdragerschap van colistine resistentie *Enterobacterales* onder personen werkzaam in de diergeneeskundige zorg?

4. Welke resistentie mechanismen leiden tot colistine resistentie bij isolaten uit Nederlandse dragers.

Materiaal en Methode: Eerst is met een literatuuronderzoek bepaald welke kweekmethoden er op dit moment gebruikt worden. Aan de hand van de gevonden kweekmethoden is een plan gemaakt om de verschillende methoden in het laboratorium te testen en de sensitiviteit (gevoeligheid) en specificiteit van de methoden vast te stellen. Naast de experimenten die zijn gedaan op het RIVM zijn een aantal kweekmethoden ook in het kader van het One Health European Joint Programme (OHEJP) project Improving Phenotypic Antimicrobial Resistance Testing (IMPART) uitgetest door verschillende referentielaboratoria in Europa met een ringonderzoek. Met de meest succesvolle methode is de prevalentie van colistine resistentie onderzocht onder de algemene bevolking (faecesmonsters uit 2016/2017 uit de vriezer van de PIENTER-3 studie). Deze prevalentie is vergeleken met de prevalentie onder veterinaire zorgmedewerkers (verse faeces uit 2018/2019 uit de AREND-studie, zie ook het rapport van de AREND studie 2021-0029). De isolaten zijn vervolgens onderzocht met behulp van Whole Genome Sequencing en long-read sequencing om de resistentiemechanismen in kaart te brengen.

Resultaten: Uit laboratorium experimenten uitgevoerd op het RIVM met isolaten waarvan al bekend was dat ze colistine resistent zijn, bleek dat het moeilijk is om een kweekmethode te vinden, die zowel de gevoelige bacteriën remt en de colistine resistente bacteriën goed laat groeien. Om toch tot een zo goed mogelijke remming van gevoelige isolaten te komen en tegelijkertijd tot een detectie van colistine resistente isolaten is er bij het IMPART project voor gekozen om een twee-staps voorophoping te doen, waarbij eerst 3 uur in een niet-selectieve ophoping (10 ml gebufferd Pepton Water (BPW)) wordt gekweekt, waarna 1 ml van deze ophoping overgebracht wordt naar een selectief vloeibaar medium met colistine (BPW met 2 mg/L colistine). Deze laatste stap zorgt ervoor dat colistine goed zijn werk kan doen en minder gehinderd wordt door faecesmateriaal. Uiteindelijk bleek in het IMPART project dat de CHROMID® ColR platen het meest gevoelig waren om colistine resistente isolaten te detecteren na de dubbele voorophoping (sensitiviteit van 86% versus 75 en 70% voor respectievelijk CHROMagar™ COL-APSE en COLISTIGRAM). Daarnaast is voor het detecteren van *mcr*-positieve isolaten eerst een moleculaire methode (PCR) uitgevoerd op DNA van de ophoping, waarmee *mcr*-genen 1 t/m 9 kunnen worden aangetoond. Deze methode werkt niet voor het detecteren van isolaten die als gevolg van chromosomale mutaties of een nieuw *mcr*-gen colistine resistent zijn, daarvoor is een kweekmethode nodig. Carbapenem resistentie kan veroorzaakt worden door verschillende resistentiegenen (*bla_{OXA}*, *bla_{NDM}*, *bla_{VIM}*, *bla_{KPC}*, *bla_{IMP}*). De experimenten met CPE isolaten laten zien dat voor isolaten met *bla_{OXA}*-genen en isolaten met andere carbapenem resistentiegenen (*bla_{NDM}*, *bla_{VIM}*, *bla_{KPC}*, *bla_{IMP}*) verschillende kweekmethoden nodig zijn. De niet-selectieve ophoping (overnacht in BPW) en het gebruik van een combinatie van CHROMID® CARBA en CHROMID® OXA leiden tot de meest gevoelige detectie van CPE isolaten. Al moet vermeld worden dat lage concentraties carbapenem antibiotica in de ophoping niet getest zijn en

mogelijk tot even goede resultaten als de niet-selectieve ophoping leiden. De niet-selectieve ophoping is ook gebruikt in het IMPART project. Ook in het IMPART project was CHROMID® OXA het beste in staat om carbapenem resistentie als gevolg van *bla*_{OXA}-genen te detecteren en CHROMID® CARBA en Chromatic™ CRE konden de overige CPE's het meest gevoelig detecteren (sensitiviteit van 100%). De mSuperCARBA agarplaat presteerde bijna net zo goed met een sensitiviteit van 96%. De overige platen (Chromatic™ OXA-48 en Brilliance CRE) hadden een lage sensitiviteit (43 en 75% respectievelijk). Voor het detecteren van *bla*_{VIM-1} positieve isolaten, eerder beschreven in landbouwhuisdieren in Duitsland, is deze methode niet afdoende en is een aanvullende kweekmethode, met een selectieve voorophoping met cefotaxime vereist.

Op het moment dat de colistine prevalentie studie werd uitgevoerd waren de voordelen van de twee-staps voorophoping nog niet bekend, daarom is in de prevalentie studie gebruik gemaakt van alleen een selectieve ophoping met colistine om gevoelige isolaten te remmen. De resultaten van de colistine resistentie prevalentie studie laten zien dat de prevalentie onder personen werkzaam in de diergeneeskundige zorg (8.1%; AREND studie) niet significant verschillend was van de prevalentie onder de algemene bevolking (5.4%; PIENTER-3 studie). De iets verhoogde prevalentie in de AREND studie kan te verklaren zijn, doordat in de AREND studie verse faecesmonsters gebruikt zijn in tegenstelling tot de monsters uit de PIENTER-3 studie, die opgeslagen waren bij -70°C. Desondanks zijn de gevonden prevalenties voor beide groepen relatief hoog. Mogelijk speelt een rol dat bacteriën ook door andere factoren (zoals bijvoorbeeld de zuurgraad van de omgeving, aanwezigheid van enzymen) dan het contact met colistine veranderingen in de buitenmembraan kunnen oplopen, waardoor colistine niet meer goed werkt. Het resistentiemechanisme bleek veelal te bestaan uit chromosomale mutaties en in slechts zes personen (vijf (0.8%) uit de PIENTER-3 studie en één (0.2%) uit de AREND studie) werden *mcr*-genen aangetroffen. Deze prevalenties komen overeen met een eerdere prevalentie van 0.35% gevonden onder Nederlandse patiënten. Vier van de zes personen die een colistine resistent isolaat met een *mcr*-gen droegen waren eerste generatie immigranten uit Suriname. Moleculaire analyse liet zien dat *mcr-8* in Nederland in *Klebsiella pneumoniae* isolaten voorkomt en *mcr-1* naast IncX4 ook op een *incI1* plasmide voorkomt. Dit zijn beiden nieuwe bevindingen, die nog niet eerder zijn beschreven onder humane dragers in Nederland en zullen verder onderzocht worden.

Conclusie: Colistine resistente isolaten en CPE werden met een gevoeligheid van respectievelijk 86% en 100% gekweekt met de beschreven kweekmethoden. Voor detectie van (al bekende) *mcr*- en CPE genen kan aanvullende PCR toegepast worden. Echter voor de detectie van de meeste CPE lijkt de kweekmethode te voldoen. CPE is op dit moment nog niet in landbouwhuisdieren of dierlijke producten in Nederland aangetroffen. Met de huidige CPE kweekmethoden zullen *bla*_{VIM-1} positieve CPE gemist worden. Deze variant is eerder in landbouwhuisdieren in Duitsland aangetoond en daarom wordt aanbevolen om een extra selectieve ophoping met cefotaxime toe te voegen aan de screening van CPE in dieren en vlees.

Surveillance van *mcr*-gemedieerde resistentie en CPE bij dieren, in vleesproducten en bij de mens is belangrijk, om trends in het vóórkomen en verschuivingen in de soorten resistentie genen te monitoren en om risicofactoren voor dragerschap in kaart te brengen.

1 Achtergrond

Carbapenem antibiotica worden vaak ingezet als laatste redmiddel bij de behandeling van bacteriële infecties met multiresistente bacteriën, waaronder multiresistente ESBL-producerende bacteriën. Bacteriën kunnen echter ook resistentie tegen carbapenem antibiotica ontwikkelen, o.a. door productie van carbapenemases. Deze enzymen breken de β -lactamring van de carbapenem antibiotica af, waardoor ze hun werkzaamheid verliezen (1). Carbapenemase producerende *Enterobacterales* (CPE) zijn wereldwijd een probleem, en zijn endemisch in Griekenland, Italië, Marokko, Tunesië, Libië, Egypte, Turkije, India en de Verenigde Staten (2, 3). In Nederland is de prevalentie van CPE onder ziekenhuispatiënten erg laag, rond de 0,1% (4). CPE wordt vrijwel alleen gevonden in patiënten die worden overgeplaatst uit een buitenlands ziekenhuis of bij reizigers die terugkomen uit het buitenland (5). Daarnaast vinden in Nederland sporadische uitbraken van CPE in ziekenhuizen plaats (3, 6, 7). CPE komen ook voor bij dieren, en zijn aangetoond in voedselproducerende dieren in Duitsland (varkens en kippen) (8-11), in Italië (varkens) (12), Egypte (vleeskuikens) (13) en in de Verenigde Staten (melkkoeien) (14). Ook in vlees (in België en Duitsland) zijn CPE aangetroffen (15, 16). In Nederland is tot op heden geen CPE gevonden in voedselproducerende dieren of in dierlijke producten.

Therapeutische opties voor de behandeling van infecties met een multiresistente CPE zijn zeer beperkt. Eén van de laatste behandel mogelijkheden van infecties met CPE is colistine, ook wel bekend als polymyxine E. Vanwege de aanzienlijke bijwerkingen (neuro- en nefrotoxiciteit) wordt intraveneuze behandeling met colistine bij mensen alleen ingezet in zeldzame gevallen van infecties met een multiresistente CPE, waarbij er weinig of geen andere therapeutische opties zijn. Daarnaast wordt colistine oraal gebruikt bij IC-patiënten voor selectieve darm decontaminatie (SDD) of selectieve orofaryngeale decontaminatie (SOD). Ook wordt colistine in de veeteeltsector gebruikt met name bij varkens en overig pluimvee (17).

Tot voor 2015 was resistentie tegen colistine vooral het gevolg van chromosomale mutaties (18). Deze mutaties zijn niet overdraagbaar naar andere bacteriën. Echter, in november 2015 werd een mobiel colistine resistentie gen *mcr-1* gedetecteerd in een *E. coli* bacterie. Dit gen lag op een InI2 plasmide. *Mcr-1* werd gevonden in *E. coli* en *Klebsiella pneumoniae* bacteriën van mensen, kippenvlees, varkensvlees en varkens in een regio van China (19). Omdat colistine in China vaak gebruikt wordt bij dieren en weinig bij de mens en de prevalentie bij dieren veel hoger is dan bij mensen, wordt gedacht dat *mcr*-gedimeerde resistentie bij de mens mogelijk afkomstig is van dieren. Het *mcr* resistentiegen produceert een fosfo-ethanolamine transferase enzym. Dit enzym plakt fosfo-ethanolamine op het bacteriële eiwit lipopolysaccharide (LPS), waardoor colistine niet meer aan LPS kan binden en zijn werking verliest (20). Doordat dit resistentiegen op een plasmide ligt, is het overdraagbaar tussen bacteriën en tussen verschillende bacteriespecies. Sinds de ontdekking van *mcr-1* is in veel landen getest op *mcr-1* in monsters van mensen, dieren en dierlijke producten/vlees, en is dit resistentie gen aangetoond in tenminste 19

landen verdeeld over vijf continenten (Noord-Amerika, Zuid-Amerika, Europa, Afrika en Azië) (18, 21). Ook in Nederland is het *mcr-1* gen aangetoond, zowel in mensen (reizigers (22, 23) en patiënten (24)), als in landbouwhuisdieren (vleeskuikens, varkens, melkkoeien, kalkoenen en vleeskalveren (25, 26)) en dierlijke producten (kippenvlees (25, 27), kalkoenvlees (25), varkensvlees, rundvlees en kalfsvlees (28)). Naast het IncI2 plasmide, is het *mcr-1* gen onder andere ook op IncX4 en IncHI2 plasmiden gevonden. Recent is *mcr-1* uit vlees in Nederland op een IncI1 plasmide gevonden, dit was nog niet eerder gepubliceerd (29). Naast het *mcr-1* resistentiegen zijn inmiddels negen andere mobiele colistine resistentiegenen *mcr-2* t/m *mcr-10* geïdentificeerd (30). Tot op heden is alleen *mcr-4* (in kalveren) aangetoond in Nederland (31). De *mcr*-genen zijn op verschillende plasmiden gevonden. Een nog zorgelijker situatie ontstaat wanneer bacteriën resistent zijn tegen zowel carbapenem antibiotica als colistine, welke onder andere in een pathogene *E. coli* uit een varken in Italië en in humane pathogene isolaten uit Nederland (vanuit een patiënt, die teruggekomen was uit Griekenland) en de Verenigde Staten beschreven (12, 32, 33). De therapeutische opties voor de behandeling van een infectie met een dergelijke multiresistente bacterie zijn gering en vaak experimenteel.

Verspreiding van carbapenem resistente, colistine resistente en multiresistente bacteriën zijn een bedreiging voor de volksgezondheid en blootstelling aan dergelijke bacteriën moet tot een minimum worden beperkt. Ook dieren kunnen gekoloniseerd raken met carbapenem resistente en/of colistine resistente bacteriën en transmissie van resistente organismen tussen dier en mens is beschreven (34). Het is daarom van groot belang dat in het beleid van preventie en bestrijding ook gezelschapsdieren, landbouwhuisdieren en dierlijke producten worden meegenomen.

In het rapport van Dierikx *et al.* (RIVM Briefrapport 2017-0088) is de huidige screening van dieren en dierlijke producten op carbapenem resistentie gedetailleerd beschreven. De laboratoriummethode, die gebruikt wordt voor de screening van CPE en colistine resistente isolaten in de monitoring van dieren en dierlijke producten is deels gebaseerd op een moleculaire methode (PCR). Deze heeft als nadeel, dat niet bekende resistentiemechanismen gemist kunnen worden. Daarnaast worden steeds nieuwe resistentiegenen ontdekt en de moleculaire methoden moeten hier elke keer op aangepast worden. Voor de detectie van zowel carbapenem resistentie als colistine resistentie is niet bekend wat de meest gevoelige kweekmethode is. Daarnaast zijn voor colistine resistentie geen gegevens over de prevalenties in de Nederlandse bevolking bekend.

Het doel van dit onderzoek is dan ook het uittesten van verschillende kweekmethodes om CPE en colistine resistente bacteriën te detecteren in de ontlasting van mensen en dieren. Vervolgens is de prevalentie van dragerschap van colistine resistentie in de algemene bevolking bepaald en deze is vergeleken met de prevalentie onder personen met beroepsmatig diercontact, werkzaam in de diergeneeskundige zorg. Omdat gedacht wordt dat dieren een mogelijke bron zijn van colistine resistente bacteriën, zouden dierenartsen/assistenten en verhoogd risico kunnen hebben op dragerschap van colistine resistente bacteriën.

2 Literatuuronderzoek

2.1 Verschillende typen screeningsmethoden om antibioticaresistentie in een monster aan te tonen

Er zijn vele verschillende manieren waarop antibioticaresistentie van bacteriën in een monster aangetoond kan worden (35-37).

1. DNA-methoden

Ten eerste zijn er screeningsmethodes, die gebaseerd zijn op een DNA-methode. Deze kunnen resistentiegenen in een monster aantonen door middel van moleculaire testen, zoals PCR of microarray of met sequencing van het bacterieel DNA. Deze testen zijn zeer nauwkeurig en soms snel, en worden daarom vaak gebruikt als "gouden standaard". Nadelen van moleculaire testen zijn dat voor elk resistentiegen een aparte analyse nodig is, waardoor nog onbekende resistentiegen of gemuteerde resistentiegen niet aantoonbaar zijn, en er relatief hoge kosten per monster gemaakt worden. Ook geven moleculaire methoden toegepast op een monster geen informatie over de bacteriespecies waarin het resistentiegen voorkomt en of de bacterie levend of dood was en of het gen tot expressie komt.

2. Aantonen resistentie enzymen

Er zijn ook screeningsmethoden die de aanwezigheid of activiteit van een enzym wat resistentie veroorzaakt, bijvoorbeeld β lactamases of carbapenemases, kunnen aantonen. Bij deze testen verandert een oplossing van kleur door pH veranderingen als een substraat wordt omgezet door het resistentie-enzym. Ook de door het RIVM ontwikkelde Carbapenem Inactivation Method (CIM) (38) is zo'n test en toont de productie en activiteit van carbapenemases aan in een isolaat. Met behulp van deze testen kan in een korte tijd resistentie aangetoond worden, wat vooral in de klinische setting erg belangrijk is. Echter, deze testen geven alleen informatie over aan- of afwezigheid van het enzym. Aanvullende testen zijn nodig om te weten om welke bacterie het gaat en om welk resistentiegen. Daarnaast werken ze vaak alleen op al geïsoleerde bacteriën en zijn ze niet direct toepasbaar op een monster (zoals faeces of bloed).

3. Opkweken met selectieve antibiotica in vloeibare en vaste media

Naast het aantonen van resistentie-enzymen of resistentiegenen, kan er ook gescreend worden met selectieve antibiotica voor resistente bacteriën. Hierbij wordt gebruik gemaakt van de selectieve druk van een antibioticum, waarbij bij voorkeur alleen de resistente bacteriën in het monster kunnen groeien. De voordelen van deze manier is dat ook onbekende resistentiegenen en mutaties kunnen worden aangetoond, en de lage kosten per monster. Bij deze methode worden de bacteriën gekweekt, waardoor het relatief simpel is om met aanvullende testen de bacteriespecies te bepalen. Het duurt echter wel relatief lang voordat de uitslag bekend is (24-72 uur) en soms is het moeilijk om het juiste antibioticum met de juiste concentratie te vinden om alle resistentiemechanismen te kunnen aantonen. Daarnaast geven deze testen geen duidelijkheid over het precieze

resistentiegen in deze bacteriën, hoewel dit met aanvullende analyses wel meteen aansluitend kan worden bepaald.

2.2 Huidige screeningsmethoden CPE en colistine resistentie in dieren en dierlijke producten

In de huidige screening van colistine resistentie in dieren en dierlijke producten wordt gebruik gemaakt van een selectieve ophoping (gebufferd pepton water (BPW) met 2 mg/L colistine), die moleculair getest wordt met behulp van PCR (in pools van 5 monsters) op de aanwezigheid van *mcr*-genen -1 t/m -5. PCR-positieve monsters worden gekweekt vanuit de selectieve ophoping op een selectief medium (MacConkey plaat met 2 mg/L colistine)(31).

Zoals in paragraaf 2.1 beschreven zitten er een aantal nadelen aan het gebruik van de moleculaire methode als voorscreening voor het inzetten van een kweek. Ten eerste kan deze manier van testen colistine resistente bacteriën missen, wanneer er nieuwe varianten van resistentiegenen aanwezig zijn. Daarnaast heeft deze methode het nadeel dat de bacterie waar het gevonden resistentiegen in zit niet altijd teruggekweekt kan worden. Vooral voor bronopsporing is dit een nadeel. Een gevoelige fenotypische methode heeft daarom de voorkeur om bij een lage prevalentie colistine resistente bacteriën met een lage detectiegrens te kunnen aantonen en waarbij de bacteriën gekweekt worden, zodat ze gebruikt kunnen worden voor epidemiologisch onderzoek om de bron te achterhalen. Gezien de variatie in resistentiegenen (*mcr-1* t/m 10) en de mogelijkheid dat er (meerdere) nieuwe of gemuteerde resistentiegenen kunnen opkomen in de toekomst, is een screeningsmethode die ook deze nieuwe resistentiegenen aantoont gewenst.

Deels geldt bovenstaande ook voor de screening van CPE. De methode die wordt gebruikt voor de screening van CPE in dieren en dierlijke producten maakt gebruik van een combinatie van een fenotypische test (beschreven door het EU referentie laboratorium voor de monitoring van antimicrobiële resistentie in dieren en dierlijke producten <http://www.eurl-ar.eu/233-protocols.htm>) met een moleculaire test, die alleen de carbapenemase genen *bla*_{NDM}, *bla*_{KPC}, *bla*_{VIM} en een deel van de *bla*_{OXA}-genen kan detecteren (31). Deze combinatie maakt de screening heel gevoelig, al is niet bekend of de kweekmethode de meest optimale methode is om alle CPE te kunnen detecteren. Voor de kweekmethode wordt nu gebruik gemaakt van een niet-selectieve ophoping in BPW. Deze ophoping wordt vervolgens afgeënt op selectieve platen (CHROMID® CARBA Agar en CHROMID® OXA-48 agar). De moleculaire methode (RT-PCR, Check MDR CARBA kit) wordt uitgevoerd na een selectieve ophoping (BPW + 0,25 mg/L ertapenem + 50 mg/L vancomycine). Indien een monster positief wordt bevonden, wordt deze afgeënt op MacConkey + 1 mg/L cefotaxime, CHROMID® CARBA Agar, CHROMID® OXA-48 agar en HIS met 0,125 mg/L ertapenem(31).

Hieronder volgt een overzicht van de verder in de literatuur beschreven kweekmethodes voor het selectief vinden van colistine resistente Enterobacterales en voor CPE. Een overzicht is te vinden in tabel 2.3 en 2.4.

2.3 Literatuuroverzicht kweekmethodes voor detectie van colistine resistentie

Er zijn verschillende artikelen gepubliceerd die de gevoeligheid van een kweekmedium beschrijven voor het selectief kweken van colistine resistente Enterobacterales. Zo wordt als eerste het medium SuperPolymixine (of COLISTIGRAM) en de CHROMagar™ COL-APSE plaat ((39, 40) beschreven. Superpolymixine maakt gebruik van een heel oud selectief medium voor Gram-negatieve bacteriën, het zogenaamde eosine methyleen blauw (EMB) medium waaraan daptomycine en amphotericine B zijn toegevoegd. Daptomycine (10 mg/L) is toegevoegd om de groei van Gram-positieve bacteriën nog verder te remmen en amphotericine (5 mg/L) om de groei van schimmels tegen te gaan. Vaak wordt i.p.v. daptomycine vancomycine in groeimedium gebruikt. Echter vancomycine heeft een potentiërende werking t.o.v. colistine, deze is ongewenst in een screeningsagar waarmee je ook laag-resistente bacteriën wilt kunnen isoleren (40). Het EMB medium bevat 3.5 mg/L colistine voor de detectie van colistine resistente isolaten.

De CHROMagar™ COL-APSE is een commercieel medium, geschikt voor isolatie van colistine resistente Gram-negatieve bacteriën. De precieze samenstelling van het medium is niet bekend. Volgens het artikel van Abdul Momin et al., bevat het colistinesulfaat en een niet gespecificeerde oxazolidinon antibiotica (een voorbeeld hiervan is linezolid) in een onbekende concentratie (39).

Abdul Momin et al., heeft CHROMagar™ COL-APSE vergeleken met het Superpolymixine agar beschreven door Nordmann et al. (40) Daarvoor werden 84 isolaten gebruikt (acht intrinsiek colistine resistente isolaten, dertien colistine gevoelige isolaten, vijf *mcr-1* positieve *Acinetobacter baumannii* isolaten en 58 *mcr-1* positieve *E. coli* isolaten). Uit de vergelijking van beide media blijkt dat ze beiden in staat zijn om met een detectielimiet van 10^1 kve/ml colistine resistente isolaten te detecteren. Een uitzondering daarop vormden 8/58 *mcr-1* positieve *E. coli* stammen, die wel door CHROMagar™ COL-APSE met een concentratie van 10^1 kve/ml te detecteren was, maar pas bij $10^2 - 10^3$ kve/ml met Superpolymixine agar. Verder bleek Superpolymixine agar iets meer remming te geven van colistine gevoelige *Salmonella* isolaten. De conclusie was dan ook, dat beide media gebruikt zouden kunnen worden voor de screening van colistine resistente isolaten (39).

Nordmann et al., testten hun Superpolymixine agar met 88 isolaten (één schimmel, vier Gram-positieve coccen, zeven intrinsiek colistine resistente Gram-negatieve isolaten, 45 resistente Gram-negatieve staven waar het resistentiemechanisme niet altijd bekend was (waaronder drie *mcr-1* positieve *E. coli*) en 32 colistine gevoelige Gram-negatieve staven. Uit de testen waarbij pure isolaten werden gebruikt kwam een detectielimiet variërend van $10^1 - 10^2$ kve/ml voor de colistine resistente isolaten en $> 10^6$ voor de colistine gevoelige isolaten, de schimmel en de Gram-positieve isolaten. Dat laat zien dat de colistine gevoelige bacteriën en schimmels goed geremd werden. Ook konden de colistine resistente bacteriën met een detectielimiet van $10^1 - 10^2$ kve/ml teruggevonden worden in faeces, wat aantoont dat de resistente bacteriën goed uit faeces geïsoleerd konden worden met dit medium (40).

In 2019 is een nieuw selectief medium beschreven voor de detectie van colistine resistente isolaten. Het betreft ChromID® Colistine R medium van BioMerieux en werd uitgetest door García-Fernandez *et al.* (41). Dit medium is o.a. getest met 59 monsters besmet met verschillende colistine resistente Enterobacterales isolaten (10^5 kve/ml). De sensitiviteit was daarbij 88.1%. De auteurs gaven aan, dat met name *Enterobacter spp* minder goed gedetecteerd werden en het medium beter presteerde voor *E. coli* en *Klebsiella* isolaten (sensitiviteit van respectievelijk 95% en 96%).

Verder zijn er meerdere publicaties over screening van monsters voor colistine resistente isolaten met ieder hun eigen methode. Zo wordt door Zurfluh *et al.*, humane faeces eerst niet-selectief opgehoopt in Enterobacteriaceae enrichment (EE) broth (BD, Franklin Lakes, USA)., vervolgens is de ophoping afgeënt op een plaat met 4 mg/L colistine, 10 mg/L vancomycine en 5 mg/L amphotericine B. Isolaten die op de plaat groeiden, waarvan bekend was dat die intrinsiek resistent zijn (*Serratia marcescens*, *Proteus spp.*, *Providencia spp* en *Morganella spp*) zijn genegeerd. Uit dit artikel blijkt niet direct, dat de toevoeging van vancomycine heeft geleid tot het niet detecteren van laag-colistine-resistente isolaten (MIC 2-4 mg/L). Zes gevonden isolaten hadden een MIC van 4 mg/L. Dit was ook de concentratie van de plaat. Helaas zijn deze monsters niet vergeleken met een methode zonder voorophoping of met een methode met een selectieve voorophoping, waardoor het niet bekend is of dit invloed zou hebben gehad op de bevindingen van de auteurs (42).

Schrauwen *et al.*, beschrijven de screening van kippenvlees voor *mcr-1* positieve isolaten. Zij gebruiken een DNA-methode (voor het aantonen van *mcr-* genen), naast een kweekmethode. De kweekmethode bestaat uit een niet-selectieve ophoping in TSB. De ophoping is afgeënt op een Cysteine – Lactose – Electrolyte – Deficient (CLED)-colistine agar met 1.5 mg/L colistine en 10 mg/L daptomycine. Zij beschrijven een overgroei van *Serratia sp.* en *Proteus sp.* die er mogelijk voor gezorgd hebben dat van de 53 *mcr-1* positieve monsters er slechts 34 bevestigd konden worden met kweek. Een overzicht van de publicaties is gegeven in tabel 2.3.

Samenvattend, uit het literatuuronderzoek blijkt dat er verschillende concentraties colistine worden gebruikt en dat er soms gebruik gemaakt wordt van een ophoping, met of zonder colistine. Kortom, er is geen eenduidige beschrijving van één methode om colistine resistente isolaten te kweken. In de experimenten zullen daarom verschillende concentraties colistine worden meegenomen en het effect van wel of niet ophopen met of zonder colistine zal worden onderzocht.

Tabel 2.3 Overzicht literatuur beschreven kweekmethoden voor colistine resistente bacteriën

Referentie	Materiaal getest	Moleculair/fenotypisch	Ophopings-medium	Colistine concentratie ophoping (mg/L)	Kweek op agar	Opmerking
(31)	Dierlijke faeces, vlees	+/+	Gebufferd Pepton Water (BPW)	4	MacConkey + 2 mg/L colistine	Alleen PCR positieve monsters gekweekt
(43)	Kippen-vlees	+/+	Tryptic Soy Broth (TSB)	0	Cysteine – Lactose – Electrolye – Deficient (CLED) + 1,5 mg colistine + 10 mg/L daptomycine	
(42)	Humane faeces	-/+	Enterobacteriaceae Enrichment (EE) broth	0	Luria Bertani (LB) agar + 4 mg/L colistine + 10 mg vancomycine + 5 mg/L amphotericine B	
(40)	Isolaten	-/+	-	Nvt	Eosine Methyleen Blauw (EMB) + 3,5 mg/L colistine + 10 mg/L daptomycine + 5 mg/L amphotericine B	Verdunningen van isolaten (colistine gevoelige en colistine resistente) zijn getest
(39)	Isolaten	-/+	-	Nvt	CHROMagar™ COL-APSE + colistine en oxazolidine in onbekende concentratie	
(41)	Gespikete monsters	-/+	9 ml Brain Heart Infusion (BHI) + 1 10 µg disk colistine 3-4 uur incubatie	~1,1 µg/ml	ChromID® Colistine R met colistine in onbekende concentratie	

2.4 Literatuuroverzicht kweekmethodes voor detectie van CPE

Er zijn heel erg veel publicaties die verschillende kweekmethodes beschrijven voor de detectie van CPE. De combinatie van twee reviews (37, 44) levert meer dan 40 publicaties op, waar verschillende kweekmethodes getest zijn. Meerdere publicaties richten zich specifiek op één soort carbapenemase (zoals KPC of OXA-48), waardoor het vergelijken van methodes voor de detectie van alle carbapenemases bemoeilijkt wordt.

In een review door Aguirre-Quiñonero *et al.* (44) wordt voor de screening van CPE in klinische monsters de CDC methode beschreven. Deze CDC screeningstest berust op een selectieve voorophoping (5 ml TSB met 10 µg ertapenem of meropenem disk, resulterend in een eindconcentratie van 2 mg/L ertapenem of meropenem) met daarna een afenting op MacConkey agar. Het nadeel van deze methode is, dat de kolonies op de plaat nog verder geïdentificeerd moeten worden. Verder bleek bij evaluatie van deze methode dat de test variabele sensitiviteit (van 66% tot 99%) en een variabele specificiteit (van 49.6% tot 86.4%) laat zien.

Daarnaast zijn er verschillende chromogene agars beschreven voor de detectie van CPE in klinische monsters, zoals onder andere CHROMID® CARBA Agar (voor alle CPE, behalve OXA-varianten)(45), CHROMID® OXA-48 agar (voor OXA-48 producenten)(46), *Brilliance*™ CRE Agar (47), Chromatic™ CRE en de CHROMagar™ mSuperCARBA™ (voor alle CPE)(48). De sensitiviteit en specificiteit van deze agars zijn variabel in de verschillende onderzoeken (zie tabel 2.4) (46, 49-53). De uitkomst hangt samen met welke isolaten of monsters zijn getest en op welke manier. Een vergelijking van deze agars is daarom moeilijk. In de experimenten zullen daarom zoveel mogelijk verschillende selectieve agars meegenomen worden.

Ook uit dit literatuuronderzoek blijkt dat er veel verschillende methodes beschreven zijn. Allen met hun voor- en nadelen. In de experimenten zullen in ieder geval de verschillende commerciële agars naast elkaar getest worden en zal ophoping met en zonder een carbapenem in het medium meegenomen worden, naast een methode zonder ophoping.

Tabel 2.4 Vergelijking van verschillende CPE selectieve platen beschreven in de literatuur

Refe- ren- ties	Jaar	# isolaten	Selectieve agars:		Brilliance™ CRE Agar		CHROMID® OXA-48 agar¹		CHROMID® CARBA Agar²		CHROMagar™ mSuper- CARBA™		CHROMagar™ KPC		Chromatic™ CRE	
			Se (%)	Sp (%)	Se (%)	Sp (%)	Se (%)	Sp (%)	Se (%)	Sp (%)	Se (%)	Sp (%)	Se (%)	Sp (%)		
(49)	2013	255	94	71												
(46)	2013	117			95 (OXA), 0 (CPE)	100	22(OXA), 90 (CPE)	68	98(OXA), 90(CPE)	53						
(52)	2013	142	76	57							43	68				
(50)	2017	45 + 211 swabs								100	100					
(51)	2019	200								98						
(53)	2020	109	99	60	35	100	86	88							94	60

Se=sensitiviteit; sp=specificiteit

¹Detecteert alleen isolaten met productie van OXA-type carbapenemases;

²Detecteert CPE met uitzondering van OXA-type carbapenemases

3 Materiaal en methoden

3.1 Experimenten colistine resistentie

Achtentwintig isolaten met verschillende gevoeligheid voor colistine als gevolg van verschillende resistentiemechanismen (geen, chromosomaal, *mcr-genen*) zijn meegenomen in de experimenten (zie appendix 1). De experimenten bevatten de media beschreven in paragraaf 2.3 en bestaan uit drie stappen:

1. Groei beoordelen op verschillende selectieve agarplaten:
 - MacConkey en Ethyleen Methyl Blauw (EMB) met verschillende concentraties colistine
 - CHROMagar™ COL-APSE (MASTgroep, CHROMagar)
 - CHROMID® ColR (bioMérieux).

De platen werden beënt met een reïncultuur van het betreffende isolaat. Groei werd gescoord als er verder dan de eerste entstreep groei op de plaat te zien was. Groei alleen in de eerste entstreep werd gescoord als 'geen groei'.

2. Uittesten van het effect van wel of geen verrijkingstap (ophoping) met en zonder colistine in het ophopingsmedium. Hiervoor zijn 10 isolaten gebruikt, twee colistine gevoelig en acht colistine resistent (zie appendix 1).
3. Gekozen methode uit stap 1 & 2 uittesten met faecesmonsters waaraan colistine resistente isolaten zijn toegevoegd.

De details over de verschillende methoden zijn beschreven bij de resultaten.

3.2 Experimenten CPE

Zeventien CPE isolaten met verschillende gevoeligheid voor carbapenems (zie appendix 2) zijn meegenomen in de experimenten. De experimenten bestaan uit twee stappen:

1. Groei beoordelen op verschillende selectieve agarplaten
 - CHROMID® CARBA Agar (bioMérieux).
 - CHROMID® OXA-48 agar (bioMérieux).
 - CHROMagar™ mSuperCARBA™ (MASTgroep, CHROMagar)
 - *Brilliance*™ CRE Agar
2. Het effect van wel of geen verrijkingstap met wel of geen selectief (met ertapenem of meropenem) ophopingsmedium uittesten op faecesmonsters waaraan CPE isolaten zijn toegevoegd.

De details over de verschillende methoden zijn beschreven bij de resultaten.

3.3 IMPART project

Het RIVM heeft binnen het One Health European Joint Programme (OH-EJP) project Improving Phenotypic Antimicrobial Resistance Testing (IMPART) deelgenomen aan Work Package (WP) 1 ("*Selective isolation, detection and characterization of colistin-resistant Enterobacteriaceae*") en WP2 ("*Selective isolation, detection and characterization of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae*"). Voor zowel WP1 als WP2 is een pilot ringonderzoek uitgevoerd op laboratoria van vier

verschillende instituten, waaronder het RIVM (zie voor de verslagen van de pilotonderzoeken:

<https://zenodo.org/record/3676404#.X9c1dchKg2w> (WP1) en <https://zenodo.org/record/3676437#.X9c0oMhKg2w> (WP2)). Hierna heeft in 2019 een groot ringonderzoek voor validatie van de verschillende kweekmethoden op elf Europese laboratoria plaatsgevonden voor WP1 en WP2. Eén lab heeft alle monsters klaargemaakt voor rondzending. De projectleider is Dr. Veldman van WUR/WBVR, waar de nationale diersurveillance naar antibioticum resistentie plaatsvindt. Het project is dan ook in nauwe samenwerking met WBVR uitgevoerd.

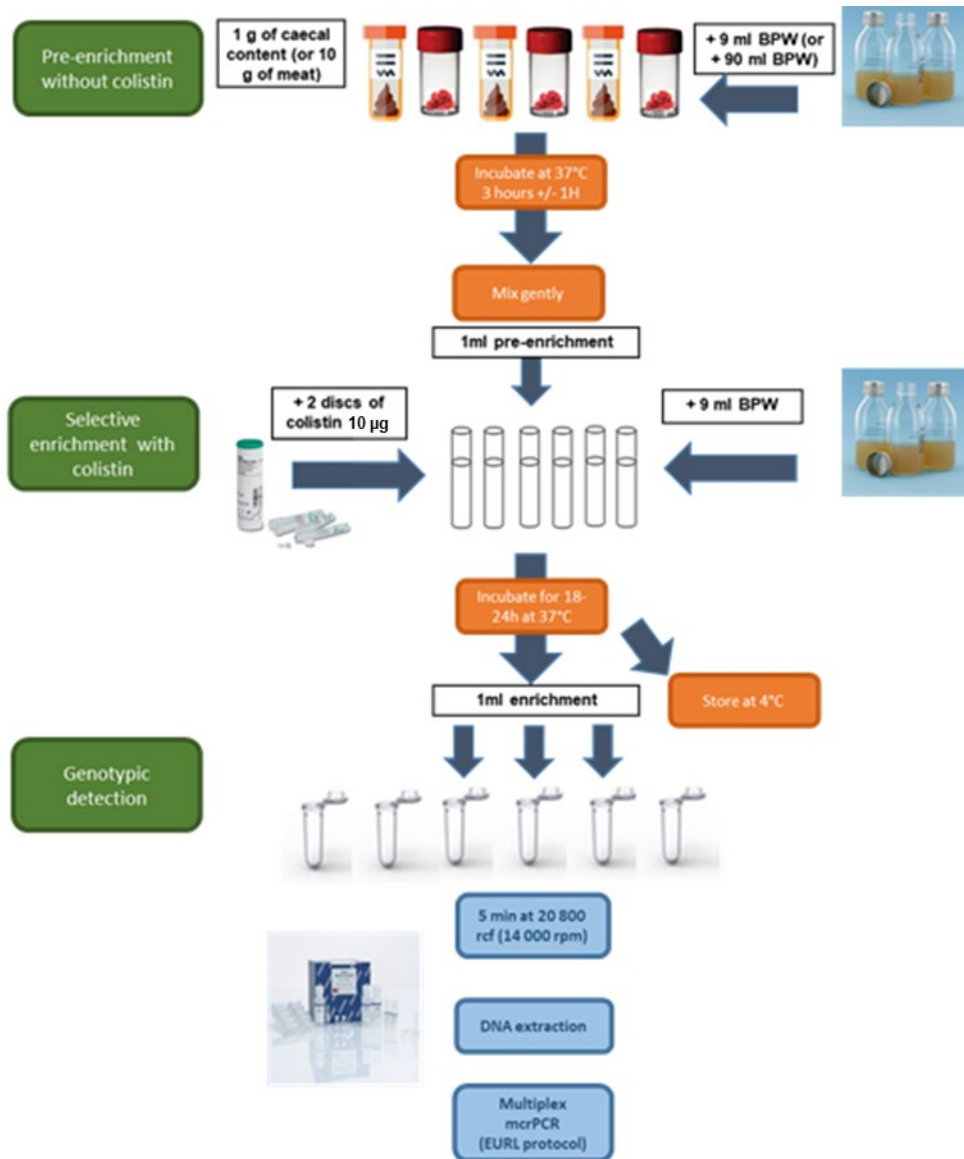
3.3.1 WP1 "Selective isolation, detection and characterization of colistin-resistant Enterobacteriaceae "

Voor het onderzoek in WP1 zijn vier colistine resistente isolaten (twee *E. coli* en twee *Salmonella*) gebruikt met een MIC van 4-8 mg/L om vlees en caecum monsters te spiken met een eindconcentratie van 100 kolonievormende eenheid (kve)/gram monster. Daarnaast werden twee blanco monsters (zonder colistine resistente isolaten) meegenomen. (tabel 3.3.1)

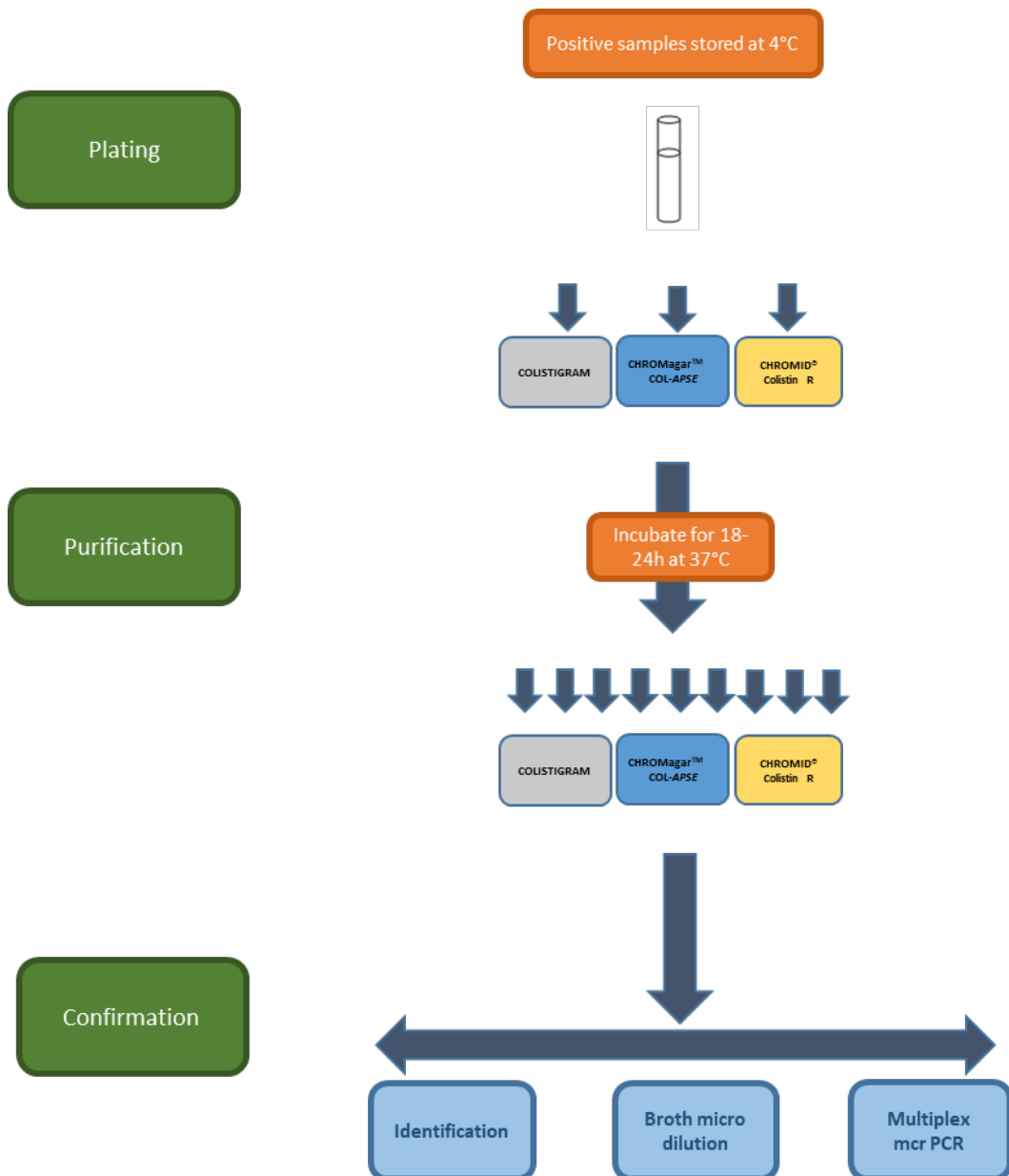
Table 3.3.1 Matrix en bacteriën gebruikt in WP1

Monster	Matrix	Matrix afkomstig van	Toegevoegde bacterie	Colistine MIC (mg/L)	mcr genen	Referentie
C-1	Caecum	Varken	<i>E. coli</i>	4	<i>mcr-1</i>	(54)
C-2	Caecum	Varken	<i>E. coli</i>	4	<i>mcr-3</i>	(54)
C-3	Caecum	Varken	Blanco	-	-	-
M-1	Vlees	Kalkoen	<i>Salmonella</i> 4,12:i:-	4	<i>mcr-4</i>	(54)

Deze monsters zijn vervolgens gekoeld opgestuurd naar de verschillende laboratoria, waar analyse direct werd uitgevoerd volgens het protocol, weergegeven in figuur 3.3.1a en 3.3.1b. Er is alleen gebruik gemaakt van commercieel beschikbare agars (Colistigram = SuperPolymixine™ (Kitvia, (ELITech MICROBIO)), CHROMagar™ COL-APSE (MASTgroep, CHROMagar) en CHROMID® Colistin R (bioMérieux). De ophoping bestond uit een niet-selectieve korte (3 uur) voorophoping in BPW, waarna één milliliter van deze voorophoping in een 10 ml selectieve ophoping met 2 mg/L colistine werd gebracht. Er is toch voor ophoping met colistine gekozen, ondanks dat eerdere experimenten lieten zien dat resistente isolaten dan soms gemist kunnen worden. Echter in het vooronderzoek werd veel overgroei van stoorflora gevonden, die op deze manier beter geremd wordt (bleek uit experimenten gedaan bij ANSES). Door van een niet-selectieve voorophoping 1 ml over te brengen naar een ophopingsmedium met colistine wordt voorkomen dat de werking van colistine wordt geremd door de faeces. Naast het toevoegen van deze ophopingsmethode is ook besloten om in het protocol een moleculaire voorscreening op te nemen voor de *mcr*-genen 1 t/m 5 (zie figuur 3.3.1a) met behulp van PCR. Indien een monster positief werd bevonden in de PCR voor één van de *mcr*-genen, werd de selectieve ophoping van dat monster uitgeplaat op de drie commerciële platen en verder onderzocht (zie figuur 3.3.1b).



Figuur 3.3.1a Protocol WP1 deel 1: pre-enrichment, enrichment en PCR.



Figuur 3.3.1b: Protocol WP1 deel 2: uitplaten en bevestiging van aanwezigheid van colistine resistentie

3.3.2

WP2 "Selective isolation, detection and characterization of carbapenemase producing *Enterobacteriaceae*"

Voor het onderzoek in WP2 zijn zes verschillende CPE stammen meegenomen, waarmee drie vlees- en drie caeca monsters zijn gespiked met 100 kve/gram. De isolaten hadden verschillende MIC waarden voor carbapenems. Twee monsters bevatten geen CPE bacteriën (blanco's). Er is gekozen om de belangrijkste CPE-genen mee te nemen (zie tabel 3.3.2).

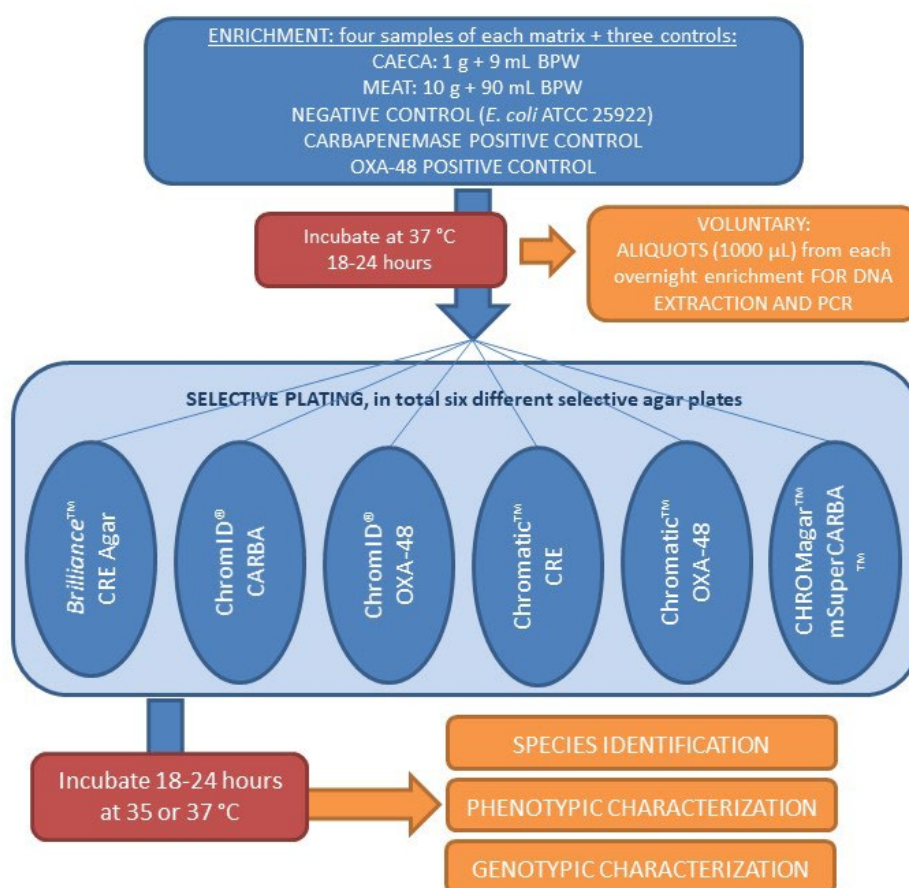
Tabel 3.3.2 Matrix en bacteriën gebruikt in WP2 voor detectie van CPE

Mon-ster	Matrix	Matrix afkomstig van	Bacterie toegevoegd	Carba-penemase gen	Meropenem MIC (mg/L)	Ertapenem MIC (mg/L)	Imipenem MIC (mg/L)	Referentie
C-1	Caecum	Varken	Blanco	-	-	-	-	-
C-2	Caecum	Varken	<i>E. coli</i> NCTC 13476	<i>bla</i> _{IMP}	2	>2	2	WBVR
C-3	Caecum	Varken	<i>K. pneumoniae</i> NCTC 13442	<i>bla</i> _{OXA-48}	4	>2	16	WBVR
C-4	Caecum	Varken	<i>E. coli</i> R1180	<i>bla</i> _{VIM-1}	0.25	0.06	4	(55)
M-1	Vlees	Kalkoen	Blanco	-	-	-	-	-
M-2	Vlees	Kalkoen	<i>K. pneumoniae</i> ATCC BAA-1705	<i>bla</i> _{KPC-2}	>16	>2	16	WBVR
M-3	Vlees	Kalkoen	<i>E. coli</i> 16874	<i>bla</i> _{OXA-48}	1	2	2	WBVR
M-4	Vlees	Kalkoen	<i>S. Kentucky</i> 2014LSAL00827	<i>bla</i> _{NDM-1}	2	1	1	(56)

Vervolgens zijn de monsters net zoals in WP1 gekoeld verstuurd naar de verschillende laboratoria waar de analyses zoals weergegeven in figuur 3.3.2 direct plaatsvonden. Er werd begonnen met een niet-selectieve ophoping, zoals beschreven is in het protocol van het EU referentielaboratorium voor de detectie van CPE in vlees en caeca monsters (57, 58). Na ophoping is er uitgeplaat op zes verschillende commerciële selectieve agars, namelijk:

1. *Brilliance*[™] CRE Agar,
2. CHROMID[®] CARBA Agar,
3. CHROMID[®] OXA-48 agar,
4. Chromatic[™] CRE,
5. Chromatic[™] OXA-48 and
6. CHROMagar[™] mSuperCARBA[™].

Vervolgens werden de gevonden koloniën bevestigd voor de aanwezigheid van CPE-genen met behulp van PCR.



Figuur 3.3.2 Protocol WP2: Ophoping en uitplaten

3.4 Colistine prevalentie in de algemene bevolking en in veterinaire zorgmedewerkers

Om de prevalentie van colistine resistentie te bepalen in de algemene bevolking en onder personen die werkzaam zijn in de diergeneeskundige zorg in Nederland zijn faecesmonsters onderzocht op de aanwezigheid

van colistine resistentie *E. coli* en/of *Klebsiella pneumoniae* (ColR-E/K) (zie ook rapport AREND studie 2021-0029). Hiervoor werd met een swab faecesmateriaal in 5 ml gebufferd pepton water (BPW, BioTrading) met 2 mg/L colistine (colistine sulfaat, Sigma) gebracht. Na 18 uur bebroeden bij 37°C is deze ophoping afgeënt op ChromID® Colistine R agar (Biomérieux) en geïncubeerd voor 18 uur bij 37°C. Eén kolonie per kleur (paars, blauw of roze) werd afgeënt op een bloedplaat (Colombia agar met 5% schapenbloed, Oxoid). Bacterie species werd bepaald met behulp van MALDI-tof.

Voor de ColR-E/K positieve isolaten is de mate van gevoeligheid voor het antibioticum colistine bepaald met behulp van de micro bouillon verdunningstest (Biotrading) waarbij de 'minimal inhibitory concentration (MIC)' is bepaald. Dit is de referentiemethode voorgeschreven door EUCAST (59). De MIC is de laagste concentratie van een antibioticum dat zichtbare groei van een micro-organisme verhindert. ColR-E/K positieve isolaten (isolaten met een MIC groter dan 2 mg/L) zijn met behulp van PCR getest op de aanwezigheid van resistentiegenen *mcr 1-9* (54, 60-64).

Alle colistine resistente isolaten zijn geanalyseerd met behulp van Whole Genome Sequencing (WGS). Alle *mcr*-positieve isolaten zijn onderzocht met behulp van long read sequencing om zo de plasmiden te kunnen reconstrueren.

Voor beide studies waren vragenlijsten van deelnemers beschikbaar met vragen over mogelijke risicofactoren, zoals voor de AREND studie aard van de werkzaamheden, aantal uren diercontact, contact met verschillende diersoorten, en voor zowel de AREND als de PIENTER-3 studie gezondheid en medicatiegebruik, algemene hygiëne en vrijetijdsbesteding zoals reizen naar het buitenland. Zie ook een eerdere publicatie over de PIENTER-3 studie (65).

4 Resultaten

4.1 Experimenten Colistine resistentie

4.1.1 Groei beoordelen op verschillende selectieve agarplaten.

Er zijn 26 isolaten getest, waaronder vijftien gevoelig voor colistine, zeven resistent voor colistine zonder *mcr*-gen en vier isolaten resistent voor colistine met *mcr*-resistentie gen. De bacteriespecies waren *E. coli*, *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter cloaca*, *Citrobacter freundii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens* en *Salmonella* Paratyphi. (zie ook annex 1).

De onderzochte agars waren MacConkey met colistine (1,5; 2; 3,5; en 4 mg/L) en zonder colistine, EMB, TBX en CHROMagar™ ECC met colistine (3,5 mg/L) en zonder, Brilliance E.coli/coliform selective agar (BECSA) zonder colistine en CHROMID® ColR plaat. In onderstaande tabel staat weergegeven hoeveel isolaten groeiden op de betreffende plaat. De CHROMagar™ ECC liet als enige plaat veel groei van colistine gevoelige isolaten zien, ook bijna alle resistente isolaten (10/11) groeiden op deze plaat, net als bij MacConkey met 1,5 mg/L colistine. MacConkey met een hogere concentratie colistine zorgde voor weinig groei van resistente isolaten. CHROMID® ColR (met onbekende colistine concentratie) en EMB met 3,5 mg/L colistine lieten beiden groei van 9/11 resistente isolaten zien.

Tabel 4.1.1 Aantal isolaten dat groeit op de verschillende agar platen

Type agar		Colistine gevoelige isolaten (n=15)	Colistine resistente isolaten (n=11)
Zonder colistine	MacConkey	15	11
	EMB	14	11
	TBX	15	11
	CHROMagar™ ECC	12	11
	BECSA	8	11
Met colistine (mg/L)	MacConkey (1,5)	1	10
	MacConkey (2)	1*	5
	MacConkey (3,5)	0	3
	MacConkey (4)	0	3
	EMB (3,5)	0	9
	TBX (3,5)	0	6
	CHROMagar™ ECC (3,5)	13	10
	CHROMID® ColR (bioMérieux, colistine concentratie onbekend)	2	9

*dit isolaat had in eerste instantie een MIC van 4 mg/L (resistent), maar bij twee opeenvolgende MIC bepalingen respectievelijk 1 mg/L en <= 1mg/L (gevoelig)

4.1.2 Uittesten van het effect van wel of geen verrijkingsstap met een wel of niet- selectief ophopingsmedium.

In dit experiment is gebruik gemaakt van EMB medium. Dit presteerde in het eerste experiment net zo goed als ChromID Colistine R agar voor de detectie van colistine resistente isolaten, maar heeft als voordeel dat

de colistine concentratie in het medium bekend is en dat dit medium gevoelige isolaten het beste remde.

In dit experiment wordt het effect van een verrijkingsstap onderzocht op het kweken van verschillende bacteriën (reincultures). In onderstaande tabel staan het aantal isolaten dat groei liet zien op agarplaten (EMB zonder en met 3,5 mg/L colistine) van het aantal gevoelige (n=2) en resistente (n=8) isolaten die bij verschillende ophopingen (Gebufferd Pepton Water (BPW) zonder en met 1,5; 2; 3,5 mg/L colistine) groeiden. De gevoelige isolaten worden goed geremd door colistine toe te voegen aan de agarplaat of door colistine toe te voegen aan het opkweekmedium. Verder worden meer resistente isolaten teruggevonden bij 0 mg/L colistine in het ophopingsmedium. Colistine in het ophopingsmedium zorgt ervoor dat gevoelige isolaten niet meer groeien op de platen met of zonder colistine, maar hoe hoger de colistine concentratie hoe minder colistine resistente isolaten groeiden. Dus om zo gevoelig mogelijk resistente isolaten te kunnen kweken is het het beste om geen colistine aan het ophopingsmedium toe te voegen. Echter moet dit ook uitgetest worden in een test met aanwezigheid van stoorflora (zoals faecesmonsters zie 4.1.3).

Tabel 4.1.2 Aantal isolaten met groei op de EMB zonder (0 mg/L) en met (3,5 mg/L) colistine na ophoping in gebufferd Pepton Water (BPW) met verschillende concentraties colistine. De isolaten zijn in twee (10^2 en 10^3) concentraties aan BPW toegevoegd.

	Colistine gevoelige isolaten (n=2)		Colistine resistente isolaten (n=8)	
	10^2 kve/ml	10^3 kve/ml	10^2 kve/ml	10^3 kve/ml
BPW met colistine (mg/L)				
0	2/0*	2/0*	8/8*	8/7*
1,5	0/0*	0/0*	6/6*	6/6*
2	0/0*	0/0*	5/5*	6/6*
3,5	0/0*	0/0*	4/4*	5/5*

*resultaat op respectievelijk: EMB plaat zonder colistine/EMB plaat met 3.5 mg/L colistine

4.1.3

Gekozen methode uit 4.1.2 uittesten met faecesmonsters waaraan colistine resistente isolaten zijn toegevoegd.

In onderstaande tabel is een kwalitatieve score te zien van groei van colistine gevoelige (n=2) en colistine resistente (n=8) isolaten die toegevoegd zijn aan kippenfaecesmonsters in twee verschillende concentraties (10^2 en 10^3 kve/ml). Het betreft alleen beoordeling van groei op de plaat (zonder bevestiging) in vergelijking tot een blanco kippenfaecesmonster. De monsters zijn direct afgeënt, maar ook is een ophoping met (2 mg/L) en zonder colistine gebruikt. De gebruikte bacteriespecies zijn *E. coli*, *Klebsiella oxytoca*, *Acinetobacter baumannii*, *Enterobacter cloaca*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens* en *Salmonella Paratyphi*. De CHROMagar™ COL-APSE plaat liet veel overgroei op de plaat zien van *Proteus species*, waardoor de platen niet te beoordelen waren, deze resultaten zijn daarom niet opgenomen in onderstaande tabel. De EMB plaat lijkt vaker groei te laten zien van de toegevoegde bacteriën, echter daarbij moet vermeld worden dat de morfologie op de EMB platen moeilijk te beoordelen is. Daarom zijn deze resultaten minder betrouwbaar. De CHROMID® ColR plaat was het best te beoordelen doordat verschillende bacteriespecies verschillende

kleuren laten zien op de plaat. Echter met deze kwalitatieve analyse werd slecht in 3 van de 8 keer groei opgemerkt op de CHROMID® CoLR die leek op groei van het isolaat dat was toegevoegd aan de vleeskuikenfaeces. Directe afenting lijkt bij de EMB platen beter te werken dan de ophopingen, maar bij een concentratie van 10^2 kve/ml afgeënt op CHROMID® CoLR plaat was minder vaak specifieke groei te zien na directe afenting van het faecesmonster. Ophoping met of zonder colistine laat niet veel verschil zien. Het lijkt erop dat de EMB plaat met 2 mg/L colistine vaker specifieke groei laat zien dan EMB met 3,5 mg/L. Dit experiment zou herhaald moeten worden waarbij niet alleen de groei wordt gescoord, maar ook met aanvullende testen (MaldiTof, PCR en gevoeligheidsbepalingen) bepaald wordt of de juiste bacterie groeit op de plaat. Dit is binnen dit project niet gelukt.

Tabel 4.1.3 Kwalitatieve score van groei van colistine gevoelige en colistine resistente isolaten die toegevoegd zijn aan kippenfaecesmonsters in twee verschillende concentraties (10^2 en 10^3 kve/ml). De geobserveerde groei is niet bevestigd met aanvullende testen.

	Colistine gevoelige isolaten (n=2)		Colistine resistente isolaten (n=8)	
	10^2	10^3	10^2	10^3
Aantal bacteriën kve/ml	10^2	10^3	10^2	10^3
EMB 2 mg/L	1/0/0*	0/0/0*	7/3/4*	6/4/5*
EMB 3,5 mg/L	1/0/0*	0/0/0*	3/1/1*	4/4/3*
CHROMID® CoLR	0/0/0*	0/0/0*	1/3/3*	3/3/3*

*drie resultaten voor: geen ophoping/ ophoping met BPW zonder colistine / ophoping met BPW met 2 mg/L colistine

Note: CHROMagar™ COL-APSE was ook meegenomen, maar deze platen waren niet te beoordelen als gevolg van overgroei van *Proteus sp.*

4.2 Experimenten CPE

4.2.1 Groei beoordelen op verschillende selectieve agarplaten

In het experiment zijn tien non-OXA CPE meegenomen (*bla*_{KPC} en *bla*_{NDM} positieve isolaten) en zeven *bla*_{OXA-48} varianten (zie appendix 2).

Brilliance™ CRE Agar detecteerde 9/10 CPE en 4/7 OXA-varianten.

Zowel CHROMagar™ mSuperCARBA™ en CHROMID® CARBA Agar detecteerde alle 10/10 CPE isolaten. CHROMagar™ mSuperCARBA™ zou ook OXA-varianten moeten kunnen detecteren op de plaat, maar vond slechts 2/7 OXA-varianten en van één ook slechts enkele koloniën op de plaat. CHROMID® OXA-48 Agar detecteerde alle 7/7 OXA-varianten en zoals verwacht geen andere CPE-isolaten (met *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}). Zowel CHROMagar™ mSuperCARBA™ en CHROMID® CARBA Agar detecteerde alle CPE isolaten. Zie tabel 4.2.1.

Tabel 4.2.1 Aantal CPE en OXA isolaten dat groeide op verschillende selectieve media

	CPE isolaten (KPC, NDM, n=10)	OXA-varianten (OXA-48 en OXA-181, n=7)
Brilliance™ CRE	9	4
CHROMagar™ mSuperCARBA™	10	2
CHROMID® CARBA Agar	10	0
CHROMID® OXA-48 agar	0	7

4.2.2 *Uittesten van het effect van wel of geen verrijkingstap met een wel of niet- selectief ophopingsmedium met faecesmonsters waaraan CPE isolaten zijn toegevoegd*

In totaal zijn tien non-OXA CPE isolaten en zeven OXA isolaten in twee verschillende concentraties (eindconcentraties 10^2 en 10^4 kve/ml faeces) toegevoegd aan zeventien vleeskuikenfaeces-monsters (één isolaat per monster). Vervolgens is een swab gebruikt om de verschillende media te beënten. In onderstaande tabel staat aangegeven bij hoeveel monsters er groei te zien was op de verschillende agarplaten, na:

- directe afenting (zonder ophoping)
- overnacht ophoping in 5 ml TSB
- overnacht ophoping in 5 ml TSB met 10 µg ertapenem (ETP10) en
- overnacht ophoping in 5 ml TSB met 10 µg meropenem (MEM10).

Bij een lagere concentratie van de isolaten (10^2 kve/ml) is de niet-selectieve ophoping in TSB het beste in staat (sensitiviteit van 93%) om de isolaten te kweken op de verschillende agarplaten. Voor de OXA-isolaten werkt de CHROMID® OXA-48 agar plaat het beste (71-86% sensitiviteit). Als de niet-selectieve ophoping in TSB wordt gebruikt worden alle CPE isolaten op CHROMID® CARBA Agar teruggevonden en alle OXA-positieve isolaten op CHROMID® OXA. De conclusie is dan ook dat niet-selectieve ophoping en het gebruik van een combinatie van CHROMID® CARBA Agar en CHROMID® OXA-48 in dit experiment tot 100% sensitiviteit leidt. Hierbij moet vermeld worden dat de methode voor selectieve ophoping (overgenomen van de CDC methode, beschreven in paragraaf 2.4) een hoge concentratie carbapenem in het ophopingsmedium heeft, waardoor verklaard kan worden dat niet alle CPE isolaten gedetecteerd werden. Het effect van een lagere concentratie in het ophopingsmedium is niet getest.

Tabel 4.2.2 Aantal monsters dat groei liet zien was op verschillende selectieve agar platen na directe afenting (zonder ophoping), na ophoping in 5 ml TSB, na ophoping in 5 ml TSB met 10 µg ertapenem disk (ETP10) en na ophoping in 5 ml TSB met 10 µg meropenem disk (MEM10).

Plaat	Concentratie (kve/ml)	Direct		TSB		TSB ETP10 (2 mg/L erta)		TSB MEM10 (2 mg/L mero)		Totaal (n) Sensitiviteit(%)	
		CPE (n=10)	OXA (n=7)	CPE (n=10)	OXA (n=7)	CPE (n=10)	OXA (n=7)	CPE (n=10)	OXA (n=7)	CPE (n=30)	OXA (n=21)
Brilliance™ CRE Agar	10 ² /10 ⁴	6/9	1/3	9/9	4/5	-	-	4/6	1/1	19/24	6/9
mSuper-Carba	10 ² /10 ⁴	9/9	5/6	9/9	5/6	-	-	4/6	1/2	63/80	29/43
CHROMID® CARBA Agar#	10 ² /10 ⁴	7/10	0#/0#	10/10	3#/5#	-	-	4/7	0#/0#	22/24	11/14
CHROMID® OXA-48 agar*	10 ² /10 ⁴	0*/0*	4/6	0*/0*	7/7	0*/0*	5/5	-	-	73/80	52/67
										21/ 27	3#/5#
Totaal (n)		22/ 28	10/15	28/ 28	19/23	0/0	5/5	12/19	2/3	70/ 90	15/18
Sensitiviteit (%)		73/ 93	33/50	93/ 93	53/64		100/ 100	40/63			71/86

De resultaten geven de aantal monsters dat groei liet zien bij een concentratie van respectievelijk 10²/10⁴ CPE bacteriën.

Dikgedrukt: de hoogste waarden (per concentratie)

Erta=ertapenem; mero=meropenem

* CHROMID® OXA-48 plaat is selectief voor OXA-isolaten

ChromID® CARBA plaat is selectief voor non-OXA CPE isolaten

4.3 IMPART project

4.3.1 WP1 "Selective isolation, detection and characterization of colistin-resistant Enterobacteriaceae"

De resultaten van 10 van de 11 deelnemende laboratoria zijn meegenomen. Eén laboratorium had de monsters bij aankomst ingevroren en is op een andere dag begonnen met de analyses, de resultaten van dit lab zijn niet meegenomen. Allereerst is een PCR uitgevoerd op de overnacht ophoping in BPW met 2 mg/l colistine van alle monsters. Alleen de monsters die positief waren in de PCR zouden worden uitgeplaat op selectieve platen. *Mcr-1* is door alle labs met de PCR uit de ophoping gedetecteerd, *mcr-3* door negen labs, *mcr-4* door zes labs en *mcr-5* door geen enkel lab. Alle labs hadden geen *mcr*-genen gevonden in de blanco monsters. De specificiteit van de PCR op het DNA van de ophoping was 100%, maar de sensitiviteit was 86%.

In onderstaande tabel staan de kweekresultaten. Geen enkel lab heeft de blanco monsters en het monster met *mcr-5* gekweekt, omdat de PCR in deze monsters negatief was. De andere monsters zijn soms, ondanks een negatieve PCR toch gekweekt. Uit onderstaande tabel blijkt dat CHROMID® Colistin R een sensitiviteit had van 86% voor het detecteren van de juiste bacterie met het juiste *mcr*-gen wat hoger was dan de sensitiviteit van de CHROMagar™ COL-APSE (75%) en de COLISTIGRAM (70%).

Tabel 4.3.1 Aantal labs (van 10 labs totaal) per selectieve plaat met detectie van de juiste bacterie met het juiste *mcr*-gen per monster

	CHROMID® Colistin R	CHROMagar™ COL-APSE	COLISTIGRAM
C-1 (<i>E. coli</i> met <i>mcr-1</i>)	10	8	8
C-2 (<i>E. coli</i> met <i>mcr-3</i>)	9	7	7
M-1 (Salmonella 4,12:i:- met <i>mcr-4</i>)	6	3	1
Sensitiviteit (%)	86	75	70

4.3.2 WP2 "Selective isolation, detection and characterization of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae"

Van de 10 laboratoria die deelnamen aan de kweekexperimenten, hadden zeven laboratoria alle testen (bevestiging van bacterie species en gen op alle platen) uitgevoerd. De resultaten van deze zeven laboratoria zijn weergegeven in tabel 4.3.2. Twee monsters (C-4 en M-4) bleken bij herhaling geen stabiele resultaten op te leveren. Monster C-4 omdat het isolaat met *bla_{VIM-1}* in dit monster een erg lage carbapenem MIC (0.25 mg/L voor meropenem en 0.06 mg/L voor ertapenem) had en daardoor met deze methode niet te detecteren was en monster M-4 omdat het carbapenemase gen *bla_{NDM-1}* teruggevonden werd in verschillende bacteriespecies, mogelijk als gevolg van plasmide uitwisseling tussen verschillende bacteriën in het monster. Als die twee monsters niet meegenomen worden bij de berekening van de sensitiviteit bleek de CHROMID® OXA-48 het best de OXA-varianten te kunnen detecteren en de Chromatic™ CRE en CHROMID® CARBA agar de CPE isolaten (beiden 100% sensitiviteit). CHROMagar™ mSuper CARBA™ presteerde bijna net zo goed (sensitiviteit 96%). Hierbij moet

wel opgemerkt worden dat de scores gebaseerd zijn op zeer weinig verschillende isolaten (n=4). Carbapenemes met lage MIC waarden, zoals de *bla_{VIM-1}*, kunnen met deze methode gemist worden.

Tabel 4.3.2 Resultaat van detectie van de juiste bacterie met het juiste CPE gen van zeven laboratoria die van alle platen alle resultaten (bacterie en gen) hebben gemeld.

Monster	Bacterie	OXA-48 detectie		OXA-48 en niet-OXA-48 CPE detectie			niet-OXA-48 CPE detectie
		CHROMID® OXA-48 Agar	Chromatic™ OXA-48	Brilliance™ CRE Agar	CHROM-agar™ mSuper CARBA™	Chromatic™ CRE	CHROMID® CARBA Agar
Caecum	C-1 blanco	0*	0*	0*	0*	0*	0*
	C-2 EC IMP	0*	0*	7	7	7	7
	C-3 KP OXA-48	7	1	7	7	7	0*
	C-4 EC VIM-1	0*	0*	0	0	0	0
Vlees	M-1 blanco	0*	0*	0*	0*	0*	0*
	M-2 KP KPC-2	0*	0*	7	7	7	7
	M-3 EC OXA-48	7	5	0	6	7	0*
	M-4 SK NDM-1	0*	0*	6	2	4	1
Totale score	n	14	6	27	29	32	15
Specificiteit	%	100	100	100	100	100	100
Sensitiviteit	%	100	43	64	69	76	54
Sensitiviteit#	%	100	43	75	96	100	100

(EC)= *E. coli*, (KP)= *Klebsiella pneumoniae*, (SK) =*Salmonella* Kentucky. (*)= het isolaat zou niet moeten groeien op deze plaat.

#Sensitiviteit zonder monster C-4 en M-4. Monster C-4 was gespiked met een stam, die niet erg resistent was voor meropenem (lage MIC), wat het moeilijk maakte om deze te kweken op de selectieve plaat. Monster M-4 bleek verschillende bacteriesoorten met NDM te bevatten. Mogelijk door plasmide overdracht of door besmetting tijdens het klaarmaken van de monsters. Hierdoor hadden veel labs niet de juiste bacteriesoort gemeld.

4.4 Prevalentiestudie colistine resistentie in de algemene bevolking en bij veterinaire zorgmedewerkers

4.4.1 Prevalentie

De prevalentie van colistine resistente *E. coli* en *K. pneumoniae* in de algemene bevolking (PIENTER -3 studie 2016-2017) was 5.4% (36/661; 95%BI 4.0-7.5%) en onder mensen werkzaam in de veterinaire zorg in Nederland (AREND studie 2018-2019) was de prevalentie 8.1% (39/482; 95% BI 6.0-10.9%) (zie ook rapport AREND-studie 2021-0029). De prevalentie onder mensen werkzaam in de veterinaire zorg was niet significant afwijkend van de prevalentie in de algemene bevolking. Bij vijf mensen uit de algemene bevolking werd een *mcr*-gen in het colistine resistente isolaat aangetroffen en in een isolaat van één persoon uit de AREND studie (zie tabel 4.4.2a).

Een aantal karakteristieken van de deelnemers van de twee onderzochte populaties zijn weergegeven in tabel 4.4.1. Verder moet opgemerkt worden dat de monsters uit de AREND studie direct zijn gekweekt bij binnenkomst, terwijl de faecesmonsters uit de PIENTER-3 studie opgeslagen waren bij -70°C.

Tabel 4.4.1 Eigenschappen van de twee onderzochte populaties: de algemene bevolking (PIENTER-3 studie) en personen werkzaam in de diergeneeskundige zorg (AREND studie) en de prevalentie van colistine resistente (ColR) isolaten in de twee populaties.

	PIENTER-3 studie (n=661)	AREND studie (n=482)
Gemiddelde leeftijd	50	40
Range leeftijd	18-85	20-70
Percentage vrouwen	61%	85%
Percentage mannen	39%	15%
Prevalentie ColR isolaten	5.4%	8.1%
	(95%BI 4.0-7.5%)	(95%BI 6.0-10.9%)

4.4.2 Moleculaire analyse colistine resistentie mechanismen

In tabel 4.2.2a staat van de zes isolaten met een *mcr*-gen aangegeven om welk gen het gaat en op welk plasmide het gen lag. Voor één isolaat was dit laatste met de gebruikte analyses niet vast te stellen. Isolaat van deelnemer PIENTER-3 droeg twee verschillende *mcr*-genen op twee verschillende plasmiden. Dit is de eerste keer dat *mcr-8* is beschreven in isolaten uit Nederland. Daarnaast is voor het eerst dat *mcr-1* is beschreven op een IncI1 plasmide in een *Klebsiella pneumoniae*. In tabel 4.2.2a zijn ook leeftijd, geslacht, geboorteland en afkomst van de deelnemers te zien. Opvallend is dat vier van de zes deelnemers met *mcr*-genen geboren zijn in Suriname. In beide deelnemers met *mcr-8* genen werd het gen op een IncF plasmide gevonden. De *mcr-1* genen afkomstig uit deelnemers geboren in Nederland werden op IncX4 plasmiden gevonden, de *mcr-1* genen uit deelnemers geboren in Suriname bevonden zich op een IncI2- en een IncI1-plasmide. Van één *mcr-1* gen kon de locatie niet worden vastgesteld.

Tabel 4.4.2a Karakteristieken van de isolaten en de deelnemers die drager zijn van een colistine resistente *mcr*-positieve *Escherichia coli* of *Klebsiella pneumoniae*.

Deel-nemer	Bacterie species	<i>mcr</i> type [#]	Plasmide	MIC (mg/L)	Leeftijds-categorie (jaren)	Geslacht	Geboorteland	Afkomst
PIENTER_1	<i>K. pneumoniae</i>	<i>mcr-8.1</i>	IncF	8	70-89	Man	Suriname	1e gen. Suriname/Aruba/ Nederlandse Antillen
PIENTER_2	<i>E. coli</i>	<i>mcr-1.1</i>	Onbekend*	4	60-69	Man	Suriname	1e gen. Suriname/Aruba/ Nederlandse Antillen
PIENTER_3	<i>K. pneumoniae</i>	<i>mcr-1.1</i> & <i>mcr-8.1</i>	IncI1 & IncF	32	60-69	Vrouw	Suriname	1e gen. Suriname/Aruba/ Nederlandse Antillen
PIENTER_4	<i>E. coli</i>	<i>mcr-1.1</i>	IncI2	4	50-59	Man	Suriname	1e gen. Suriname/Aruba/ Nederlandse Antillen
PIENTER_5	<i>E. coli</i>	<i>mcr-1.1</i>	IncX4	8	30-39	Man	Nederland	2e gen. anders-Westen
AREND_1	<i>E. coli</i>	<i>mcr-1.1</i>	IncX4	4	30-39	Vrouw	Nederland	Onbekend

MIC=Minimale Inhiberende Concentratie

[#] Volgens ResFinder 4.1 (66) <https://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder/>

*niet duidelijk in dit isolaat of het *mcr*-gen op een plasmide ligt of op het chromosoom.

Alle overige colistine isolaten droegen geen *mcr*-genen. Mogelijk wordt de colistine resistentie veroorzaakt door mutaties in het chromosoom. Genen die o.a. betrokken zijn bij colistine resistentie zijn *pmrA*, *pmrB*, *phoP* en *phoQ*. In onderstaande tabel zijn de gevonden mutaties in deze genen weergegeven. Slechts van een klein aantal is bekend of de mutatie ook daadwerkelijk tot colistine resistentie leidt. Deze zijn dikgedrukt en de referenties waar de dikgedrukte mutaties zijn beschreven staan in de tabel.

Tabel 4.4.2b Gevonden mutaties in colistine resistente *E. coli* en *Klebsiella pneumoniae* in isolaten uit PIENTER_3 en de AREND studie.

Gen	Aantal geanalyseerd	Aantal isolaten zonder mutatie	Gevonden mutaties (n)	Referenties
<i>pmrA E. coli</i>	64	29	T31S(29); G53S /E/V/C/R(10); R81S(1) ; R111C(1); I128N(19); G144S(20); N219K(1)	(67-69)
<i>PmrB E. coli</i>	60	3	H2R(46); L14Q/R/P(3); G19R(4) ; A20D(2); L33P(1); L79R(1); V88E(2); R89P/H(2); del90(2); I91L(2); ins91/92(1); T92P(2); R93P(1) ; P94A/L(3); L102Q(1); E121K(4) ; E123D(27); V125E(2); del133t/m136(1); S138N(11); T156T/K(2) ; A159V(2) ; E166K(1); L194R(1); A242T(1); T246I(1); D282N(1); D283G/S(51); D312N(2); M333Q(1); V351I(28); Y358N(6); A360Y(3)	(68, 70-73)
<i>pmrB Klebsiella</i>	9	6	T240M(2); A246T(1)	
<i>PhoP E. coli</i>	63	9	I44L(1); V71F(1); A152T(1); delE208(1)	
<i>PhoP Klebsiella</i>	9	8	Q133R(1)	
<i>PhoQ E. coli</i>	64	31	K2I(1); R6H(15); G93R(1); S138T(10) ; S326N(1); R425Q(1); D430N(1); E464D(3); R478H(1); A482T(15)	(74, 75)
<i>PhoQ Klebsiella</i>	9	0	L26Q(1); N67K(1); D150G(9)	
<i>mgrB E. coli</i>	63	31	V7G(2); V8A(30) ; I41L(4)	(75)
<i>mgrB Klebsiella</i>	7	5	C28R(1); delQ33(1); delK43(1); insQ48(1)	

5 Conclusies/discussie

Uit de verschillende experimenten om colistine resistente isolaten te kweken is gebleken dat het een uitdaging is om een methode te vinden die goed in staat is om colistine gevoelige isolaten te remmen en tevens de colistine resistente isolaten goed te laten groeien. Het Superpolymixine (Colistigram, EMB) medium bleek bij de eerste experimenten met reïncultures zowel gevoelige isolaten te remmen als resistente isolaten te laten groeien. Bij de test in het IMPART project, waarin faeces en vlees matrices met resistente bacteriën werden besmet, bleek dit medium een lagere sensitiviteit te hebben om groei te detecteren van colistine resistente isolaten dan de ChromID® Colistine R plaat.

Uit de eerste experimenten bleek dat een niet-selectief ophopingsmedium tot een betere detectie van colistine resistente isolaten leidde, echter in de praktijk, waar men te maken heeft met verschillende matrices met stoorflora blijkt dat deze stoorflora minder goed geremd wordt door het gebruik van een niet-selectieve verrijkingstap. Daarom is ervoor gekozen om een combinatie van een korte niet-selectieve ophoping te gebruiken (een swab 3 uur in 10 ml BPW) en daarvan 1 ml over te brengen naar een selectieve ophoping om stoorflora zoveel mogelijk te remmen en de werking van colistine te optimaliseren. In het IMPART experiment met een beperkt aantal isolaten bleek dit goed te werken om de colistine resistente isolaten te kweken. ChromID® colistine R had daarbij een sensitiviteit van 86%, wat beter was dan de andere twee commerciële platen (CHROMagar™ COL-APSE (75%) en COLISTIGRAM (70%)). De resultaten laten wel zien dat het bij het kweken van colistine resistente isolaten moeilijk blijft om een methode te gebruiken die ervoor zorgt dat 100% van de isolaten gedetecteerd wordt. Daarom is het voor de detectie van bekende plasmide gemedieerde colistine resistentie genen (*mcr*-genen) aan te raden om eerst een PCR uit te voeren op de ophoping en daarna een kweek in te zetten. Zo is de kans kleiner dat deze resistentiemechanismen gemist worden en heb je geen last van vals positieve resultaten bij de kweek. Echter hiermee worden chromosomale resistentie en nieuwe *mcr*-varianten gemist. Het is dan ook afhankelijk van de doelstelling van het onderzoek of surveillance welke methode het beste is aan te raden, of dat een combinatie van beide methoden nodig is.

Carbapenemresistentie kan veroorzaakt worden door verschillende resistentiegenen (*bla_{OXA}*, *bla_{NDM}*, *bla_{VIM}*, *bla_{KPC}*, *bla_{IMP}*). De experimenten met CPE isolaten laten zien dat isolaten met *bla_{OXA}*-genen en isolaten met andere carbapenem resistentiegenen (*bla_{NDM}*, *bla_{VIM}*, *bla_{KPC}*, *bla_{IMP}*) verschillende kweekmethode nodig hebben. De niet-selectieve ophoping en het gebruik van een combinatie van CHROMID® CARBA en CHROMID® OXA leidt tot de beste detectie van CPE isolaten. De niet-selectieve ophoping is ook gebruikt in het IMPART project. Ook daar bleek CHROMID® OXA het beste resultaat te geven voor de detectie van CPE-isolaten met *bla_{OXA-48}* genen. CHROMID® CARBA en Chromatic™ CRE presteerden het best voor de detectie van non-OXA CPE. Echter met het gebruik van een niet-selectieve ophoping overnacht in BPW worden de

*bla*_{VIM-1} positieve isolaten, die gevonden zijn op varkens en vleeskuikenbedrijven in Duitsland, gemist (76). Als referentiemethode voor EU-referentielaboratoria verdient het daarom de voorkeur om een extra ophoping met cefotaxime toe te voegen aan de methode om ook deze CPE in landbouwhuisdieren in Europa te kunnen detecteren (76).

De colistine prevalentie studie laat zien dat dragerschap van colistine resistentie bij ongeveer 5-8% van de bevolking voorkomt. Dit is relatief hoog voor personen die geen voorgeschiedenis hebben met het gebruik van colistine. Opmerkelijk is dat het percentage wat nu gevonden is, bijna net zo hoog is als beschreven bij patiënten die wel een behandeling met colistine of een combinatie van carbapenem en colistine ondergingen (10.3%)(77). Aangezien het humaan colistine-gebruik in Nederland erg laag is zal dat niet de oorzaak zijn voor de relatief hoge prevalentie in de algemene bevolking, maar spelen waarschijnlijk andere nog onbekende factoren een rol. Al eerder is melding gemaakt van het voorkomen van colistine resistente isolaten in personen en dieren zonder voorgeschiedenis met colistine gebruik (78). Volgens de auteurs van dat artikel zou door blootstelling aan stoffen uit het aangeboren immuunsysteem, namelijk LL-37 en lysozyme, die net als colistine hun werking hebben op de buitenmembraan van de bacterie, bacteriën resistent kunnen worden voor colistine (kruisresistentie). Dit is aangetoond voor *Acinetobacter baumannii* (79). Het omgekeerde geldt natuurlijk ook. Door behandeling met colistine zouden bacteriën resistenter kunnen worden voor enzymen die belangrijk zijn voor de eerste eigen afweer van het lichaam tegen bacteriën.

Daarnaast kunnen omgevingsfactoren van invloed zijn op de gevoeligheid van de bacterie voor colistine. Zo is een casus beschreven waarin eenzelfde *E. coli* voorkwam in urine en bloed van één patiënt, die niet behandeld was met colistine, waarbij het isolaat gevonden in urine colistine resistent was en het isolaat uit bloed colistine gevoelig (80). Dit laat zien dat resistentie tegen colistine niet altijd te maken heeft met het gebruik van colistine, maar dat omgevingsinvloeden van de plaats waar de bacterie voorkomt ook een rol kunnen spelen. Daarnaast kan er ook uitwisseling plaatsvinden tussen verschillende reservoirs waar colistine resistente bacteriën voorkomen. Contact met dieren zou een factor kunnen zijn, colistine resistentie wordt ook in dieren gevonden, al is de prevalentie laag (31). Door colistine resistente isolaten uit dieren te vergelijken met de isolaten gevonden in mensen kan dit beter onderzocht worden.

Het colistine resistentiemechanisme in onze studie bleek veelal te bestaan uit chromosomale mutaties en in slechts zes personen (vijf uit de algemene bevolking (0.8%) en één onder personen werkzaam in de diergeneeskundige zorg (0.2%) werden *mcr*-genen aangetroffen. Deze prevalenties zijn vergelijkbaar met eerder beschreven prevalentie (0.35%) in patiënten opgenomen in ziekenhuizen (24). Opvallend was dat vier van de zes personen met een *mcr*-gen afkomstig waren uit Suriname. Hier is nog geen goede verklaring voor te geven. In de PIENTER-3 studie heeft wel een oversampling plaatsgevonden van personen geboren in Suriname, Aruba en de voormalige Nederlandse Antillen (65). Van de 661 deelnemers uit de PIENTER-3 studie waren er 148 (22%) die 1^e generatie Surinamers waren en de meeste van deze

deelnemers kwamen uit Amsterdam, Den Haag of Rotterdam. Mogelijk verklaart dat deels deze bevinding, maar nader onderzoek hiernaar is gewenst.

Dit is de eerste beschrijving van het voorkomen van *mcr-8* in Nederland. *Mcr-8* is als eerste beschreven in 2018 op IncFII plasmiden in *Klebsiella pneumoniae* isolaten uit varkens en kippen in China en in een patiënt in China (63). Inmiddels beschrijven meerdere publicaties de aanwezigheid van *mcr-8*, onder ander in isolaten van kippen, afvalwater van een kippenboerderij, varkens, patiënten en gezonde personen uit o.a. China, Algerije, Frankrijk (uit een patiënt afkomstig uit Marokko), Laos en Bangladesh. Beide personen die *mcr-8* droegen waren oorspronkelijk afkomstig uit Suriname. Daarnaast had één van de twee personen binnen zes maanden voorafgaand aan de studie gereisd naar West-Azië. Deze persoon werkte ook in de gezondheidszorg en had in de drie maanden voorafgaand aan de studie antibiotica gebruikt. De andere persoon had in de zes maanden voorafgaand aan de studie een ziekenhuis bezocht en gebruikte maagbeschermers. Dit kunnen allen risicofactoren zijn voor dragerschap van resistente bacteriën (zie ook rapport AREND studie).

In onze studie werd *mcr-1* naast IncX4 ook op een IncI1 plasmide gevonden. Dit is nog niet eerder beschreven in humane monsters in Nederland. Wel is dit beschreven in een isolaat afkomstig van kalkoenvlees in Nederland uit 2015 (29), en in een patiënt uit China in 2016 (81). Eerste analyses laten zien dat het mogelijk om een ander IncI1 plasmide gaat dan die beschreven in kalkoenvlees in Nederland, maar dit zal nog verder onderzocht worden.

Ook is nog niet bekend of de twee gevonden IncF plasmiden en de twee IncX4 plasmiden identiek zijn. Ook dat zal in een vervolgstudie onderzocht worden.

6 Vervolg

Om verder te onderzoeken of er uitwisseling is van colistine resistente isolaten of plasmiden met *mcr*-genen tussen mensen en dieren zal er een colistine surveillance project starten, waarbij colistine resistente isolaten van landbouwhuisdieren, voedsel en mensen (isolaten uit de algemene bevolking en klinisch isolaten) gekarakteriseerd worden met behulp van Next Generation Sequencing (NGS) en long read sequencing om de resistentie genen en de mobiele elementen te karakteriseren. Ook de gevonden colistine resistente isolaten in dit project zullen meegenomen worden in dat project. De prevalentie van darmdragerschap in deze studie was een nulmeting. Het is aan te bevelen om de prevalentiestudie in de algemene bevolking in de toekomst te herhalen, om te onderzoeken of er veranderingen opgetreden zijn in dragerschap van colistine resistente bacteriën. Ook is het verstandig om verder te onderzoeken welke factoren een rol kunnen spelen bij dragerschap van colistine resistente bacteriën, met name *mcr*-gerelateerde resistentie en of mogelijk afkomst hier een rol bij speelt.

7 Dankwoord

Veel dank aan Christiaan Veenman, Anna Gritchina voor al hun labwerk en Roel Willems (UvA) voor het aaneten van de ophopingen vanuit de PIENTER-3 monsters. Dank aan Kees Veldman voor het herhalen van de colistine MICs en voor de colistine resistente isolaten. Dank ook aan het EU-referentielab, Laurent Poirer en Muna Anjum voor het beschikbaar stellen van controles van *mcr*-dragende isolaten. Ook veel dank aan Fiona v.d. Klis en Jeffry van Vliet voor het beschikbaar stellen van de PIENTER-3 monsters en Liesbeth Mollema voor het beschikbaar stellen van de resultaten van de PIENTER-3 vragenlijsten. Met dank aan het IMPART consortium voor alle IMPART data. Ook veel dank voor Joost Hordijk, Marta Rozwandowicz, Antoni Hendrikx en Angela van Hoek voor alle hulp bij de moleculaire analyses van de colistine resistente isolaten.

8 Referenties

1. Jeon JH, Lee JH, Lee JJ, Park KS, Karim AM, Lee CR, et al. Structural basis for carbapenem-hydrolyzing mechanisms of carbapenemases conferring antibiotic resistance. *Int J Mol Sci*. 2015;16(5):9654-92.
2. Nordmann P, Poirel L. The difficult-to-control spread of carbapenemase producers among Enterobacteriaceae worldwide. *Clin Microbiol Infect*. 2014;20(9):821-30.
3. Albiger B, Glasner C, Struelens MJ, Grundmann H, Monnet DL, European Survey of Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae working g. Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in Europe: assessment by national experts from 38 countries, May 2015. *Euro Surveill*. 2015;20(45).
4. Vlek AL, Frentz D, Haenen A, Bootsma HJ, Notermans DW, Frakking FN, et al. Detection and epidemiology of carbapenemase producing Enterobacteriaceae in the Netherlands in 2013-2014. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2016;35(7):1089-96.
5. Nethmap/MARAN 2018 Consumption of antimicrobial agents and antimicrobial resistance among medically important bacteria in the Netherlands. 2018.
6. Dautzenberg MJ, Ossewaarde JM, de Kraker ME, van der Zee A, van Burgh S, de Greeff SC, et al. Successful control of a hospital-wide outbreak of OXA-48 producing Enterobacteriaceae in the Netherlands, 2009 to 2011. *Euro Surveill*. 2014;19(9).
7. Van der Bij AK, Van Mansfeld R, Peirano G, Goessens WH, Severin JA, Pitout JD, et al. First outbreak of VIM-2 metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* in The Netherlands: microbiology, epidemiology and clinical outcomes. *Int J Antimicrob Agents*. 2011;37(6):513-8.
8. 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.
9. Fischer J, Rodriguez I, Schmoger 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.
10. Roschanski N, Friese A, von Salviati-Claudius C, Hering J, Kaesbohrer A, Kreienbrock L, et al. Prevalence of carbapenemase producing Enterobacteriaceae isolated from German pig-fattening farms during the years 2011-2013. *Vet Microbiol*. 2017;200:124-9.
11. 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*. 2017;200:118-23.
12. Pulss S, Semmler T, Prenger-Berninghoff E, Bauerfeind R, Ewers C. First report of an *E. coli* strain from swine carrying an OXA-181-carbapenemase and colistin resistance determinant MCR-1. *Int J Antimicrob Agents*. 2017.
13. Hamza E, Dorgham SM, Hamza DA. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in broiler poultry farming in Egypt. *J Glob Antimicrob Resist*. 2016;7:8-10.

14. Webb HE, Bugarel M, den Bakker HC, Nightingale KK, Granier SA, Scott HM, et al. Carbapenem-Resistant Bacteria Recovered from Faeces of Dairy Cattle in the High Plains Region of the USA. *PLoS One*. 2016;11(1):e0147363.
15. Borowiak M, Szabo I, Baumann B, Junker E, Hammerl JA, Kaesbohrer A, et al. VIM-1-producing *Salmonella* Infantis isolated from swine and minced pork meat in Germany. *J Antimicrob Chemother*. 2017;72(7):2131-3.
16. Garcia-Graells C, Berbers B, Verhaegen B, Vanneste K, Marchal K, Roosens NHC, et al. First detection of a plasmid located carbapenem resistant blaVIM-1 gene in *E. coli* isolated from meat products at retail in Belgium in 2015. *Int J Food Microbiol*. 2020;324:108624.
17. SDA. Het gebruik van antibiotica bij landbouwhuisdieren in 2019 Trends, benchmarken bedrijven en dierenartsen SDA, Autoriteit Diergeneesmiddelen; 2020 2020.
18. Caniaux I, van Belkum A, Zambardi G, Poirel L, Gros MF. MCR: modern colistin resistance. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2017;36(3):415-20.
19. Liu YY, Wang Y, Walsh TR, Yi LX, Zhang R, Spencer J, et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *Lancet Infect Dis*. 2016;16(2):161-8.
20. Baron S, Hadjadj L, Rolain JM, Olaitan AO. Molecular mechanisms of polymyxin resistance: knowns and unknowns. *Int J Antimicrob Agents*. 2016;48(6):583-91.
21. Schwarz S, Johnson AP. Transferable resistance to colistin: a new but old threat. *J Antimicrob Chemother*. 2016;71(8):2066-70.
22. Arcilla MS, van Hattem JM, Matamoros S, Melles DC, Penders J, de Jong MD, et al. Dissemination of the mcr-1 colistin resistance gene. *Lancet Infect Dis*. 2016;16(2):147-9.
23. von Wintersdorff CJ, Wolffs PF, van Niekerk JM, Beuken E, van Alphen LB, Stobberingh EE, et al. Detection of the plasmid-mediated colistin-resistance gene mcr-1 in faecal metagenomes of Dutch travellers. *J Antimicrob Chemother*. 2016;71(12):3416-9.
24. Terveer EM, Nijhuis RHT, Crobach MJT, Knetsch CW, Veldkamp KE, Gooskens J, et al. Prevalence of colistin resistance gene (mcr-1) containing Enterobacteriaceae in feces of patients attending a tertiary care hospital and detection of a mcr-1 containing, colistin susceptible *E. coli*. *PLoS One*. 2017;12(6):e0178598.
25. Veldman K, van Essen-Zandbergen A, Rapallini M, Wit B, Heymans R, van Pelt W, et al. Location of colistin resistance gene mcr-1 in Enterobacteriaceae from livestock and meat. *J Antimicrob Chemother*. 2016;71(8):2340-2.
26. MARAN 2017 Monitoring of Antimicrobial Resistance and Antibiotic Usage in Animals in the Netherlands in 2016. 2017.
27. Kluytmans-van den Bergh MF, Huizinga P, Bonten MJ, Bos M, De Bruyne K, Friedrich AW, et al. Presence of mcr-1-positive Enterobacteriaceae in retail chicken meat but not in humans in the Netherlands since 2009. *Euro Surveill*. 2016;21(9):30149.
28. MARAN 2016 Monitoring of Antimicrobial Resistance and Antibiotic Usage in Animals in the Netherlands in 2015. 2016.

29. Brouwer MSM, Goodman RN, Kant A, Mevius D, Newire E, Roberts AP, et al. Mobile colistin resistance gene *mcr-1* detected on an IncI1 plasmid in *Escherichia coli* from meat. *J Glob Antimicrob Resist*. 2020;23:145-8.
30. Wang Y, Zhang R, Li J, Wu Z, Yin W, Schwarz S, et al. Comprehensive resistome analysis reveals the prevalence of NDM and MCR-1 in Chinese poultry production. *Nat Microbiol*. 2017;2:16260.
31. MARAN 2020 Monitoring of Antimicrobial Resistance and Antibiotic Usage in Animals in the Netherlands in 2019. . 2020.
32. Weterings V, Zhou K, Rossen JW, van Stenis D, Thewessen E, Kluytmans J, et al. An outbreak of colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in the Netherlands (July to December 2013), with inter-institutional spread. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2015;34(8):1647-55.
33. Mediavilla JR, Patrawalla A, Chen L, Chavda KD, Mathema B, Vinnard C, et al. Colistin- and Carbapenem-Resistant *Escherichia coli* Harboring *mcr-1* and *blaNDM-5*, Causing a Complicated Urinary Tract Infection in a Patient from the United States. *MBio*. 2016;7(4).
34. Li J, Bi Z, Ma S, Chen B, Cai C, He J, et al. Inter-host Transmission of Carbapenemase-Producing *Escherichia coli* among Humans and Backyard Animals. *Environ Health Perspect*. 2019;127(10):107009.
35. Hrabak J, Chudackova E, Papagiannitsis CC. Detection of carbapenemases in Enterobacteriaceae: a challenge for diagnostic microbiological laboratories. *Clin Microbiol Infect*. 2014;20(9):839-53.
36. Viau R, Frank KM, Jacobs MR, Wilson B, Kaye K, Donskey CJ, et al. Intestinal Carriage of Carbapenemase-Producing Organisms: Current Status of Surveillance Methods. *Clin Microbiol Rev*. 2016;29(1):1-27.
37. Richter SS, Marchaim D. Screening for carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: Who, When, and How? *Virulence*. 2017;8(4):417-26.
38. van der Zwaluw K, de Haan A, Pluister GN, Bootsma HJ, de Neeling AJ, Schouls LM. The carbapenem inactivation method (CIM), a simple and low-cost alternative for the Carba NP test to assess phenotypic carbapenemase activity in gram-negative rods. *PLoS One*. 2015;10(3):e0123690.
39. Abdul Momin MHF, Bean DC, Hendriksen RS, Haenni M, Phee LM, Wareham DW. CHROMagar COL-APSE: a selective bacterial culture medium for the isolation and differentiation of colistin-resistant Gram-negative pathogens. *J Med Microbiol*. 2017;66(11):1554-61.
40. Nordmann P, Jayol A, Poirel L. A Universal Culture Medium for Screening Polymyxin-Resistant Gram-Negative Isolates. *J Clin Microbiol*. 2016;54(5):1395-9.
41. Garcia-Fernandez S, Garcia-Castillo M, Ruiz-Garbajosa P, Morosini MI, Bala Y, Zambardi G, et al. Performance of CHROMID(R) Colistin R agar, a new chromogenic medium for screening of colistin-resistant Enterobacteriales. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2019;93(1):1-4.

42. Zurfluh K, Stephan R, Widmer A, Poirel L, Nordmann P, Nuesch HJ, et al. Screening for fecal carriage of MCR-producing Enterobacteriaceae in healthy humans and primary care patients. *Antimicrob Resist Infect Control*. 2017;6:28.
43. Schrauwen EJA, Huizinga P, van Spreuwel N, Verhulst C, Kluytmans-van den Bergh MFQ, Kluytmans J. High prevalence of the mcr-1 gene in retail chicken meat in the Netherlands in 2015. *Antimicrob Resist Infect Control*. 2017;6:83.
44. Aguirre-Quinonero A, Martinez-Martinez L. Non-molecular detection of carbapenemases in Enterobacteriaceae clinical isolates. *J Infect Chemother*. 2017;23(1):1-11.
45. Vrioni G, Daniil I, Voulgari E, Ranellou K, Koumaki V, Ghirardi S, et al. Comparative evaluation of a prototype chromogenic medium (ChromID CARBA) for detecting carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in surveillance rectal swabs. *J Clin Microbiol*. 2012;50(6):1841-6.
46. Girlich D, Anglade C, Zambardi G, Nordmann P. Comparative evaluation of a novel chromogenic medium (chromID OXA-48) for detection of OXA-48 producing Enterobacteriaceae. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2013;77(4):296-300.
47. Bracco S, Migliavacca R, Pini B, Corbo N, Nucleo E, Brigante G, et al. Evaluation of brilliance CRE agar for the detection of carbapenem-resistant gram-negative bacteria. *New Microbiol*. 2013;36(2):181-6.
48. Nordmann P, Girlich D, Poirel L. Detection of carbapenemase producers in Enterobacteriaceae by use of a novel screening medium. *J Clin Microbiol*. 2012;50(8):2761-6.
49. Cohen Stuart J, Voets G, Rottier W, Voskuil S, Scharringa J, Van Dijk K, et al. Evaluation of the Oxoid Brilliance CRE Agar for the detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2013;32(11):1445-9.
50. Garcia-Fernandez S, Hernandez-Garcia M, Valverde A, Ruiz-Garbajosa P, Morosini MI, Canton R. CHROMagar mSuperCARBA performance in carbapenem-resistant Enterobacteriaceae isolates characterized at molecular level and routine surveillance rectal swab specimens. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2017;87(3):207-9.
51. Girlich D, Groperrin V, Naas T, Dortet L. CHROMagar ESBL/mSuperCARBA bi-plate medium for detection of ESBL- and carbapenemase-producing Enterobacteriaceae from spiked stools. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2019;95(2):107-12.
52. Girlich D, Poirel L, Nordmann P. Comparison of the SUPERCARBA, CHROMagar KPC, and Brilliance CRE screening media for detection of Enterobacteriaceae with reduced susceptibility to carbapenems. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2013;75(2):214-7.
53. Gottig S, Walker SV, Saleh A, Koroska F, Sommer J, Stelzer Y, et al. Comparison of nine different selective agars for the detection of carbapenemase-producing Enterobacteriales (CPE). *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2020;39(5):923-7.
54. Rebelo AR, Bortolaia V, Kjeldgaard JS, Pedersen SK, Leekitcharoenphon P, Hansen IM, et al. Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated colistin resistance determinants, mcr-1, mcr-2, mcr-3, mcr-4 and mcr-5 for surveillance purposes. *Euro Surveill*. 2018;23(6).

55. Irrgang A, Fischer J, Grobbel M, Schmogger S, Skladnikiewicz-Ziemer T, Thomas K, et al. Recurrent detection of VIM-1-producing *Escherichia coli* clone in German pig production. *J Antimicrob Chemother.* 2017;72(3):944-6.
56. Hawkey J, Le Hello S, Doublet B, Granier SA, Hendriksen RS, Fricke WF, et al. Global phylogenomics of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype Kentucky ST198. *Microb Genom.* 2019;5(7).
57. Hasman H A, Y., Hendriksen, R., Cavaco, L. M., Guerra-Roman, B. . Isolation of ESBL-, AmpC- and carbapenemase-producing *E. coli* from fresh meat. Version 6. 2018.
58. Hasman H A, Y., Hendriksen, R., Cavaco, L. M., Guerra-Roman, B. AmpC- and carbapenemase-producing *E. coli* from caecal samples. Version 6. 2018.
59. Recommendations for MIC determination of colistin (polymyxin E) As recommended by the joint CLSI-EUCAST Polymyxin Breakpoints Working Group (2016).
60. AbuOun M, Stubberfield EJ, Duggett NA, Kirchner M, Dormer L, Nunez-Garcia J, et al. mcr-1 and mcr-2 (mcr-6.1) variant genes identified in *Moraxella species* isolated from pigs in Great Britain from 2014 to 2015. *J Antimicrob Chemother.* 2018;73(10):2904.
61. Borowiak M, Fischer J, Hammerl JA, Hendriksen RS, Szabo I, Malorny B. Identification of a novel transposon-associated phosphoethanolamine transferase gene, mcr-5, conferring colistin resistance in d-tartrate fermenting *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Paratyphi B. *J Antimicrob Chemother.* 2017;72(12):3317-24.
62. Kieffer N, Royer G, Decousser JW, Bourrel AS, Palmieri M, Ortiz De La Rosa JM, et al. mcr-9, an Inducible Gene Encoding an Acquired Phosphoethanolamine Transferase in *Escherichia coli*, and Its Origin. *Antimicrob Agents Chemother.* 2019;63(9).
63. Wang X, Wang Y, Zhou Y, Li J, Yin W, Wang S, et al. Emergence of a novel mobile colistin resistance gene, mcr-8, in NDM-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Emerg Microbes Infect.* 2018;7(1):122.
64. Yang YQ, Li YX, Lei CW, Zhang AY, Wang HN. Novel plasmid-mediated colistin resistance gene mcr-7.1 in *Klebsiella pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother.* 2018;73(7):1791-5.
65. Verberk JDM, Vos RA, Mollema L, van Vliet J, van Weert JWM, de Melker HE, et al. Third national biobank for population-based seroprevalence studies in the Netherlands, including the Caribbean Netherlands. *BMC Infect Dis.* 2019;19(1):470.
66. Bortolaia V, Kaas RS, Ruppe E, Roberts MC, Schwarz S, Cattoir V, et al. ResFinder 4.0 for predictions of phenotypes from genotypes. *J Antimicrob Chemother.* 2020;75(12):3491-500.
67. Janssen AB, Bartholomew TL, Marciszewska NP, Bonten MJM, Willems RJL, Bengoechea JA, et al. Nonclonal Emergence of Colistin Resistance Associated with Mutations in the BasRS Two-Component System in *Escherichia coli* Bloodstream Isolates. *mSphere.* 2020;5(2).
68. Luo Q, Yu W, Zhou K, Guo L, Shen P, Lu H, et al. Molecular Epidemiology and Colistin Resistant Mechanism of mcr-Positive and mcr-Negative Clinical Isolated *Escherichia coli*. *Front Microbiol.* 2017;8:2262.

69. Quesada A, Porrero MC, Tellez S, Palomo G, Garcia M, Dominguez L. Polymorphism of genes encoding PmrAB in colistin-resistant strains of *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* isolated from poultry and swine. *J Antimicrob Chemother.* 2015;70(1):71-4.
70. Hernandez-Castro R, Rodriguez-Santiago J, Tellez-Sosa J, Bravo-Romero S, Silva-Sanchez J, Sanchez-Perez A, et al. Molecular and genome characterization of colistin-resistant *Escherichia coli* isolates from wild sea lions (*Zalophus californianus*). *Braz J Microbiol.* 2020;51(4):2009-14.
71. Kathayat D, Antony L, Deblais L, Helmy YA, Scaria J, Rajashekara G. Small Molecule Adjuvants Potentiate Colistin Activity and Attenuate Resistance Development in *Escherichia coli* by Affecting pmrAB System. *Infect Drug Resist.* 2020;13:2205-22.
72. Kuang Q, He D, Sun H, Hu H, Li F, Li W, et al. R(93)P Substitution in the PmrB HAMP Domain Contributes to Colistin Heteroresistance in *Escherichia coli* Isolates from Swine. *Antimicrob Agents Chemother.* 2020;64(11).
73. Poirel L, Jayol A, Nordmann P. Polymyxins: Antibacterial Activity, Susceptibility Testing, and Resistance Mechanisms Encoded by Plasmids or Chromosomes. *Clin Microbiol Rev.* 2017;30(2):557-96.
74. Anjum MF, Duggett NA, AbuOun M, Randall L, Nunez-Garcia J, Ellis RJ, et al. Colistin resistance in *Salmonella* and *Escherichia coli* isolates from a pig farm in Great Britain. *J Antimicrob Chemother.* 2016;71(8):2306-13.
75. Delannoy S, Le Devendec L, Jouy E, Fach P, Drider D, Kempf I. Characterization of Colistin-Resistant *Escherichia coli* Isolated from Diseased Pigs in France. *Front Microbiol.* 2017;8:2278.
76. Irrgang A, Tenhagen BA, Pauly N, Schmoger S, Kaesbohrer A, Hammerl JA. Characterization of VIM-1-Producing *E. coli* Isolated From a German Fattening Pig Farm by an Improved Isolation Procedure. *Front Microbiol.* 2019;10:2256.
77. Dickstein Y, Lellouche J, Schwartz D, Nutman A, Rakovitsky N, Dishon Benattar Y, et al. Colistin Resistance Development Following Colistin-Meropenem Combination Therapy vs. Colistin Monotherapy in Patients with Infections Caused by Carbapenem-Resistant Organisms. *Clin Infect Dis.* 2019.
78. Olaitan AO, Morand S, Rolain JM. Emergence of colistin-resistant bacteria in humans without colistin usage: a new worry and cause for vigilance. *Int J Antimicrob Agents.* 2016;47(1):1-3.
79. Napier BA, Burd EM, Satola SW, Cagle SM, Ray SM, McGann P, et al. Clinical use of colistin induces cross-resistance to host antimicrobials in *Acinetobacter baumannii*. *mBio.* 2013;4(3):e00021-13.
80. Prim N, Rivera A, Espanol M, Mirelis B, Coll P. In Vivo Adaptive Resistance to Colistin in *Escherichia coli* Isolates. *Clin Infect Dis.* 2015;61(10):1628-9.
81. Zhong YM, Liu WE, Zheng ZF. Epidemiology and molecular characterization of mcr-1 in *Escherichia coli* recovered from patients with bloodstream infections in Changsha, central China. *Infect Drug Resist.* 2019;12:2069-76.

Appendix 1

Gebruikte 26 colistine resistente isolaten voor colistine experimenten in paragraaf 3.1. Dikgedrukte zijn de tien isolaten die gebruikt zijn in paragraaf 3.2.

ID	Bacterie species	Colistine resistentie mechanisme	Colistine MIC I (mg/L)	Colistine MIC II (mg/L)	Colistine MIC III (mg/L)
23 EC	<i>Escherichia coli</i>	-	0,25		≤1
25 EC	<i>Escherichia coli</i>	-	2		≤1
30 EC	<i>Escherichia coli</i>	-	0,25		≤1
38 EC	<i>Escherichia coli</i>	-	0,5	0,25	≤1
41 EC	<i>Escherichia coli</i>	-	1	0,25	≤1
42 EC	<i>Escherichia coli</i>	-	2		≤1
43 EC	<i>Escherichia coli</i>	-	1		≤1
45 EC	<i>Escherichia coli</i>	-	0,5	0,25	≤1
40 KO	<i>Klebsiella oxytoca</i>	-	0,25		≤1
24 EB	<i>Enterobacter cloaca</i>	-	0,25		≤1
29 CB	<i>Citrobacter freundii</i>	-	0,5		≤1
31 PA	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	4	1	≤1
32 PA	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	2	0,5	≤1
27 AB	<i>Acinetobacter baumannii</i>	-	1		≤1
28 AB	<i>Acinetobacter baumannii</i>	-	0,13		≤1
46 EC	<i>Escherichia coli</i>	Onbekend	4	4	2
39 AB	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Onbekend	4		4
37 EB	<i>Enterobacter cloaca</i>	Onbekend	8		8
44 KP	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Onbekend	8		16
34 KP	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Onbekend	32		16
36 KP	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Onbekend	>64		>16
33 SM	<i>Serratia marescens</i>	Onbekend	>64	>64	>16
21 EC	<i>Escherichia coli</i>	<i>mcr-1</i>	8		4
22 EC	<i>Escherichia coli</i>	<i>mcr-2</i>	8		4
47 EC	<i>Escherichia coli</i>	<i>mcr-3</i>			4
49 SP	<i>Salmonella paratyphi</i>	<i>mcr-5</i>			4-8

MIC=Minimale Inhiberende concentratie, deze is in drie-voud uitgevoerd. Tweemaal bij IDS (1 en 2) en eenmaal bij WBVR (3), alle drie de keren met de microbouillon verdunningstest.

Appendix 2

Gebruikte CPE isolaten voor CPE experimenten

Nr.	Species	Carba- penemase gen	MIC* Meropenem (R\geq0,125 mg/L)	MIC* Ertapenem (R \geq 0,064 mg/L)
1	<i>E. cloacae</i>	KPC-2	0,25	
2	<i>E. cloacae</i>	KPC-3	8 - >32	
3	<i>E. coli</i>	KPC-2	0,38	
4	<i>E. coli</i>	NDM-1	0,5- 1	
5	<i>E. coli</i>	NDM-5	6 - >32	
6	<i>E. coli</i>	NDM-5	2	
7	<i>E. coli</i>	NDM-7	16 - >32	
14	<i>K. pneumoniae</i>	NDM-1	4 - >32	
15	<i>K. pneumoniae</i>	NDM-1	1	
16	<i>K. pneumoniae</i>	KPC-2	>32	
8	<i>E. coli</i>	OXA-181	0,125 - 0,38	0,19 - 0,75
9	<i>E. coli</i>	OXA-181	0,38 - 2	0,50 - 3
10	<i>E. coli</i>	OXA-48	0,19	0,75
11	<i>K. pneumoniae</i>	OXA-48	0,25 - 8	0,5 - >32
12	<i>K. pneumoniae</i>	OXA-48	0,38	0,75
13	<i>K. pneumoniae</i>	OXA-181	0,25 - 3	x
17	<i>E. coli</i>	OXA-48	1,0 - 2	2 - 6

*MICs zijn bepaald met E-test.

RIVM

De zorg voor morgen begint vandaag