



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

ABR rioolwater surveillance 2020 – 2021
Antibioticaresistente bacteriën bij de bevolking gemeten
in rioolwater

RIVM-briefrapport 2022-0008
H. Blaak et al.



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

ABR rioolwater surveillance 2020 – 2021
Antibioticaresistente bacteriën bij de bevolking gemeten
in rioolwater

RIVM-briefrapport 2022-0008
H. Blaak et al.

Colofon

© RIVM 2022

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.

Het RIVM hecht veel waarde aan toegankelijkheid van zijn producten. Op dit moment is het echter nog niet mogelijk om dit document volledig toegankelijk aan te bieden. Als een onderdeel niet toegankelijk is, wordt dit vermeld. Zie ook www.rivm.nl/toegankelijkheid.

DOI 10.21945/RIVM-2022-0008

H. Blaak (auteur), RIVM
M.A. Kemper (auteur), RIVM
A.P.A. Hendrickx (auteur), RIVM
M.G. van Santen-Verheувel (auteur), RIVM
K.Y. Leung (auteur), RIVM
A.M. de Roda Husman (auteur), RIVM
H. Schmitt (auteur), RIVM

Contact:
Hetty Blaak
Centrum voor Zoönosen en omgevingsmicrobiologie
Hetty.blaak@rivm.nl

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

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

Publiekssamenvatting

ABR rioolwater surveillance 2020 – 2021

Antibioticaresistente bacteriën bij de bevolking gemeten in rioolwater

Het RIVM heeft in 2020 en 2021 in rioolwater twee soorten bacteriën gemeten die resistent zijn tegen antibiotica. Het gaat om CPE (carbapenemase-producerende Enterobacterales) en colistine-resistente *E.coli* (MCR-EC). De resultaten zijn vergeleken met rioolwatermetingen uit 2016. Op deze manier wordt duidelijk of het aantal mensen in Nederland die deze bacteriën bij zich draagt verandert.

Het RIVM meet deze bacteriën omdat ze een bedreiging zijn voor de volksgezondheid. Ze veroorzaken namelijk ziekten die moeilijk te behandelen zijn met antibiotica. De bacteriën zijn vooral gevaarlijk voor mensen met een kwetsbare gezondheid. De meeste gezonde mensen worden niet ziek van de bacterie. Door regelmatig het rioolwater te meten wordt duidelijk of de overheid genoeg doet om de verspreiding onder de bevolking te beperken.

Allebei de soorten bacteriën zijn in heel Nederland gevonden. De aantallen CPE in rioolwater zijn ongeveer hetzelfde als in 2016. De aantallen colistine-resistente *E. coli*-bacteriën konden met dit onderzoek niet precies worden gegeven.

Het lijkt er daarmee op dat de coronamaatregelen, zoals handen wassen en minder reizen, de verspreiding van deze bacteriën niet hebben verminderd. Dit vermoeden kan niet hard worden gemaakt omdat er geen metingen zijn gedaan vlak voordat de corona-epidemie begon. Om inzicht te krijgen hoe de aantallen zich verder ontwikkelen is het belangrijk in rioolwater te blijven meten. Metingen in rioolwater vullen de bestaande onderzoeken bij mensen naar de verspreiding van resistente bacteriën, goed aan.

Voor dit onderzoek zijn de concentraties in het rioolwater van 76 zuiveringsinstallaties onderzocht. Deze installaties lagen verspreid over heel Nederland, in stedelijke en landelijke gebieden. De onderzochte bacteriën zitten in ontlasting van mensen en dus in het rioolwater. Ze komen ook via reizigers uit bijvoorbeeld Zuid-Europa, Noord-Afrika en Zuidoost-Azië in Nederland terecht.

Kernwoorden: rioolwater, surveillance, monitoren, antibioticaresistentie, Enterobacterales, carbapenemases, CPE, colistine, RWZI, AWZI

Synopsis

Sewage-based surveillance of antibiotic resistance 2020 – 2021

Antibiotic-resistant bacteria in the population measured in sewage

In 2020 and 2021, the National Institute for Public Health and the Environment (RIVM) measured in sewage two strains of bacteria that are resistant to antibiotics. These are CPE (carbapenem-resistant Enterobacterales) and colistin-resistant *E.coli* (MCR-EC). The results were compared with sewage measurements from 2016, thereby shedding light on whether there has been any change in the number of people carrying these bacteria in the Netherlands.

The RIVM measures these bacteria because they constitute a threat to public health, as they cause diseases that are difficult to treat with antibiotics. The bacteria are particularly dangerous to people who are considered clinically vulnerable. Most healthy people will not fall ill due to the bacteria. Regularly performing measurements on sewage makes it clear whether the government is doing enough to prevent the spread of the bacteria among the population.

Both strains are found throughout the Netherlands. The level of CPE in sewage is approximately the same as it was in 2016. It was not possible to ascertain the precise level of colistin-resistant *E. coli* bacteria in this survey.

It would appear that the coronavirus measures (e.g. handwashing and less travel) have not reduced the spread of these bacteria. It is impossible to corroborate this assumption as no measurements were done right before the coronavirus pandemic began. In order to gain insight into future development of the levels, it is important to continue carrying out measurements on sewage. Measurements in sewage nicely complement the existing studies on the spread of resistant bacteria being carried out among people.

For the purposes of this survey, concentrations in sewage from 76 treatment plants were studied. These plants are situated throughout the Netherlands, in urban and rural areas. The bacteria studied are found in human stools, which is how they end up in sewage. They are also carried into the Netherlands by travellers from regions such as southern Europe, North Africa and Southeast Asia.

Keywords: sewage, survey, monitoring, antibiotic-resistance, enterobacteriaceae, carbapenem, CPE, colistin, sewage treatment plant, waste water treatment plant

Inhoudsopgave

Samenvatting — 9

1 Inleiding — 11

- 1.1 Aanleiding — 11
- 1.2 Doel — 12
- 1.3 Aanpak — 12
- 1.4 Achtergrond — 13
 - 1.4.1 Klinische relevantie CPE en MCRE — 13
 - 1.4.2 Prevalentie in Nederland en de wereld: CPE — 14
 - 1.4.3 Prevalentie in Nederland en de wereld: MCRE — 15
 - 1.4.4 Rioolwater surveillance van BRMO's — 15

2 Methoden — 17

- 2.1 Geïncubeerde RWZI's en AWZI's — 17
- 2.2 Monsternamen — 18
- 2.3 Detectie, enumeratie en isolatie van CPE — 19
- 2.4 Detectie en isolatie van *mcr*-positieve *E. coli* — 20
- 2.5 Bevestiging identiteit en resistentie — 20
 - 2.5.1 Species en genus identificatie — 20
 - 2.5.2 Aantonen resistentiegenen — 20
- 2.6 Berekenen CPE concentraties en vrachten — 21
 - 2.6.1 Berekenen van concentraties — 21
 - 2.6.2 Berekenen van (gewogen) bacterievrachten — 22
- 2.7 Data analyse en statistische analyses — 22
 - 2.7.1 Cross-sectionele en longitudinale analyse — 22
 - 2.7.2 Trendanalyse: vergelijken 2016 en 2020 — 22
 - 2.7.3 Totale gewogen vrachten per provincie en op landsniveau — 23
 - 2.7.4 Schatting dragerschap in de bevolking — 23
 - 2.7.5 Associaties tussen gewogen CPE vrachten en populatiekenmerken — 24
- 2.8 Genoom analyse — 25
 - 2.8.1 Herkomst isolaten — 25
 - 2.8.2 Whole genome analysis — 25
 - 2.8.3 Ethische verklaring met betrekking tot humane isolaten — 26

3 Resultaten — 27

- 3.1 CPE prevalentie en verspreiding — 27
 - 3.1.1 Prevalentie op RWZI-niveau en gewogen vrachten — 27
 - 3.1.2 Geografische verspreiding — 29
- 3.2 Prevalentie en verspreiding van MCR-EC — 31
- 3.3 Populatiekenmerken geassocieerd met het vóórkomen van CPE — 32
- 3.4 Trendanalyse: CPE in 2020 versus 2016 — 33
 - 3.4.1 Gemiddelde vrachten — 33
 - 3.4.2 Totale vrachten — 35
- 3.5 Trendanalyse: longitudinale metingen in provinciehoofdsteden — 36
 - 3.5.1 RWZI Utrecht voor en tijdens COVID-19 pandemie — 40
- 3.6 Moleculaire epidemiologie van CPE: hele genoom analyse van isolaten uit rioolwater en mensen — 42

4 Discussie — 45

5	Conclusies en aanbevelingen – 51
6	Dankwoord – 53
7	Referenties – 55
8	Bijlagen – 61
8.1	Representativiteit van de geselecteerde RWZI's – 61
8.2	Lijst van geselecteerde RWZI's en AWZI's – 62
8.3	Gebruikte primers voor moleculaire analyses – 64
8.4	Associatie tussen populatiekenmerken onderling – 65
8.5	Uitslagen CPE aan- en afwezigheid in 2016 en 2020 – 65

Samenvatting

Achtergrond

In 2016 heeft het RIVM voor het eerst de aanwezigheid onderzocht van Bijzonder Resistente Micro-Organismen (BRMO's) in rioolwater door metingen bij een groot aantal riool- en afvalwaterzuiveringsinstallaties (RWZI's en AWZI's). Een van de onderzochte typen BRMO waren de carbapenemase-producerende Enterobacterales (CPE). De verspreiding van CPE in Nederland bleek door middel van deze rioolwatermetingen omvangrijker dan van tevoren was verwacht gebaseerd op epidemiologische gegevens afkomstig uit de humane surveillance. Dit benadrukte dat metingen in rioolwater zeer geschikt zijn voor het onderzoeken van de verspreiding van relatief zeldzame micro-organismen die niet altijd gepaard gaan met ziekteverschijnselen, zoals CPE. Het achterliggende idee hierbij is dat door middel van rioolwatermetingen grote groepen mensen tegelijk kunnen worden gescreend, waaronder mensen die asymptomatisch drager zijn.

Doel van het onderzoek en aanpak

Het doel van het onderzoek was om door middel van rioolwatermetingen vast te stellen hoe twee vormen van resistente bacteriën: CPE en *mcr*-positieve *E. coli* (MCR-EC), geografisch zijn verspreid in Nederland en om de prevalentie te schatten. Hiervoor is in 2020 gemeten bij 76 RWZI's en AWZI's die gezamenlijk het rioolwater van 43% van de Nederlandse bevolking zuiveren en verspreid over het hele land liggen. Deze RWZI's representeren daarmee een groot deel van de bevolking. Resultaten zijn vergeleken met metingen uit 2016 om temporele trends vast te stellen. Daarnaast zijn 12 provinciehoofdstad RWZI's/AWZI's tussen mei 2020 tot november 2021 herhaaldelijk bemonsterd om inzicht te krijgen in de dynamiek tijdens de COVID-19 pandemie. CPE uit rioolwater werden vergeleken met CPE afkomstig uit de nationale humane surveillance door middel van *whole genome sequencing*, een techniek waarbij het hele genoom (dus alle DNA) van de bacteriën gesequenced wordt.

Resultaten

CPE waren aantoonbaar in het onbehandelde rioolwater van 88% van de 76 onderzochte RWZI's/AWZI's. Hoewel het percentage CPE-positieve RWZI's nagenoeg hetzelfde was in 2020 en 2016, was de CPE vracht per 100.000 inwoners in 2020 gemiddeld 2,5 keer zo hoog. Deze toename was niet statistisch significant, maar wel afwijkend van wat voor totale *E. coli* (factor 1,2) of voor een ander, minder zeldzame BRMO, namelijk ESBL-producerende *E. coli* (ESBL-EC) (factor 1,3) werd gevonden. In 2020 hadden NDM en KPC-typen CPE een grotere relatieve bijdrage aan de totale CPE vracht dan in 2016 (41% vs. 7% van de totale vracht). Een stabilisatie of mogelijk zelfs een lichte toename van de CPE vracht is opvallend omdat verwacht werd dat de maatregelen tegen SARS-CoV-2, en met name het sterk ingeperkt reisgedrag, ook een beperkend effect zou hebben op de verspreiding van CPE. In rioolwater werden CPE isolaten aangetroffen die genetisch nauw verwant bleken aan isolaten afkomstig uit patiënten, wat het idee bevestigt dat rioolwater een goede

aanvulling is om te monitoren wat in mensen circuleert. MCR-EC werden bij 87% van de RWZI's gevonden.

Conclusie

De prevalentie van CPE was in 2020 vergelijkbaar met die van 2016 of mogelijk zelfs licht toegenomen, ondanks SARS-CoV-2 maatregelen. Daarnaast lijkt het aandeel van specifieke CPE typen, NDM en KPC, toegenomen te zijn. Het is van belang om deze ontwikkelingen te blijven volgen. Riolwatermetingen zijn een waardevolle aanvulling op bevolkings-onderzoek-gebaseerde studies om de verspreiding van CPE en andere "bijzonder resistente micro-organismen" (BRMO's) in kaart te brengen.

1 Inleiding

1.1 Aanleiding

In 2016 is de aanwezigheid van carbapenemase-producerende Enterobacterales (CPE) onderzocht in het rioolwater bij 100 Nederlandse RWZI's en AWZI's¹ (Blaak *et al.*, 2021; Schmitt *et al.*, 2017). Dat onderzoek was het eerste Nederlandse onderzoek waarbij grootschalige rioolwatermetingen zijn gebruikt om te onderzoeken in welke mate deze zeldzame vorm van antibioticaresistente bacteriën in de algemene bevolking voorkomt. De 100 onderzochte RWZI's waren geselecteerd op basis van grootte (uitgedrukt in inwonerequivalenten) en op de aan- of afwezigheid van zorginstellingen (verpleeghuizen, ziekenhuizen, poliklinieken) in het verzorgingsgebied. Het doel hiervan was om te onderzoeken of deze factoren correleren met de aanwezigheid van CPE in het rioolwater.

CPE werden gevonden in het onbehandelde rioolwater bij 87% van de RWZI's. Deze RWZI's lagen verspreid over het hele land, en omvatten grote en kleine RWZI's en RWZI's met en zonder zorginstellingen in het verzorgingsgebied (Blaak *et al.*, 2021). De verspreiding van CPE zoals bleek uit de rioolwatermetingen, was omvangrijker dan van tevoren was verwacht gebaseerd op gegevens uit de humane surveillance: op het moment dat het onderzoek startte was in Nederland de epidemiologische status van CPE op zijn hoogst geclassificeerd geweest als "sporadische ziekenhuis-uitbraken", wat wil zeggen dat er af en toe sprake was van epidemiologisch ongerelateerde introducties van stammen (Albiger *et al.*, 2015; Nethmap, 2015)). Dat desondanks CPE veelvuldig aantoonbaar waren bij RWZI's in het hele land, suggereerde dat er in Nederland meer CPE dragers moesten zijn dan door middel van de humane surveillance werd waargenomen. De uitkomst van dit onderzoek toonde daarmee aan dat metingen in rioolwater zeer geschikt zijn voor het onderzoeken van de verspreiding van zeldzame resistente micro-organismen die niet altijd gepaard gaan met ziekteverschijnselen, zoals CPE. De reden hiervoor is dat in tegenstelling tot de humane surveillance van CPE, waarbij mensen alleen worden onderzocht op de aanwezigheid van CPE op medische indicatie (d.w.z. in geval van infectie of bij screening i.v.m. verhoogd risico op dragerschap voorafgaand aan ziekenhuisopname) het rioolwater een weergave geeft van de CPE die aanwezig zijn in de gehele bevolking, inclusief mensen die geen ziekteverschijnselen hebben. Rioolwater surveillance geeft informatie zowel over de geografische verspreiding van CPE als ook de mate van dragerschap.

Een relatief nieuwe vorm van resistentie bij Enterobacterales is resistentie tegen het "last resort" antibioticum colistine, veroorzaakt door het plasmide-geassocieerde "mobile colistin resistance" (*mcr*) gen (Liu *et al.* 2016). Net als CPE kunnen infecties veroorzaakt door colistine-resistente Enterobacterales moeilijk te behandelen zijn. In twee

¹ De term rioolwaterzuivering of afvalwaterzuivering wordt gehanteerd afhankelijk van de beheerder van de zuiveringsinstallaties. In dit rapport wordt vanaf dit punt voor het gemak de afkorting RWZI gebruikt om RWZI's en AWZI's in hun algemeenheid aan te duiden.

eerder in Nederland uitgevoerde bevolkingsonderzoeken, een in de algemene bevolking en een in mensen werkzaam in de veterinaire zorg, bleken *mcr*-positieve Enterobacterales (MCRE) respectievelijk bij 0,8% en 0,2% van de onderzochte mensen aangetoond (Dierikx *et al.*, 2021). Het zeldzame karakter van deze vorm van resistentie maakt dat ook voor MCRE rioolwatermetingen een waardevolle aanvulling op bevolkingsonderzoek-gebaseerde studies kunnen zijn om de verspreiding er van in kaart te brengen.

1.2 Doel

Het doel van het onderzoek was om de prevalentie en de geografische verspreiding van CPE en *mcr*-positieve *Escherichia coli* (MCR-EC) in de Nederlandse bevolking vast te stellen door middel van metingen in rioolwater bij RWZI's. Daarnaast had het onderzoek als doel om temporele trends in het vóórkomen van CPE te onderzoeken.

1.3 Aanpak

Omdat de rioolwatermetingen bedoeld zijn om inzicht te krijgen in het voorkomen van de onderzochte micro-organismen in de Nederlandse bevolking, is het van belang dat de RWZI's waar gemeten wordt representatief zijn voor de gehele Nederlandse bevolking. De 100 RWZI's die deel uit maakten van de metingen in 2016 (de "nulmetingen") waren deels geselecteerd om specifieke onderzoeksvragen te beantwoorden en niet sec met het oog op surveillance. De selectie van RWZI's is daarom in 2020 aangepast zodanig dat a) een zo groot mogelijk deel van de bevolking is gerepresenteerd met een beperkt aantal RWZI's (vanuit kostenefficiëntie); b) in elke provincie een evenredig percentage van de bevolking is gerepresenteerd; c) RWZI's van verschillende grootte en uit stedelijk en niet stedelijk gebied zijn geïncludeerd en d) elke provinciehoofdstad is gerepresenteerd. De selectiecriteria hebben geresulteerd in 76 RWZI's van de in totaal 317 RWZI's die begin 2020 actief waren in Nederland. Deze 76 RWZI's vertegenwoordigen gezamenlijk 7,5 miljoen Nederlanders, oftewel 43% van de bevolking.

De 76 RWZI's zijn in 2020 elk eenmalig bemonsterd ("cross-sectioneel" onderzoek). Daarnaast zijn 12 van deze RWZI's, namelijk RWZI's die elk verantwoordelijk zijn voor de zuivering van het rioolwater van (een deel van) één van de provinciehoofdsteden, tien tot elf keer bemonsterd in de periode van mei 2020 tot en met november 2021 ("longitudinaal" onderzoek). In de monsters zijn de aantallen en typen CPE vastgesteld, en is de aan- of afwezigheid van MCR-EC bepaald. Voor de surveillance van MCR-EC is in eerste instantie gekozen voor een niet-kwantitatieve aanpak omdat een kwantitatieve methode nog niet voor handen was en de huidige metingen als een eerste verkennende analyse werden beschouwd. Om praktische redenen is ook gekozen om voor deze eerste verkenning de analyses te beperken tot *E. coli*, de bacteriesoort waar het *mcr* gen het meest bij beschreven is (Quan *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2017).

De cross-sectionele analyse van 76 RWZI's is gebruikt om de prevalentie en geografische verspreiding van CPE en MCR-EC in Nederland vast te stellen en voor het identificeren van populatiekenmerken die

geassocieerd zijn met het vóórkomen van CPE. Daarnaast zijn deze metingen uitgevoerd om lange termijn trends in het voorkomen van CPE en CPE typen te kunnen onderzoeken. In een eerste aanzet hiertoe zijn de meetresultaten van 2020 vergeleken met die van 2016. De longitudinale metingen bij de 12 provinciehoofdstad RWZI's geven inzicht in korte termijn fluctuaties en veranderingen op de middellange termijn. Omdat het onderzoek bij toeval samenviel met de COVID-19 pandemie kon zo bestudeerd worden of de prevalentie van CPE en MCR-EC gedurende deze periode beïnvloed werd door maatregelen om de verspreiding van SARS-CoV-2 te voorkomen.

Binnen het kader van het huidige onderzoek is een eerste stap gezet om de overeenkomsten en verschillen tussen rioolwatersurveillance en humane surveillance te onderzoeken, door middel van een vergelijkende analyse van isolaten uit rioolwater en van humane oorsprong. Dit gebeurt door middel van het sequencen en vergelijken van het hele bacteriegenoom ("*whole genome sequencing*", of "WGS"). In eerste instantie zijn hiervoor rioolwater isolaten gebruikt afkomstig uit de nulmetingen van 2016 en uit onderzoeksprojecten uit 2017 en 2018 (Blaak *et al.*, 2019; Schmitt *et al.*, 2018; Schmitt *et al.*, 2017). In 2022 zullen ook de CPE en MCR-EC isolaten die zijn geïsoleerd als onderdeel van de rioolwatersurveillance van 2020-2021 door middel van WGS analyse met humane surveillance isolaten vergeleken worden.

1.4 Achtergrond

1.4.1 *Klinische relevantie CPE en MCRE*

Het vermogen om carbapenemases te produceren maakt bacteriën resistent tegen een grote groep van klinisch zeer relevante antibiotica, de beta-lactam antibiotica. Tot deze groep van antibiotica horen penicillinen, cefalosporinen en carbapenems. Daarnaast gaat resistentie tegen beta-lactam antibiotica ook vaak gepaard met resistentie tegen andere klassen van antibiotica. Dit maakt dat de mogelijkheden tot behandelen van infecties met CPE zeer beperkt zijn, mogelijk resulterend in sterfte (Doi and Paterson 2015, Tzouvelekis *et al.* 2014). Infecties met CPE worden daarom gezien als een belangrijke bedreiging voor de volksgezondheid (WHO, 2017). Er zijn verschillende CPE-typen, te onderscheiden naar de bacteriesoort en het type carbapenemase dat de bacterie heeft. De meest voorkomende CPE species zijn *E. coli* en *K. pneumoniae*. Carbapenemases zijn onderverdeeld in drie klassen, de klasse A (o.a. GES, KPC), klasse B (o.a. de metallo- β -lactamases, zoals NDM, VIM en IMP) en de klasse D carbapenemases (OXA-48 en OXA-48-achtige carbapenemases). De mate van resistentie tegen β -lactamases en carbapenems verschilt tussen CPE-typen, wat ook consequenties heeft voor de behandeling. Zo zijn CPE met OXA-48 of OXA-48-achtige carbapenemases vaak minder resistent tegen carbapenems dan CPE met klasse A of B carbapenemases (Fattouh *et al.*, 2015; Nethmap, 2021; Poirel *et al.*, 2012; van der Zwaluw *et al.*, 2020). Daarnaast hangen de behandelingsmogelijkheden af van de aanwezigheid van resistenties tegen andere antibiotica (multiresistentie)(Lee *et al.*, 2022).

Eén van de middelen die behoren tot de laatste behandelingsmogelijkheden in het geval van multiresistente CPE is het antibioticum colistine (van Duin *et al.*, 2013). Colistine is een antibioticum dat al

langer bekend is en gebruikt werd in landbouwhuisdieren, maar nauwelijks in mensen werd gebruikt vanwege ernstige bijwerkingen. Nu wordt het in de humane gezondheidszorg gebruikt als een laatste redmiddel bij ernstige infecties met multiresistente bacteriën. In 2015 is voor het eerst een plasmide-geassocieerde vorm van colistine resistentie beschreven, veroorzaakt door het "mobile colistin resistance" of *mcr* gen (Liu *et al.*, 2016). Omdat colistine een laatste redmiddel is in de strijd tegen ernstige infecties met multiresistente bacteriën en resistentie tegen colistine zich sneller kan verspreiden vanwege het *mcr* gen, staat colistine sinds 2016 op de lijst met kritisch belangrijke antibiotica van de hoogste prioriteit voor gebruik in mensen (WHO, 2018). De ontwikkeling van colistine-resistentie bij multiresistente bacteriën wordt wereldwijd gezien als een serieus klinisch en volksgezondheidsprobleem en opname van deze vorm van resistentie in nationale AMR surveillance programma's wordt door de WHO aanbevolen (WHO, 2021).

Carbapenem- en colistine-resistentie komen met name voor bij Enterobacterales. Tot deze bacteriefamilie behoren onder andere bacteriesoorten die relatief onschadelijk zijn en van nature voorkomen in de darmen van mens en dier, zoals *E. coli*. De aanwezigheid van een niet-ziekteverwekkende CPE of MCRE in darmen ("dragerschap") is op zich niet direct bedreigend voor iemand die dat heeft. De bacteriën verdwijnen vanzelf weer uit de darmen (van Hattem *et al.* 2016). Echter, bij mensen met een verminderde weerstand zoals ziekenhuispatiënten, kunnen ook relatief onschuldige Enterobacterales tot infectie leiden. Daarnaast kan dragerschap bijdragen tot een verdere verspreiding van CPE en MCRE binnen de gemeenschap, waardoor ook de kans toeneemt dat kwetsbare personen blootgesteld worden.

1.4.2 Prevalentie in Nederland en de wereld: CPE

De prevalentie van CPE verschilt tussen Europese landen en landen wereldwijd, en varieert van sporadische uitbraken in ziekenhuizen tot endemisch voorkomen (Albiger *et al.*, 2015; Friedman *et al.*, 2017; Logan and Weinstein, 2017). In Nederland komen CPE nog steeds weinig voor en dragerschap wordt vooral geassocieerd met reizen en ziekenhuisopname in het buitenland (Nethmap, 2015). Met name ziekenhuisopnames in Marokko en Turkije zijn geassocieerd met CPE dragerschap, maar ook in landen in Zuid-Azië en Zuid-Europa (Nethmap, 2015). In deze regio's komen CPE endemisch voor (Friedman *et al.*, 2017).

Van alle klinische *E. coli* en *K. pneumoniae* isolaten die in 2019 in Nederland zijn onderzocht op carbapenemresistentie en geregistreerd zijn in het "Infectieziekten Surveillance Informatie Systeem – Antibiotica Resistentie" (ISIS-AR), had 0,7% een verhoogde ongevoeligheid voor carbapenems (Nethmap, 2020). Dat geeft aan dat carbapenem-resistentie nog relatief weinig voorkomt. Dit wordt bevestigd door studies uitgevoerd tussen 2011 en 2016 naar ESBL en CPE dragerschap in de Nederlandse bevolking, waar bij in totaal ongeveer 4400 onderzochte personen slechts één CPE-drager werd gevonden (Reuland *et al.*, 2016a; van den Bunt *et al.*, 2019; van Hoek *et al.*, 2015). Het lage aantal CPE dragers in de algemene bevolking werd ondersteund door de rioolwatermetingen in 2016 (Blaak *et al.*, 2021). In die metingen bleken CPE concentraties in rioolwater ongeveer 300 keer

lager te zijn dan ESBL-EC concentraties. Uitgaande van een ESBL prevalentie van 5% (van den Bunt *et al.*, 2019) en aannemende dat asymptomatische dragers van ESBL en CPE evenveel van ESBL dan wel CPE bacteriën in hun ontlasting hebben, werd de CPE prevalentie geschat op ongeveer 0,015%, oftewel 1 op de 6700 personen (Blaak *et al.*, 2021). Er zijn verschillende CPE-typen, te onderscheiden naar de bacteriesoort en het typen carbapenemase-gen dat de bacterie heeft. In de Nederlandse humane surveillance zijn de meest voorkomende CPE-typen *E. coli* en *K. pneumoniae* met *bla*_{OXA-48} of *bla*_{OXA-48}-achtige genen, *bla*_{NDM-5} en *bla*_{NDM-1} (Nethmap, 2015). Andere relevante carbapenemasegenen, zoals *bla*_{KPC} en *bla*_{VIM} worden ook, maar minder vaak bij deze bacteriesoorten aangetroffen (van der Zwaluw *et al.*, 2020).

1.4.3 Prevalentie in Nederland en de wereld: MCRE

Resistentie tegen colistine was tot 2015 alleen geassocieerd met mutaties op het chromosoom (wat niet overdraagbaar is tussen bacteriën onderling). In 2015 is voor het eerst plasmide-geassocieerde colistine resistentie ontdekt. Dat was bij een *E. coli* isolaat afkomstig uit een varken in China (Liu *et al.*, 2016). Dit gen, het *mcr* gen, bleek retrospectief al sinds 2011 in China voor te komen met name bij isolaten uit varkens en kippen, maar ook al bij klinische isolaten (Liu *et al.*, 2016; Shen *et al.*, 2021; Wang *et al.*, 2017). Ondanks dat in China in 2014 21-28% van onderzochte *E. coli* uit varkens en varkens- en kippenvlees het *mcr* gen bleken te hebben, was in die tijd en de jaren daarna, slechts een zeer klein deel van *E. coli* en *K. pneumoniae* uit patiënten en gezonde personen drager van dit gen: rond 1% voor *E. coli* en 0,2-0,3% voor *K. pneumoniae* (Liu *et al.*, 2016; Lu *et al.*, 2020; Quan *et al.*, 2017). Vanaf 2017 is de prevalentie bij mensen in China afgenomen, wat toegeschreven wordt aan een ban op het gebruik van colistine in dieren (Shen *et al.*, 2021). Sinds de ontdekking van *mcr* in China is het gen aangetroffen bij *Enterobacterales* uit mensen en dieren over de hele wereld (Sun *et al.*, 2018). In Nederland zijn twee studies uitgevoerd naar het voorkomen van colistine-resistentie en MCRE: één in de algemene bevolking en één bij mensen werkzaam in de veterinaire zorg. Hieruit bleek dat colistine-resistente *Enterobacterales* bij respectievelijk 5,4% en 8,1% van de onderzochte mensen voorkomen, en MCRE bij respectievelijk 0,8% en 0,2% (Dierikx *et al.*, 2021).

1.4.4 Rioolwater surveillance van BRMO's

Micro-organismen die aanwezig zijn in de darmen van mensen komen met de ontlasting in het riool terecht. Rioolwater wordt ingezameld in rioolstelsels en getransporteerd naar RWZI's waar het gezuiverd wordt. Huishoudens leveren het grootste deel van het afvalwater dat in Nederland in het riool terecht komt, namelijk 71%. Het overige rioolwater komt van industrie en instellingen, waaronder 3,3% van zorginstellingen (CBS 2011). Naast uitwerpselen van mensen bevat rioolwater ook uitwerpselen van dieren door lozingen vanuit landbouw, bosbouw en jacht (0,6%, CBS 2013), maar ook van dieren die in het riool leven (bijvoorbeeld ratten) of dieren die op straat poepen (bijvoorbeeld honden en vogels). Hoewel er geen gegevens beschikbaar zijn van het niveau van contaminatie van rioolwater met dierlijke uitwerpselen, wordt het rioolwater verondersteld grotendeels van humane oorsprong te zijn en daarmee een mogelijkheid te bieden voor

surveillance van humane darmpathogenen. Zo is rioolwater surveillance al enige jaren geleden toegevoegd als aanvullende surveillance tool om de verspreiding van poliovirus te monitoren in de wereldwijde inspanningen om het poliovirus uit te roeien (Asghar et al. 2014, WHO 2003). Sinds maart 2020, aan het begin van de SARS-CoV-2 pandemie, worden door het RIVM metingen verricht in rioolwater om de verspreiding van het virus en het besmettingsniveau te monitoren (Lodder and de Roda Husman, 2020). Van wekelijkse metingen bij een beperkt aantal RWZI's is deze monitoring – in nauwe samenwerking met de Nederlandse waterschappen en de Unie van Waterschappen – uitgegroeid tot een omvangrijke surveillance waarbij het influent (inkomende rioolwater) van elk van de 313 RWZI's van Nederland vier keer per week geanalyseerd wordt op de aanwezigheid van SARS-CoV-2 en waarvan de resultaten wekelijks worden toegevoegd aan het Coronadashboard (Coronadashboard, 2022). Tijdens de SARS-CoV-2 pandemie is rioolwatersurveillance een waardevolle aanvulling gebleken op de gegevens over aantallen en percentages positieve testen.

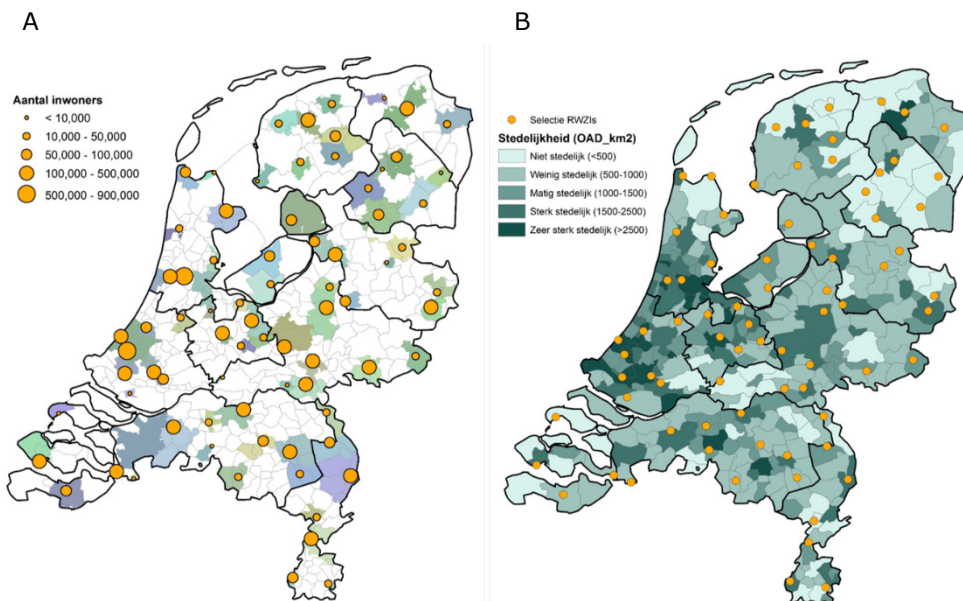
In de internationale wetenschappelijke ABR gemeenschap wordt rioolwatersurveillance ook gezien als een kosteneffectieve methode om inzicht te krijgen in de verspreiding en de moleculaire eigenschappen van antibioticaresistente bacteriën en hun resistentie genen, zowel binnen landsgrenzen als op wereldniveau (Aarestrup and Woolhouse, 2020; Hendriksen *et al.*, 2019; Huijbers *et al.*, 2020; Hutinel *et al.*, 2019; Kwak *et al.*, 2015; Pärnänen *et al.*, 2019). Het grote voordeel van rioolwatersurveillance is dat het niet nodig is om individuen te bemonsteren en daardoor de mogelijkheid biedt om grote delen van de algemene bevolking, op een anonieme en niet-invasieve manier, tegelijk te screenen. De huidige toepassingen van rioolwater surveillance op het gebied van ABR variëren van het inventariseren van complete populaties van micro-organismen ("microbiomen") en hun resistenties ("resistomen") door middel van "next generation sequencing" (Aarestrup and Woolhouse, 2020; Fresia *et al.*, 2019; Hendriksen *et al.*, 2019), tot het vaststellen van het voorkomen van bepaalde resistentiegenen (Pärnänen *et al.*, 2019) of bepaalde bacteriesoorten en resistentie combinaties (Hutinel *et al.*, 2019; Kwak *et al.*, 2015).

In 2016 heeft het RIVM rioolwatersurveillance in Nederland geïntroduceerd als tool voor de detectie van zeldzame vormen van klinisch relevante antibioticaresistente bacteriën, ook aangeduid als "bijzonder resistente micro-organismen" (BRMO's), in de algemene bevolking (Blaak *et al.*, 2021; Schmitt *et al.*, 2017). De metingen die destijds zijn uitgevoerd waren zogenaamde "nulmetingen", oftewel metingen om een eerste indruk te krijgen van de bruikbaarheid van dit type metingen voor zeer zeldzame antibioticaresistente bacteriën als CPE, alsook van het voorkomen van deze bacteriën in de Nederlandse bevolking. Het in dit rapport beschreven onderzoek is een eerste vervolgmeting, uitgevoerd in 2020 en 2021 en maakt onderdeel van de Nederlandse ABR surveillance.

2 Methoden

2.1 Geïnccludeerde RWZI's en AWZI's

Bij aanvang van het project waren 317 RWZI's actief in Nederland. Hieruit is een selectie gemaakt van RWZI's die een representatief beeld geeft van de Nederlandse bevolking. Er is daarbij gezocht naar een balans tussen representativiteit en kosten. Het eindresultaat is een selectie van 76 RWZI's, die gezamenlijk 43% van de Nederlandse bevolking verzorgen (Tabel 2-1). Er zijn RWZI's geïnccludeerd van verschillende grootte voor wat betreft het aantal aangesloten huishoudens en in gebieden met verschillende mate van stedelijkheid (Figuur 2-1). Verder zijn de RWZI's zó geselecteerd dat in elke provincie het percentage inwoners in de verzorgingsgebieden (of zuiveringskringen) van de geselecteerde RWZI's ten opzichte van het totaal aantal inwoners in de provincie, vergelijkbaar is (Tabel 2-1). Tenslotte is er gestreefd naar een zo evenwichtig mogelijke geografische verdeling (Figuur 2-1). Eenenvoertig van de 76 RWZI's waren ook geïnccludeerd in de pilotmetingen uitgevoerd in 2016.



Figuur 2-1 De 76 voor surveillanc geselecteerde RWZI's. A) Weergegeven zijn de locaties en grootte van de RWZI's (oranje symbolen) en de zuiveringskringen (in kleur); de zuiveringskringen zijn gebaseerd op data van het CBS (CBS, 2021). B) Weergegeven zijn de locatie van de RWZI's (oranje symbolen) en de mate van stedelijkheid per gemeente (CBS Statline, 2020b). Zie bijlage 8.1 voor de indeling van RWZI's in aantallen en percentages.

In de selectie van 76 RWZI's zitten ook twaalf provinciehoofdstad RWZI's. Deze RWZI's verzorgen de gehele hoofdstad (Groningen, Leeuwarden, Assen, Lelystad, Arnhem, Walcheren, Den Bosch), of een deel er van (Zwolle, Utrecht, Haarlem, Den Haag, Maastricht)(zie bijlage 8.2). In het laatste geval zijn er meerdere RWZI's die elk een deel van

de hoofdstad verzorgen. De 12 provinciehoofdstad RWZI's zijn tijdens de duur van het onderzoek herhaaldelijk bemonsterd.

Het aantal inwoners dat in een zuiveringskring van een RWZI woont is gebaseerd op een in 2020 door het CBS uitgevoerde analyse, waarin ruimtelijke gegevens (rioolkaarten) zijn verzameld bij de individuele waterschappen en omgezet naar polygonen. De polygonen zijn gekoppeld aan adres- en huishoudensgegevens. Deze tabel is in januari 2021 openbaar geworden (CBS, 2021). Gebaseerd op de adres- en huishoudensgegevens is door het CBS naast het aantal inwoners ook demografische informatie verzameld, zoals geslacht, leeftijd en migratieachtergrond. In de openbare tabel is tevens aangegeven welk percentage van de inwoners van een zuiveringskring in welke gemeente woont. De gegevens worden door het CBS regelmatig geüpdatet voor wat betreft veranderingen in zuiveringskringen (bijvoorbeeld door sluiting RWZI's, nieuwe wijken) of gemeenten (fusie van gemeenten).

Tabel 2-1 Het aantal inwoners in verzorgingsgebieden per provincie.

Provincie	Aantal inwoners bij geselecteerde RWZI's	Totaal aantal inwoners in provincie	Percentage van totaal
Drenthe	207.098	493.682	42%
Flevoland	169.481	423.021	40%
Friesland	274.999	649.957	42%
Gelderland	900.288	2.085.952	43%
Groningen	277.118	585.866	47%
Limburg	495.163	1.117.201	44%
Noord-Brabant	1.044.398	2.562.955	41%
Noord-Holland	1.172.613	2.879.527	41%
Overijssel	496.868	1.162.406	43%
Utrecht	551.952	1.354.834	41%
Zeeland	175.891	383.488	46%
Zuid-Holland	1.728.613	3.708.696	47%
Totaal	7.494.482	17.407.585	43%

Weergegeven is het totaal aantal inwoners in de zuiveringskringen van de geselecteerde RWZI's per provincie (CBS, 2021) en het totaal aantal inwoners in de provincie per 1-1-2020 (CBS Statline, 2020a).

2.2 Monstername

Van elke RWZI werden monsters van het influent (inkomend ongezuiverd rioolwater) genomen met behulp van automatische bemonsteringsapparatuur. Met deze apparatuur worden gedurende een periode van 24 uur meerdere 'hapjes' afvalwater genomen van het langststromende afvalwater en verzameld in een vat. Dit gebeurt "debiet-proportioneel", wat betekent dat bij elk bepaald volume afvalwater dat de monsternamelocatie passeert zo'n hapje wordt genomen. Door gedurende 24 uur te bemonsteren worden representatieve mengmonsters verkregen waarin zoveel mogelijk van de aangesloten inwoners gerepresenteerd zijn, door debiet-proportioneel te bemonsteren wordt er gecorrigeerd voor verschillen in watergebruik

gedurende een dag. Dat laatste is belangrijk omdat de bacterieconcentratie in het rioolwater wordt beïnvloed door de hoeveelheid water dat in het riool zit. De monsternames werden afhankelijk van de locatie – uitgevoerd door medewerkers van de RWZI of van commerciële waterlaboratoria. Monsters werden gekoeld naar het RIVM vervoerd waar ze in de koelkast werden opgeslagen tot analyse. De analyses werden binnen 36 uur vanaf stop monsternamen ingezet. Van alle geselecteerde RWZI's werd eenmalig een influentmonster geanalyseerd in de periode mei tot en met december 2020. De twaalf provinciehoofdstad RWZI's zijn gedurende 18 maanden (tot en met oktober 2021) tien of elf keer bemonsterd met een gemiddelde tussenpoos van 8 weken (spreiding 3 tot 14 weken). Vanwege COVID-19 lockdown maatregelen tussen december 2020 en februari 2021 zijn vijf van deze RWZI's één keer minder bemonsterd dan de overige zeven.

2.3 Detectie, enumeratie en isolatie van CPE

Voor de detectie, enumeratie en isolatie van CPE werden rioolwatermonsters gefiltreerd door membraanfilters met een poriëgrootte van 0,45µm. De filters werden vervolgens op selectieve kweekmedia geplaatst. Deze media bevatten carbapenem antibiotica waardoor alleen carbapenem-resistente bacteriën er op kunnen groeien. Er zijn twee verschillende media gebruikt: ChromID CARBA agar en ChromID OXA48 agar (beide media van Biomerieux, Amersfoort), die verschillen in de specifieke samenstelling van carbapenem antibiotica die zijn toegevoegd. Door beide media te gebruiken kunnen alle typen CPE gedetecteerd worden. Van elk monster werden vier verschillende volumes gefiltreerd (1, 3, 10 en 30 ml), in tweevoud. Van elk volume werd één filter op ChromID CARBA gelegd en de andere op ChromID OXA48. De filters werden 4 tot 5 uur geïncubeerd bij 36±1°C, gevolgd door 21±3 uur bij 44±0.5°C. De hoge incubatietemperatuur wordt gebruikt om specifiek de groei van andere bacteriesoorten dan Enterobacterales ("stooflora") te remmen.

Na incubatie van de filters op ChromID CARBA agar en ChromID OXA48 agar, werden de verdachte kolonies geteld. Op beide platen kleuren kolonies van *E. coli* roze en kleuren kolonies van *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Enterobacter* en *Serratia* (KESC) blauw. Van beide type platen werd een aantal van de representatieve kolonies rein gekweekt op het type plaat waarop ze geïsoleerd zijn (maximaal 2 roze en 2 blauwe van OXA48 agar, maximaal 8 roze en 8 blauwe voor CARBA agar). Isolaten met efficiënte groei op deze platen werden gedefinieerd als resistent². Van resistente isolaten werd door middel van MALDI-TOF de identiteit bevestigd (in het geval van *E. coli*) of vastgesteld (in het geval van isolaten van de "KESC" groep). Alle isolaten die bevestigd werden als een Enterobacterales soort werden vervolgens onderzocht op de aanwezigheid van genen die coderen voor KPC, NDM, OXA-48, VIM en IMP carbapenemases. De eerste vier carbapenemases zijn de meest voorkomende in Nederland.

Om de gevonden aantallen CPE in rioolwater in een referentiekader te kunnen plaatsen werden in de monsters ook de aantallen totale *E. coli*

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

(filtratie van 0,03, 0,1, 0,3 en 1 µl) en ESBL-producerende *E. coli* (filtratie van 3, 10, 30 en 100 µl) bepaald. Dit werd gedaan door de filters te plaatsen op respectievelijk Tryptone Bile X-glucuronide (TBX) agar en ChromID ESBL agar, en dit 4 tot 5 uur te incuberen bij $36\pm 1^\circ\text{C}$, gevolgd door 21 ± 3 uur bij $44\pm 0,5^\circ\text{C}$. Na incubatie werden de *E. coli* kolonies geteld: *E. coli* zijn op TBX herkenbaar als groene kolonies en op ChromID ESBL agar als roze kolonies. Omdat TBX en ChromID ESBL agar heel specifiek zijn voor de detectie van respectievelijk *E. coli* en ESBL-producerende *E. coli* is het voor de berekening van concentraties niet nodig om een extra bevestiging uit te voeren (zoals gedaan voor de CPE), de concentraties zijn direct gebaseerd op de koloniaantallen.

2.4 Detectie en isolatie van *mcr*-positieve *E. coli*

Om de aan- of afwezigheid van *mcr*-positieve *E. coli* te bepalen, werd van elk monster 100 µl, 1 ml en 10 ml gefiltreerd, waarna de filters in 10 ml vloeibaar medium werden gedaan ("Brain Heart Infusion Broth") waaraan een diskje met 10 µg colistine werd toegevoegd (Sensi-Disc, BD, Vianen), zodat het medium een eindconcentratie van 1 µg/ml had. Dit werd geïncubeerd gedurende 4 uur bij $36\pm 1^\circ\text{C}$. Na deze incubatie werd 50 µl vanuit de ophoping afgeënt op ChromID ColR medium (Biomerieux, Amersfoort) en dit werd geïncubeerd gedurende 18-24 uur bij $44^\circ\pm 0,5^\circ\text{C}$. Op dit medium groeien *E. coli* als roze kolonies. Van elke monster werden maximaal vier roze kolonies rein gekweekt op ChromID ColR agar. Van op deze manier bevestigd resistente isolaten werd de identiteit bevestigd door middel van MALDI-TOF. Alle verdacht colistine-resistente *E. coli* isolaten werden vervolgens onderzocht op de aanwezigheid van *mcr* genen.

2.5 Bevestiging identiteit en resistentie

2.5.1 *Species en genus identificatie*

Alle bevestigd resistente isolaten (1684 carbapenem-resistent en 752 colistine-resistent) werden geïdentificeerd met behulp van MALDI-TOF MS (Bruker Daltonics GmbH, Bremen, Germany), gebruikmakend van de referentiedatabases BDAL (versie 9.0.0.0) en SR (versie 1.0.0.0). Met behulp van deze methode konden de isolaten geïdentificeerd worden tot op species of genus niveau en daarmee bevestigd als een Enterobacterales: *E. coli*/*S. dysenteriae* ($n=1637$), *Klebsiella pneumoniae* complex (= *K. pneumoniae*, *K. variicola*, $n=667$), *K. aerogenes* ($n=16$), *Enterobacter cloacae* complex (*E. cloacae*, *E. asburiae*, *E. kobei*, *E. ludwigii*, $n=56$), *Citrobacter freundii*, $n=16$). In totaal konden 14 (0.6%) van de resistente isolaten niet bevestigd worden als Enterobacterales (ofwel er was sprake van een andere bacteriefamilie, ofwel een isolaat was niet identificeerbaar aan de hand van de gebruikte referentiedatabases).

2.5.2 *Aantonen resistentiegenen*

Voor alle bevestigde CRE isolaten werd de aanwezigheid van carbapemase-genen onderzocht met behulp van twee (multiplex) PCR's: één voor de detectie van *bla*_{OXA-48}, *bla*_{NDM} en *bla*_{KPC}, en één voor *bla*_{VIM} en *bla*_{IMP}. Voor alle verdachte colistine-resistente isolaten die bevestigd *E. coli* waren, werd de aanwezigheid van *mcr* genen) onderzocht door middel van twee multiplex PCR's, één voor de *mcr* varianten *mcr*-1 t/m *mcr*-5 en één voor de varianten *mcr*-6 t/m *mcr*-9. Indien een *mcr*-gen

werd aangetoond werd een (singleplex) PCR gedaan om de aanwezigheid van de variant in kwestie te bevestigen. Bij alle PCR's werden de PCR-producten gevisualiseerd door middel van gel-elektroforese. Alle gebruikte primers zijn beschreven in bijlage 8.3.

2.6 Berekenen CPE concentraties en vrachten

2.6.1 Berekenen van concentraties

De CPE concentraties zijn gebaseerd op de aantallen roze en blauwe kolonies op beide typen CPE-specifieke media. De concentraties zijn apart berekend voor *E. coli* (doorgaans roze) en KESC (doorgaans blauw) en voor CPE met een OXA-48 type carbapenemase-gen (resultaten op ChromID OXA48 agar) en van CPE met andere typen carbapenemase-gen (resultaten op ChromID CARBA agar). Dit resulteert in vier concentraties, elk voor een van de volgende typen CPE: $C_{E.coli/OXA48}$, $C_{E.coli/CARBA}$, $C_{KESC/OXA48}$, $C_{KESC/CARBA}$.

De basisformule voor de berekening van bacterieconcentraties is:

$$C = \frac{\sum_{i=1}^4 N_i}{\sum_{i=1}^4 V_i} = \frac{N_{tot}}{V_{tot}} \quad (i)$$

Waarbij N_i het aantal kolonies is op filter i , N_{tot} het totaal aantal kolonies, V_i het gefiltreerde volume op filter i en V_{tot} het totaal gefiltreerde volume. De concentratie wordt uitgedrukt in het aantal "kolonievormende eenheden" (KVE) per volume-eenheid. De concentraties totale *E. coli* en ESBL-producerende *E. coli* concentraties werden volgens formule (i) uitgerekend, gebaseerd op de koloniaantallen op TBX (groene kolonies) en ChromID ESBL agar (roze kolonies).

De concentratie carbapenem-resistente bacteriën werd verkregen door het totaal aantal getelde kolonies eerst te vermenigvuldigen met de fractie (F_R) van afgeënte isolaten die bevestigd carbapenem-resistent waren, gebaseerd op het resultaat van de reinkweek op isolatiemedium:

$$C_R = \frac{N_{tot} \times F_R}{V_{tot}} \quad (ii)$$

C_R werd apart berekend per kolonie-kleur en medium, resulterend in vier concentraties: $C_{R(roze/OXA48)}$ ($=C_{R1}$), $C_{R(roze/CARBA)}$ ($=C_{R2}$), $C_{R(blauw/OXA48)}$ ($=C_{R3}$) en $C_{R(blauw/CARBA)}$ ($=C_{R4}$).

Met behulp van de resultaten van de MALDI-TOF en PCR's zijn de fracties isolaten met de juiste identiteit bepaald: de fractie *E. coli* ($=F_{E.coli}$) en de fractie *Klebsiella*, *Enterobacter*, en *Citrobacter* ($=F_{KEC}$) (*Serratia* werd niet aangetroffen), en de fractie isolaten met *bla*_{OXA-48} ($=F_{OXA48}$) voor isolaten afkomstig van ChromID OXA48 agar en de fractie isolaten met *bla*_{GES}, *bla*_{IMP}, *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM} of *bla*_{VIM} ($=F_{carba}$) voor isolaten afkomstig van ChromID CARBA. Deze gegevens zijn gebruikt om de concentratie $C_{E.coli/OXA48}$, $C_{E.coli/CARBA}$, $C_{KEC/OXA48}$, $C_{KEC/CARBA}$ te berekenen als volgt:

$$C_{E.coli/OXA48} = C_{R1} \times F_{E.coli} \times F_{OXA48} \quad (\text{iii})$$

$$C_{KEC/OXA48} = C_{R3} \times F_{KEC} \times F_{OXA48} \quad (\text{iv})$$

$$C_{E.coli/CARBA} = (C_{R2} \times F_{E.coli} \times F_{CARBA}) + (C_{R4} \times F_{E.coli} \times F_{CARBA}) \quad (\text{v})$$

$$C_{KEC/CARBA} = (C_{R4} \times F_{KEC} \times F_{CARBA}) + (C_{R2} \times F_{KEC} \times F_{CARBA}) \quad (\text{vi})$$

De totale CPE concentratie is berekend door de uitkomsten van formule iii t/m vi bij elkaar op te tellen. De totale concentratie CP *E. coli* is bepaald door de uitkomst van formule iii en formule v bij elkaar op te tellen, de totale concentratie CP KEC is bepaald door de uitkomst van formule iv en vi bij elkaar op te tellen.

Voor MCR-EC zijn geen concentraties berekend omdat dat met de gebruikte niet-kwantitatieve methode niet mogelijk is.

2.6.2 Berekenen van (gewogen) bacterievrachten

De bacterievracht (L) is het totale aantal bacteriën dat per tijdseenheid op een meetlocatie langs stroomt. In de huidige studie is de vracht per 24 uur berekend. Dat is gedaan door de concentratie bacteriën (C) in het rioolwater (bemonsterd gedurende 24 uur) te vermenigvuldigen met de hoeveelheid rioolwater dat in die 24 uur op de meetlocatie is langs gestroomd (het dagdebiet, Q). Om RWZI's onderling met elkaar te kunnen vergelijken is de gewogen vracht (L_w) berekend, dat wil zeggen de vracht uitgedrukt per 100.000 aangesloten inwoners (N_{inw}):

$$L_w = \frac{c \times Q}{N_{inw}} \times 100.000$$

2.7 Data analyse en statistische analyses

2.7.1 Cross-sectionele en longitudinale analyse

De cross-sectionele data, d.w.z. één meetpunt voor elke van 76 RWZI's, zijn gebruikt om de prevalentie en verspreiding van CPE en MCR-EC te onderzoeken, om associaties met populatiekenmerken te onderzoeken, en als onderdeel van een lange termijn trendanalyse (die voor nu nog beperkt is tot twee tijdstippen, namelijk 2016 en 2020). In deze analyses zijn van de longitudinaal bemonsterde provinciehoofdstad RWZI's alleen de monsters van de eerste monsternamen meegenomen. De longitudinale data van de provinciehoofdstad RWZI's zijn gebruikt voor korte en middellange termijn trendanalyses, d.w.z. tussen mei 2020 en november 2021.

2.7.2 Trendanalyse: vergelijken 2016 en 2020

Of er een overeenkomst is tussen de aan- en afwezigheid van CPE en de verschillende CPE typen bij dezelfde 41 RWZI's in 2016 en 2020, is getoetst met behulp van de McNemar's test. De gewogen CPE vrachten zijn voor beide jaren vergeleken door middel van beschrijvende statistieken (meetkundig gemiddelde, mediaan, 1^e en 3^e kwartiel) en een gepaarde T-test op de log-getransformeerde waarden. Impliciet betekent deze log-transformatie dat nul-waarden (negatieve RWZI's) niet zijn meegerekend.

Daarnaast zijn de vrachten in beide jaren vergeleken aan de hand van de totale vrachten, oftewel de som van de vrachten van alle 41 RWZI's. Deze totale vrachten representeren het totaal aantal CPE dat per dag in het rioolwater werd aangetroffen in 2016 en 2020 en zijn afkomstig uit dezelfde populatie van in totaal $4,4 \times 10^6$ personen, aangenomen dat de populaties in de zuiveringskringen niet significant is veranderd wat betreft aantal en samenstelling.

Voor het bepalen van de som van de vrachten zijn twee methoden gebruikt: 1) voor RWZI's waar geen CPE werden aangetroffen werd aangenomen dat ze niet aanwezig waren (vracht van nul), 2) voor RWZI's waar geen CPE werden aangetroffen werd aangenomen dat de concentraties net onder de detectielimiet waren (vracht gelijk aan de detectielimiet, d.w.z. tussen $1 \times 10^7 - 6 \times 10^9$ CPE per RWZI per dag, afhankelijk van het debiet). De twee methoden representeren twee uitersten, de realiteit ligt waarschijnlijk ergens in het midden.

De totale CPE vrachten zijn gebruikt om de relatieve bijdrage van de verschillende CPE typen aan de totale vracht te kunnen berekenen. Dit is gedaan door de som van alle vrachten van een type (bijvoorbeeld OXA48-EC) te delen door de som van de complete CPE vrachten:

$$L_{relatief[type]} = \frac{\sum_{i=1}^{41} L_{i[type]}}{\sum_{i=1}^{41} L_{i[CPE]}} \times 100$$

2.7.3 Totale gewogen vrachten per provincie en op landsniveau

Voor alle 76 onderzochte RWZI's zijn de totale gewogen CPE vrachten berekend volgens onderstaande formule. Op provincieniveau zijn de totale gewogen vrachten op vergelijkbare wijze berekend, voor alle onderzochte RWZI's per provincie (3 tot 10, afhankelijk van de provincie).

$$L_{gewogen\ totaal} = \frac{\sum_{i=1}^{76} L_i}{\sum_{i=1}^{76} N_{inw_i}} \times 100.000$$

2.7.4 Schatting dragerschap in de bevolking

In 2016 is het percentage CPE dragers geschat door middel van een puntschatting gebaseerd op de CPE vracht, de ESBL-vracht en het percentage ESBL-dragers in Nederland in 2014-2016 (Blaak *et al.*, 2021; van den Bunt *et al.*, 2019). Omdat er voor 2020 geen informatie beschikbaar is over het percentage ESBL-dragers (en dat veranderd kan zijn ten opzichte van 2014-2016), is voor dit jaar het percentage dragers (D) in de bevolking geschat gebaseerd op de CPE vracht en de *E. coli* vracht ten opzichte van dat in 2016 volgens de formule:

$$D_{2020} = D_{2016} \times \frac{L_{CPE_2020}}{L_{E.coli_2020}} \times \frac{L_{E.coli_2016}}{L_{CPE_2016}} \times 100$$

Waarbij dragerschap, CPE vracht en *E. coli* vracht uit 2016 (respectievelijk D_{2016} , L_{CPE_2016} , $L_{E.coli_2016}$) afkomstig zijn uit Blaak *et al.* (2021). De schatting is gebaseerd op de aanname dat de uitscheiding van *E. coli* per persoon bij dezelfde RWZI's in beide jaren gelijk is. Daarnaast is aangenomen dat CPE dragers in beide jaren gemiddeld evenveel CPE uitscheidden.

2.7.5

Associaties tussen gewogen CPE vrachten en populatiekenmerken

Met behulp van univariate analyses is onderzocht of er een associatie is tussen de gewogen CPE vracht voor RWZI's met aangetoonde CPE en eigenschappen van de populatie in de RWZI verzorgingsgebiedenvrachten. Onderzochte eigenschappen zijn het aantal aangesloten inwoners, de adressendichtheid (=de parameter voor stedelijkheid), de aanwezigheid van ziekenhuizen en het percentage personen met een migratieachtergrond. De motivatie voor de laatste parameter is het idee dat mensen met een ander land van herkomst regelmatig hun moederland bezoeken, en daardoor gemiddeld vaker reizen dan mensen zonder migratieachtergrond (van den Bunt *et al.*, 2019), en het gegeven dat reizen een risicofactor is voor het krijgen van CPE (en andere resistente bacteriën). Migratieachtergrond is dus onderzocht als proxy voor reisgedrag (waar verder geen informatie over beschikbaar is in de onderzochte gebieden). Omdat het vóórkomen van CPE en verschillende CPE typen verschilt per werelddeel, is migratieachtergrond niet alleen in zijn geheel onderzocht, maar ook opgesplitst naar westerse en niet-westerse oorsprong. De motivatie om het effect van de aanwezigheid van ziekenhuizen mee te nemen is dat ziekenhuizen als "hotspot" van antibioticaresistentie worden beschouwd en, zoals eerder aangetoond, het rioolwater van ziekenhuizen een bron kan zijn van CPE in gemeentelijk rioolwater (Schmitt *et al.*, 2018). Het aantal inwoners en de adressendichtheid zijn onderzocht met het idee dat nauw contact de verspreiding van micro-organismen kan faciliteren, of dat mogelijk een verschillende levensstijl (o.a. beroep, reisgedrag) van mensen in dun- en dichtbevolkte gebieden een verschillend effect op de verspreiding kunnen hebben. De mate van stedelijkheid is gedefinieerd op basis van omgevingsadressendichtheid per vierkante kilometer (OAD/km²), wat betekent: het aantal adressen binnen een cirkel van 1 kilometer rond een adres. De gegevens zijn openbaar en opvraagbaar per gemeente (CBS Statline, 2020b). Indien de verzorgingskring van een RWZI verdeeld is over meerdere gemeenten werd voor de indeling van de RWZI naar stedelijkheid de gemeente gekozen met het grootste aandeel in de verzorgingskring.

Overige variabelen die meegenomen zijn waren de gewogen ESBL en *E. coli* vrachten en het relatieve dagdebiet. Het relatieve dagdebiet is de ratio tussen het debiet op de dag van monsternamen en de droogweerafvoer (DWA) van de RWZI en is meegenomen om te onderzoeken of de mate van neerslag van invloed is op de gewogen vrachten.

Voor het bepalen van de sterkte en richting van associatie tussen de gewogen CPE vracht en de variabelen is Spearman's rank correlatie coëfficiënt gebruikt. Dit is een niet-parametrische methode waarmee wordt vastgesteld hoe goed de relatie tussen twee variabelen kan worden beschreven met een monotone functie (dit kan zowel lineair als niet-lineair zijn). Spearman's correlatie coëfficiënt ligt tussen -1 en +1 waarbij -1 en +1 duiden op een perfecte monotone relatie (negatief resp. positief) tussen de twee variabelen en 0 correspondeert met geen relatie tussen de twee variabelen. Ter vergelijking werd de analyse ook uitgevoerd voor de gewogen ESBL-EC en *E. coli* vrachten.

De onderzochte populatiekenmerken waren ook onderling aan elkaar gecorreleerd. Met name het aantal inwoners, de mate van stedelijkheid en het percentage migranten (in het bijzonder niet-westerse migranten) was zeer sterk gecorreleerd (zie Bijlage 0). Een multivariate analyse is wel uitgevoerd, maar vanwege de hoge correlatie tussen alle parameters en vanwege het feit dat deze modellen maar een klein deel van de totale variatie verklaarden werd de uitkomst daarvan niet betrouwbaar geacht en is daarom niet weergegeven in de resultaten.

2.8 Genoom analyse

2.8.1

Herkomst isolaten

De rioolwater isolaten waren verkregen uit rioolwater als onderdeel van studies uitgevoerd in de periode van november 2015 tot en met november 2018 (Blaak et al. 2021, Blaak et al. 2019, Schmitt et al. 2018). Hele genoom sequenties werden verkregen voor 297 isolaten: 197 *E. coli* en 100 *K. pneumoniae*. De meeste van deze isolaten waren afkomstig uit influenten en effluënten van RWZI's (211 isolaten, 81 monsters, 37 RWZI's) en ziekenhuisafvalwater (85 isolaten, 20 monsters, 6 ziekenhuizen). Selectie van isolaten voor WGS was gedeeltelijk gedaan binnen het kader van de originele studies en gebaseerd op de vraagstelling daarvan en gedeeltelijk met als doel te vergelijken met humane CPE isolaten. De selectie van isolaten was daarvoor gebaseerd op een pre-screening en is daarom geen random steekproef van alle rioolwater isolaten. Hoewel een voorbeeld van isolaten die eerder in rioolwater zijn aangetroffen, is deze selectie daarom niet geheel representatief voor gemeentelijk rioolwater in het algemeen.

De humane isolaten zijn afkomstig uit het Nationale CPE Surveillance programma in Nederland (Hendrickx *et al.*, 2021). Voor de huidige vergelijking werden 437 carbapenemase-producerende *E. coli* en 632 *K. pneumoniae* isolaten afkomstig uit humaan materiaal (zoals ontlasting, urine, bloed) geïncubeerd die waren verzameld tussen 1 januari 2014 en 31 december 2019. Per persoon is alleen het tijdens deze periode eerst ingestuurde *E. coli* of *K. pneumoniae* isolaat geïncubeerd.

2.8.2

Whole genome analysis

Humane en rioolwater *E. coli* and *K. pneumoniae* isolaten werden onderzocht door middel van "next-generation sequencing" (NGS) met de Illumina HiSeq 2500 (BaseClear, Leiden, the Netherlands). De verkregen "reads" zijn geassembleerd met behulp van Unicycler v0.4.4. en wgMLST profielen geïmporteerd in BioNumerics versie 7.6.3 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium). Deze software is gebruikt om een "minimum spanning tree" (MST) te maken gebaseerd op in-house *E. coli* and *K. pneumoniae* wgMLST schema's bestaande uit 4978 genen voor *K. pneumoniae* en 4503 genen voor *E. coli*. Gebaseerd op de wgMLST analyse zijn genetische zeer nauw verwante clusters van stammen geïdentificeerd, bestaande uit isolaten met minder dan 20 allelen (in 4978 genen, voor *K. pneumoniae*) of 25 allelen (in 4503 genen, voor *E. coli*) verschil.

Voor isolaten in clusters is geografische verwantschap onderzocht door de hemelsbrede afstand te bepalen voor de vier cijfers van de postcodes

(PC4) van de RWZI's en de PC4 van de woonplaats van de patiënt en/of van het insturende Medisch Microbiologische Laboratorium (MML).

2.8.3

Ethische verklaring met betrekking tot humane isolaten

De uit mensen verkregen bacterie-isolaten zijn eigendom van de MML die deelnemen aan het Nationale CPE Surveillance Programma, en zijn verkregen als onderdeel van routinematige klinische zorg in de afgelopen jaren. Omdat geen identificeerbare persoonsgegevens zijn verzameld en data geanonimiseerd zijn geanalyseerd en verwerkt, is geschreven of gesproken toestemming niet vereist. Volgens de Wet medisch-wetenschappelijk onderzoek met mensen (WMO) is deze studie vrijgesteld van review door de medisch ethische commissie.

3 Resultaten

3.1 CPE prevalentie en verspreiding

3.1.1

Prevalentie op RWZI-niveau en gewogen vrachten

CPE werden aangetoond in het influent van 67 van de 76 onderzochte RWZI's (88%). Het meest voorkomende CPE type was *E. coli* met OXA-48-klasse carbapenemases (OXA-48-EC), welke in 66 RWZI's werd aangetroffen (87%). De overige CPE typen werden veel minder vaak aangetroffen, variërend van 3.9% voor KPC-producerende *E. coli* (KPC-EC) tot 33% voor bacteriesoorten van de "KEC" groep met OXA-48-klasse carbapenemases (OXA-48-KEC)(Tabel 3-1). In totaal werden NDM-typen CPE bij 22 (29%) van de RWZI's aangetroffen en KPC-typen CPE bij 8 (11%) van de RWZI's. Zoals eerder was aangetoond in 2016 (Blaak *et al.*, 2021) was de detectie van CPE positief gecorreleerd met de grootte van de RWZI's en de aan- of afwezigheid van ziekenhuizen in het verzorgingsgebied (Tabel 3-2). Met uitzondering van KPC-positieve CPE werden alle CPE typen zowel bij RWZI's met als zonder aangesloten ziekenhuizen gevonden.

Tabel 3-1 Aantal en percentage CPE positieve RWZI's

	CPE	OXA-48* EC	OXA-48* KEC	NDM- EC	NDM- KEC	KPC- EC	KPC- KEC
Aantal	67	66	25	19	8	3	8
Percentage [#]	88%	87%	33%	25%	11%	3,9%	11%

EC=*E. coli*, KEC=*Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp.

[#]van de 76 onderzochte RWZI's; *positief voor OXA-48 of een daaraan verwante carbapenemase zoals OXA-181.

Tabel 3-2 Aantallen en percentages CPE positieve RWZI's naar RWZI grootte en aan-afwezigheid ziekenhuis in verzorgingsgebied.

	Aantal positieve RWZI's (%)											
	<10.000 inwoners			10.000-50.000 inwoners			50.000-100.000 inwoners			>100.000 inwoners		
	ZKH- n=13	ZKH+ n=0	Tot. n=13	ZKH- n=19	ZKH+ n=5	Tot. n=24	ZKH- n=7	ZKH+ n=7	Tot. n=14	ZKH- n=3	ZKH+ n=22	Tot. n=25
CPE	7 (54)	-	7 (54)	16 (84)	5 (100)	21 (88)	7 (100)	7 (100)	14 (100)	3 (100)	22 (100)	25 (100)
OXA-48* EC	7 (54)	-	7 (54)	15 (79)	5 (100)	20 (83)	7 (100)	7 (100)	14 (100)	3 (100)	22 (100)	25 (100)
OXA-48* KEC	0 (0)	-	0 (0)	1 (5,3)	0 (0)	1 (4,2)	4 (57)	2 (29)	6 (43)	1 (33)	17 (77)	18 (72)
NDM	0 (0)	-	0 (0)	2 (11)	0 (0)	2 (8,3)	1 (14)	3 (43)	4 (29)	3 (100)	13 (59)	16 (64)
KPC	0 (0)	-	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (14)	1 (7,1)	0 (0)	7 (32)	7 (28)

De percentages zijn weergegeven voor RWZI's met (ZKH+) of zonder (ZKH-) ziekenhuis in het verzorgingsgebied, of het totaal aantal RWZI's per grootte-categorie (Tot.). *positief voor OXA-48 of een daaraan verwante carbapenemase zoals OXA-181.

Het meetkundige gemiddelde (gemiddelde van de \log_{10} -transformeerde waarden) van de influent CPE-concentraties was $1,8 \times 10^3$ kve/l (range $4,5 \times 10^1 - 1,1 \times 10^5$). Deze concentraties komen overeen met een gemiddelde gewogen vracht van $4,4 \times 10^{10}$ kve per dag per 100.000 inwoners. De CPE vracht was 100 tot 1000 keer lager dan de ESBL-EC vracht en 10.000 tot 100.000 keer lager dan de totale *E. coli* vracht (Tabel 3-3).

Tabel 3-3 Gewogen dagelijkse vrachten (vracht per dag per 100.000 inwoners)

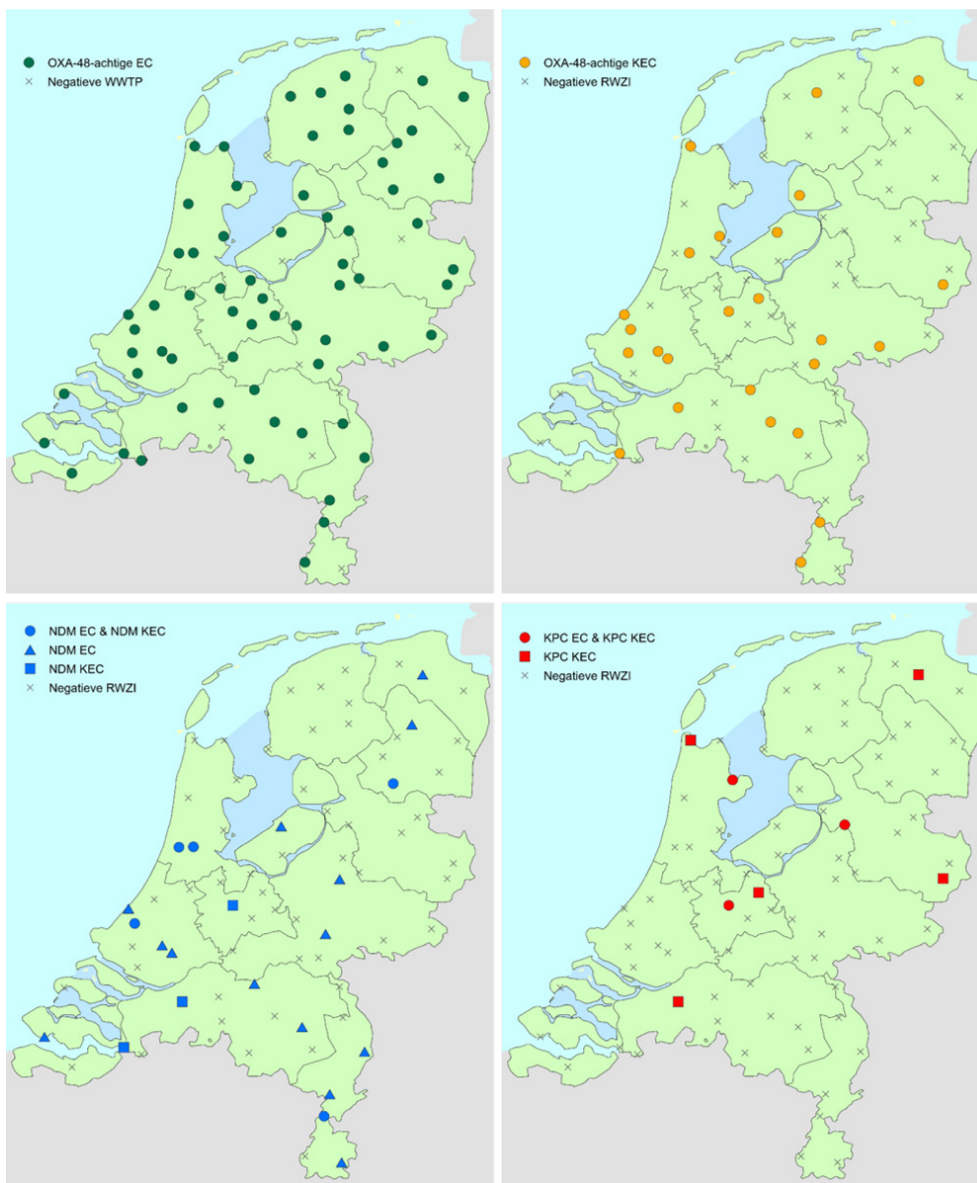
	Aantal ^a	Gemiddelde ^b	Minimum	Eerste kwartiel	Derde kwartiel	Maximum
CPE	67	$4,4 \times 10^{10}$	$8,8 \times 10^8$	$1,4 \times 10^{10}$	$2,1 \times 10^{11}$	$1,7 \times 10^{12}$
ESBL-EC	76	$2,8 \times 10^{13}$	$3,9 \times 10^{12}$	$1,9 \times 10^{13}$	$4,0 \times 10^{13}$	$1,5 \times 10^{14}$
<i>E. coli</i>	76	$3,9 \times 10^{15}$	$1,2 \times 10^{15}$	$2,7 \times 10^{15}$	$5,1 \times 10^{15}$	$3,2 \times 10^{16}$

^aAantal RWZI's waar de waarden op gebaseerd zijn, d.w.z. het aantal positieve RWZI's van de 76 onderzochte RWZI's; ^bmeetkundig gemiddelde (=gemiddelde van de \log_{10} -getransformeerde waarden).

3.1.2

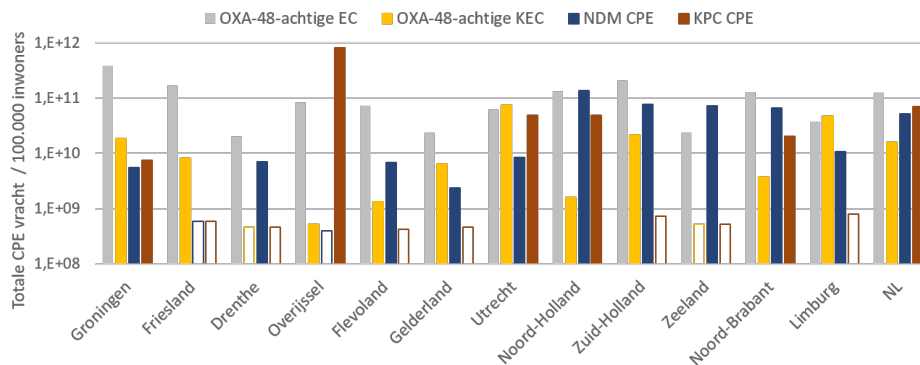
Geografische verspreiding

Het meest voorkomende CPE type, OXA-48-EC, werd verspreid over het hele land aangetroffen (Figuur 3-1). Ook OXA-48 KEC werden wijd verspreid aangetroffen, maar bij minder RWZI's per provincie. In Drenthe en Zeeland, werd dit type helemaal niet aangetroffen. NDM-positieve CPE werden in elke provincie aangetroffen met uitzondering van Friesland en Overijssel. KPC-positieve CPE werden alleen aangetroffen in Noord-Brabant, Noord-Holland, Groningen, Overijssel en Utrecht.



Figuur 3-1 Geografische verspreiding van CPE. Voor vier verschillende typen CPE: OXA-48-achtige EC (groen), OXA-48-achtige KEC (oranje), NDM CPE (blauw) en KPC CPE (rood) is de locatie van positieve RWZI's weergegeven door middel van de gekleurde symbolen. RWZI's negatief voor de betreffende CPE typen zijn weergegeven door middel van een grijs kruis.

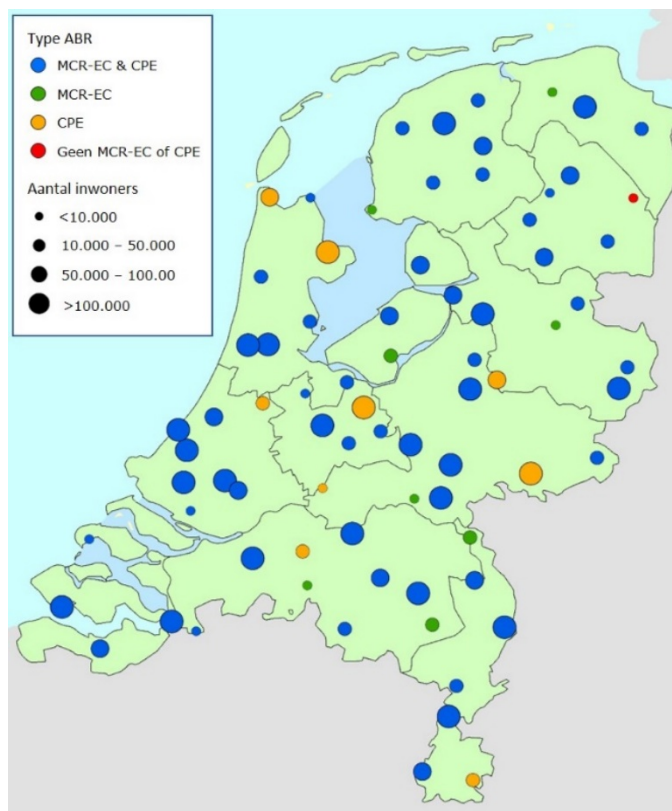
Berekening van de totale gewogen vracht op landelijk niveau en per provincie laat zien dat hoewel OXA-48 EC het meest voorkomende CPE type was op landelijk niveau en in de meeste provincies, er ook provincies waren waar andere CPE in dezelfde, of soms hogere mate voorkwamen (Figuur 3-2).



Figuur 3-2 De totale CPE vracht per 100.000 inwoners op provincie- en landniveau. Weergegeven is de som van de vrachten van alle 76 RWZI's (NL) of van alle RWZI's gelegen in een provincie, omgerekend naar 100.000 inwoners. Ongekleurde bars representeren de detectielimiet en zijn weergegeven wanneer een CPE type bij geen van de RWZI's was aangetroffen.

3.2 Prevalentie en verspreiding van MCR-EC

MCR-positieve *E. coli* werden bij 66 van de 76 RWZI's (87%) aangetroffen verspreid door het hele land (Figuur 3-3). Bij 58 van deze RWZI's werden ook CPE aangetroffen. Opvallend detail was dat de acht MCR-EC-positieve RWZI's waar géén CPE werden aangetroffen alle acht relatief kleine RWZI's waren. Daarentegen waren de RWZI's waarin



Figuur 3-3 Verspreiding van MCR-EC en CPE naar grootte van RWZI's. Voor de hoofdstad RWZI's die meerdere keren zijn bemeaten is alleen het resultaat van de eerste meting meegenomen voor deze cross-sectionele analyse.

geen MCR-EC, maar wel CPE aangetroffen in vijf van de negen gevallen relatief groot. In tegenstelling tot CPE was er geen associatie tussen het percentage MCR-EC positieve RWZI's en de grootte van de RWZI's (Tabel 3-4). Er was slechts één RWZI waar geen van beide typen antibioticaresistente bacteriën werden gevonden. Van alle 296 colistine-resistente isolaten die in het cross-sectionele deel van de studie waren verkregen, was 69% *mcr* positief. Alle *mcr*-positieve *E. coli* isolaten hadden het *mcr-1* gen.

Tabel 3-4 Aantal en percentages MCR-EC-positieve RWZI's naar aantal inwoners en aan-/afwezigheid ziekenhuis in verzorgingsgebied vergeleken met CPE en CPE+.

	Aantal positieve RWZI's (%)											
	<10.000 inwoners			10.000-50.000 inwoners			50.000-100.000 inwoners			>100.000 inwoners		
	ZKH- n=13	ZKH+ n=0	Tot. n=13	ZKH- n=19	ZKH+ n=5	Tot. n=24	ZKH- n=7	ZKH+ n=7	Tot. n=14	ZKH- n=3	ZKH+ n=22	Tot. n=25
CPE	7 (54)	-	7 (54)	16 (84)	5 (100)	21 (88)	7 (100)	7 (100)	14 (100)	3 (100)	22 (100)	25 (100)
CPE+	0 (0)	-	0 (0)	3 (16)	0 (0)	3 (13)	4 (57)	4 (57)	8 (57)	3 (100)	21 (95)	24 (96)
MCR-EC	11 (85)	-	11 (85)	16 (84)	5 (100)	21 (88)	7 (100)	5 (71)	12 (86)	3 (100)	19 (86)	22 (88)

De percentages zijn weergegeven voor RWZI's met (ZKH+) of zonder (ZKH-) ziekenhuis in het verzorgingsgebied, of het totaal aantal RWZI's per grootte-categorie (Tot.). CPE+ = alle CPE types behalve OXA-48 EC gezamenlijk.

3.3 Populatiekenmerken geassocieerd met het vóórkomen van CPE

De gewogen CPE vrachten bij CPE-positieve RWZI's waren gecorreleerd met alle zes populatiekenmerken die onderzocht zijn: het aantal inwoners en de mate van stedelijkheid van het gebied, de aan- of afwezigheid van ziekenhuizen in de zuiveringskring, het percentage mensen met een migratieachtergrond, het percentage mensen met een westerse en het percentage mensen met een niet-westerse migratieachtergrond (Tabel 3-5). De associaties waren zwak tot matig (Spearman's rho < 0,500), met de hoogste associatie met de fractie personen met een niet-westerse migratieachtergrond, en de zwakste met de aan- of afwezigheid van een ziekenhuis. Er bestond geen associatie tussen de populatiekenmerken en de gewogen ESBL-EC en *E. coli* vrachten, met uitzondering van een zwakke associatie tussen de gewogen ESBL-EC vracht en de aan- of afwezigheid van een ziekenhuis. Verder waren ESBL-EC en *E. coli* vrachten geassocieerd met elkaar en toonden ze een zwakke correlatie met het relatieve dagdebiet (d.w.z. hogere vrachten bij meer neerslag). Associaties met MRC-EC kon nog niet worden onderzocht omdat er nog geen kwantitatieve data beschikbaar zijn.

De sterke associatie tussen de onderzochte populatiekenmerken onderling (Bijlage 8.4) maakt het moeilijk om vast te stellen welke factor(en) werkelijk de aanwezigheid van CPE in een gebied beïnvloed(t)(en).

Tabel 3-5 Associaties tussen gewogen CPE vracht en populatiekenmerken in CPE-positieve RWZI's (n=67)

Populatiekenmerk	Correlatiecoëfficiënt		
	CPE	ESBL-EC	<i>E. coli</i>
Omgevingsadressendichtheid (OAD/km ²)	0,499***	0,142	-0,116
Aantal inwoners	0,443***	0,178	-0,058
Fractie met migratieachtergrond	0,432***	0,229	0,057
Fractie westers migratieachtergrond	0,340**	0,200	0,090
Fractie niet-westers migratieachtergrond	0,503***	0,203	-0,059
Aan-/afwezigheid ziekenhuis	0,361**	0,256*	-0,037
Gewogen ESBL vracht	0,202	-	0,521***
Gewogen <i>E. coli</i> vracht	0,022	0,521***	-
Gewogen CPE vracht	-	0,202	0,022
Relatieve dagdebiet ¹	-0,098	0,353**	0,390***

Weergegeven zijn Spearman's rho correlatiecoëfficiënten, met asteriks zijn statistisch significante associaties aangegeven (*=0,01-0,05, **=0,001-0,01, ***<0,001). ¹Het dagdebiet op het moment van monsternamen ten opzichte van de droogweerafvoer (als maat voor neerslag: een hogere waarde bij meer neerslag).

3.4 Trendanalyse: CPE in 2020 versus 2016

3.4.1 Gemiddelde vrachten

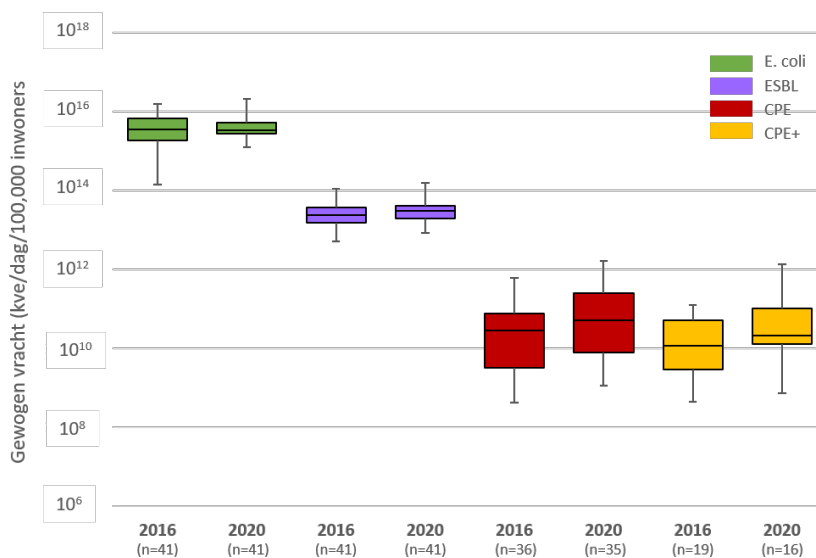
Eénenvertig van de in 2020 onderzochte RWZI's zijn ook in 2016 onderzocht. Een vergelijking van deze 41 RWZI's laat zien dat de aantallen CPE-positieve RWZI's nagenoeg hetzelfde was, namelijk 35 in 2020 vergeleken met 36 in 2016 (Tabel 3-6). Voor het meest frequent voorkomende CPE type, OXA-48 EC was het aantal positieve RWZI's zelfs identiek. Voor de andere typen waren er kleine verschillen: OXA-48 KEC werden bij iets meer RWZI's aangetroffen in 2016, terwijl NDM en KPC-CPE juist in 2020 bij meer RWZI's werden gevonden. Deze verschillen waren echter statistisch niet significant (McNemar test). De meeste RWZI's waren in beide jaren positief of in beide jaren negatief, maar zeven RWZI's hadden in beide jaren een andere uitslag (zie bijlage 8.4). Een verschillende uitslag kwam vooral voor bij de kleinste RWZI's (vijf van de zeven waren RWZI's met minder dan 10,000 inwoners).

Tabel 3-6 Aantallen en percentage positieve RWZI's

	Aantal positieve RWZI's (%)	
	2016	2020
CPE	36 (88)	35 (85)
CPE+	20 (49)	16 (39)
OXA-48* EC	35 (85)	35 (85)
OXA-48* KEC	17 (41)	13 (32)
NDM CPE	7 (17)	11 (27)
KPC CPE	3 (7,3)	5 (12)

Met OXA-48-achtige allelen, waaronder OXA-48 en OXA-181; CPE+ = alle CPE-typen met uitzondering van OXA-48 EC.

Het meetkundige gemiddelde van de gewogen CPE vracht was in 2020 iets hoger dan in 2016 (Figuur 3-4). Dit was het geval voor alle CPE gezamenlijk ($4,6 \times 10^{10}$ vs. $1,9 \times 10^{10}$, factor 2,5) als ook voor de zeldzamere vormen van CPE, dat wil zeggen alle typen met uitzondering van OXA-48-achtige *E. coli* (aangeduid met "CPE+"; $2,7 \times 10^{10}$ vs. $0,93 \times 10^{10}$, factor 3). Voor totale *E. coli* en ESBL-EC waren de gemiddelde vrachten in 2020 en 2016 bijna gelijk (*E. coli*: $3,8 \times 10^{15}$ vs. $3,2 \times 10^{15}$, factor 1,2; ESBL-EC: $3,0 \times 10^{13}$ vs. $2,3 \times 10^{13}$, factor 1,3). In een gepaarde analyse (gepaarde t-test) waren de verschillen in CPE en CPE+ vrachten echter niet statistisch significant. Vanwege de lage aantallen RWZI's met NDM of KPC CPE is de analyse niet uitgevoerd voor alle CPE-subtypen afzonderlijk.



Figuur 3-4 Boxplots van de \log_{10} gewogen bacterievrachten in de 41 RWZI's die zijn onderzocht in 2016 en 2020. De boxen geven de mediaan (horizontale streep) en het eerste en derde kwartiel weer, de error bars geven de minimale en maximale waarde weer. Op de X-as zijn de aantallen RWZI's weergegeven waar de waarden op gebaseerd zijn: omdat \log_{10} -getransformeerde waarden zijn gebruikt zijn RWZI's waar CPE niet zijn gedetecteerd uitgesloten van de analyse.

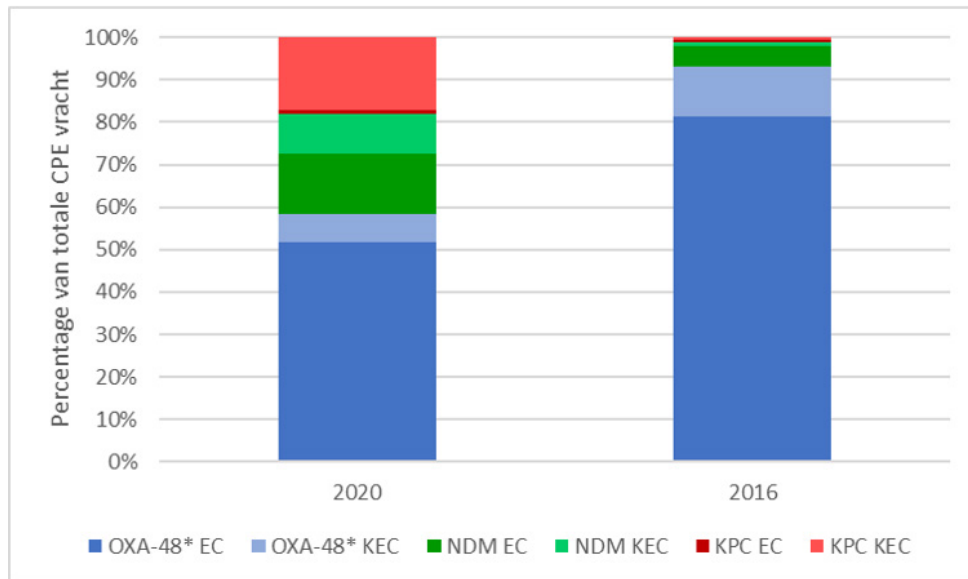
3.4.2 Totale vrachten

Hoewel de gewogen CPE load in 2020 *gemiddeld* maar twee en een half keer (en statistisch niet significant) hoger was dan in 2016, waren er wel duidelijke verschillen tussen beide jaren voor wat betreft de *totale vrachten* (d.w.z. de som van de vrachten van alle onderzochte RWZI's) van NDM en KPC-type CPE (Tabel 3-7). Ook de relatieve bijdrage van deze typen aan de totale CPE vracht was hoger dan in 2016 (Figuur 3-5). In 2016 werd 83% van de totale CPE vracht verklaard door OXA-48 EC. De totale gezamenlijke vracht van NDM- en KPC-typen CPE was slechts 7% van het totaal. In 2020 was het aandeel van OXA-48 EC aan de totale CPE vracht nog 52% en was het aandeel van NDM- en KPC-typen 41%. Het aandeel van OXA-48-KEC (wat voor 99,5% uit *K. pneumoniae* bestaat) was juist lager dan in van 2016 (Figuur 3-5). Waar de totale vracht OXA-48-achtige EC en KEC min of meer gelijk waren (net zoals ESBL-EC en totale *E. coli* vrachten) waren de totale NDM en KPC CPE vrachten respectievelijk ongeveer $1\log_{10}$ en $2\log_{10}$ units hoger dan in 2016 (Tabel 3-7).

Tabel 3-7 Totale vrachten van CPE en CPE subtypen in 41 RWZI's

	Scenario 1 ¹			Scenario 2 ¹		
	2016	2020	Ratio	2016	2020	Ratio
NDM CPE	$3,2 \times 10^{11}$	$3,0 \times 10^{12}$	9,6	$3,3 \times 10^{11}$	$3,0 \times 10^{12}$	9,3
KPC CPE	$1,5 \times 10^{10}$	$2,3 \times 10^{12}$	150	$4,1 \times 10^{10}$	$2,3 \times 10^{12}$	56
OXA-48* KEC	$7,5 \times 10^{11}$	$8,5 \times 10^{11}$	1,1	$7,5 \times 10^{11}$	$8,6 \times 10^{11}$	1,1
OXA-48* EC	$5,1 \times 10^{12}$	$6,7 \times 10^{12}$	1,3	$5,1 \times 10^{12}$	$6,7 \times 10^{12}$	1,3
CPE	$6,2 \times 10^{12}$	$1,3 \times 10^{13}$	2,1	$6,2 \times 10^{12}$	$1,3 \times 10^{13}$	2,1
CPE+	$1,1 \times 10^{12}$	$6,2 \times 10^{12}$	5,7	$1,1 \times 10^{12}$	$6,2 \times 10^{12}$	5,7
ESBL-EC	$1,3 \times 10^{15}$	$1,5 \times 10^{15}$	1,2	$1,3 \times 10^{15}$	$1,5 \times 10^{15}$	1,2
<i>E. coli</i>	$1,6 \times 10^{17}$	$1,7 \times 10^{17}$	1,0	$1,6 \times 10^{17}$	$1,7 \times 10^{17}$	1,0

¹Voor RWZI's waar geen CPE werden aangetroffen werd aangenomen dat: voor scenario 1: er geen CPE in het rioolwater zitten (de CPE vracht is gelijk aan nul) en voor scenario 2: de CPE vracht gelijk is aan de detectielimiet van de methode.*Met OXA-48-achtige allelen.



Figuur 3-5 Relatieve CPE vrachten per CPE type. Weergegeven is het aandeel van elk van de zes typen CPE aan de totale CPE vracht van de 41 in beide jaren onderzochte RWZI's uitgedrukt in percentages. De percentages zijn gebaseerd op de aanname dat de vrachten in negatieve RWZI's gelijk waren aan de detectielimiet.

De totale CPE- en "CPE+" vracht was bij dezelfde 41 RWZI's in 2020 respectievelijk twee en bijna zes keer hoger dan dat in 2016 (Tabel 3-7). Aannemende dat het aantal inwoners in de verzorgingskringen vergelijkbaar is gebleven, suggereert deze bevinding dat er in 2020 meer CPE en "CPE+" dragers waren dan in 2016. Een puntschatting gebaseerd op de ESBL- en CPE vracht bij 100 RWZI's en de ESBL-dragerschap onder de Nederlands bevolking in 2014-2016 gaf aan dat het aantal CPE dragers onder de Nederlandse bevolking in 2016 in de orde van grootte was van 0,02% (Blaak *et al.*, 2021). Ook gebaseerd op de 41 RWZI's die in beide jaren zijn onderzocht komt die schatting op 0,02% uit, en 0,004% voor "CPE+" dragers. Aannemende dat de uitscheiding per drager hetzelfde is gebleven, komen de vrachten die in 2020 gemeten zijn overeen met ongeveer 0,05% en 0,02% dragers voor respectievelijk CPE en "CPE+". Nadere analyses worden nog gedaan om de foutmarge van deze schattingen te bepalen.

3.5 Trendanalyse: longitudinale metingen in provinciehoofdsteden

Bij elke provinciehoofdstad RWZI en op elk meetpunt werden CPE aangetroffen. CPE typen anders dan OXA-48-EC, dat wil zeggen OXA-48 KEC, NDM- of KPC-type CPE werden echter niet altijd gevonden. Deze drie typen werden het minst frequent aangetroffen bij AWZI Haarlem-Waarderpolder, RWZI Walcheren en RWZI Bosscherveld (Maastricht) (Figuur 3-6). Daarnaast werden NDM- en/of KPC-typen CPE ook slechts infrequent aangetoond bij RWZI's Leeuwarden en Arnhem. OXA-48 KEC werden bij zes van de RWZI's/AWZI's op alle of bijna alle meetpunten gevonden (Figuur 3-6). NDM-type CPE werden bij zeven van de RWZI's/AWZI's bij minstens de helft van de meetpunten gevonden. Bij de overige vijf RWZI's werden dit type CPE ook aangetroffen, maar minder frequent. KPC-type CPE werden in zes van de RWZI's op

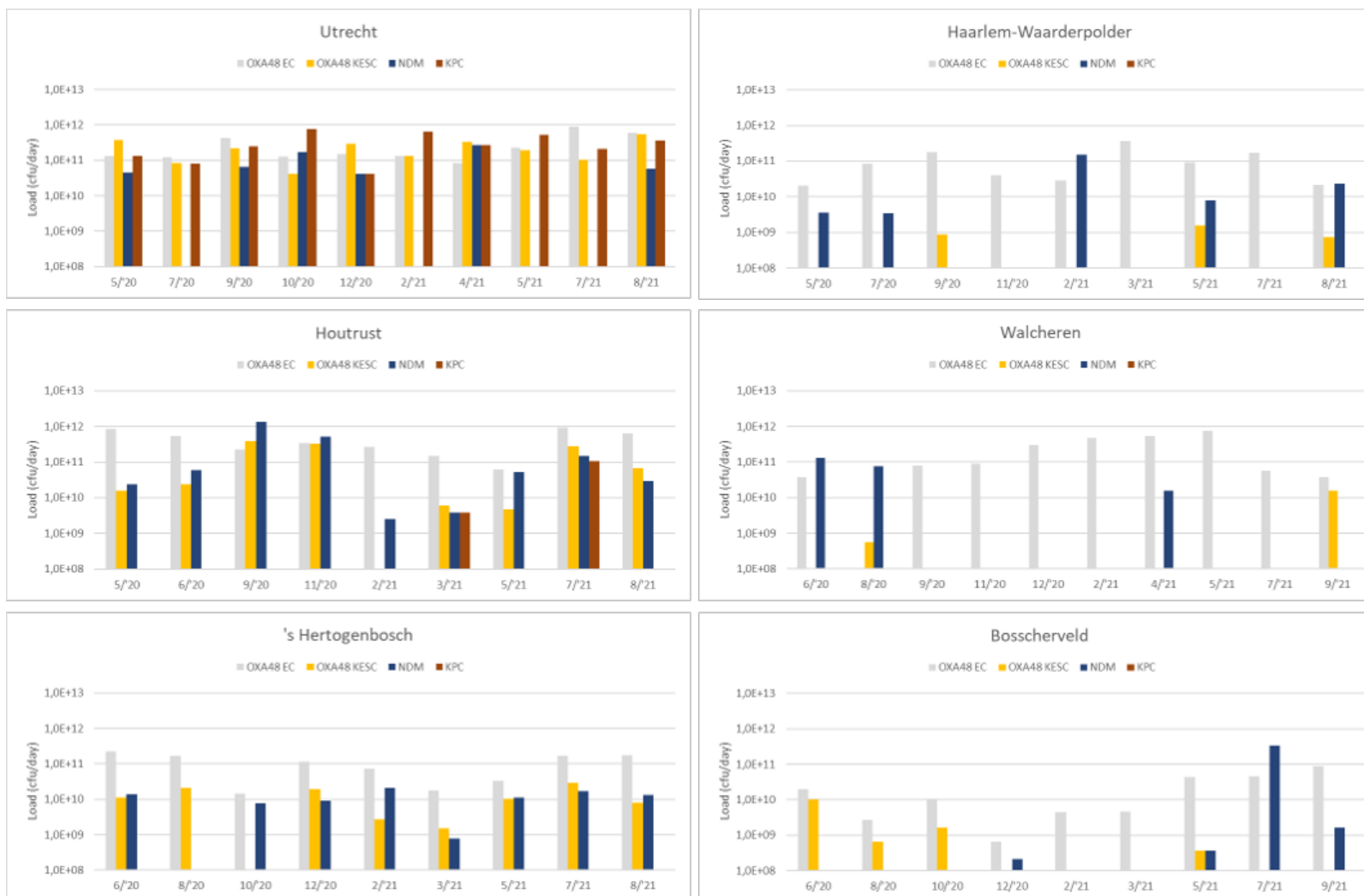
minstens één van de tijdstippen gevonden; bij twee RWZI kwam dit type op alle meetpunten voor (RWZI's Zwolle en Utrecht).

Samengevat was er tussen locaties variatie wat betreft de detectie van verschillende CPE typen alsook de hoogte van de vrachten. Daarnaast is er ook variatie over de tijd binnen locaties. Bij de ene locatie lijken sommige CPE typen continu aanwezig te zijn, terwijl op andere locaties de zeldzamere typen CPE slechts af en toe aantoonbaar zijn. Hoewel er op sommige locaties een kleine "dip" in de CPE vracht lijkt geweest te zijn tussen september en december 2020 (Garmerwolde, Arnhem, Bosscherveld) of tussen februari en mei 2021 (Zwolle, Leeuwarden, Houtrust), is er op individueel RWZI niveau geen duidelijk effect te zien van de COVID-19 lockdowns. Dit is ook zo wanneer de resultaten voor alle RWZI's gezamenlijk worden weergegeven (Figuur 3-7).

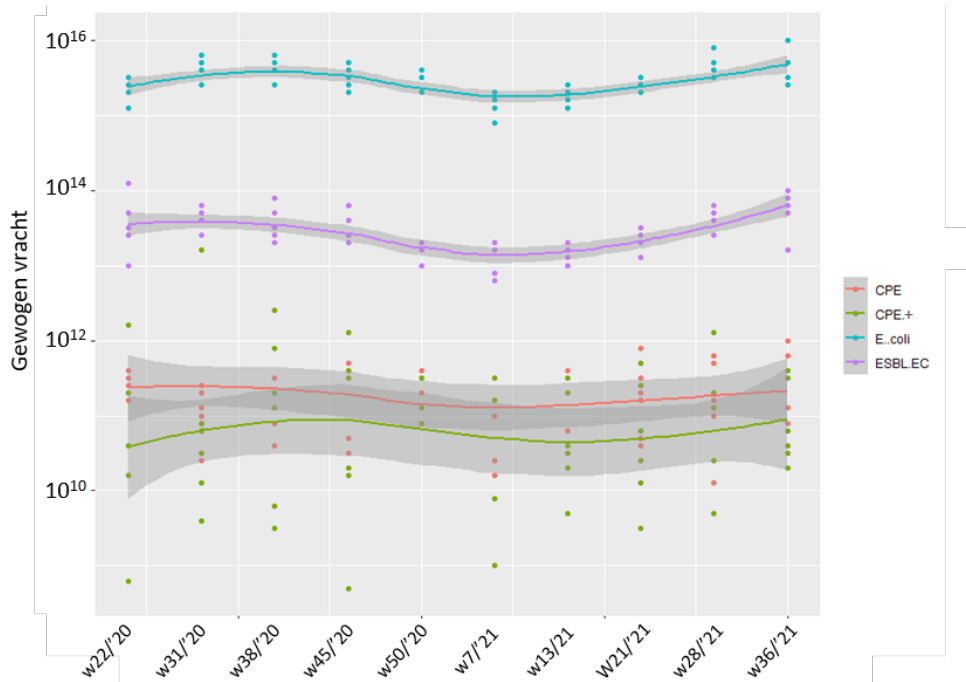
Naast CPE werden bij elke provinciehoofdstad RWZI ook minstens één keer MCR-EC aangetroffen (Figuur 3-8). Op de meeste locaties was dat op meer dan de helft van de meetmomenten, één enkele uitzondering daarop vormde RWZI Lelystad. Daar was slechts 27% van de monsters positief voor MCR-EC. Bij vijf RWZI's werden MCR-EC op elk meetmoment aangetroffen. Opvallend was dat bij drie van deze RWZI's (Haarlem-Waarderpolder, Walcheren, Bosscherveld) de zeldzame CPE-typen OXA-48 KEC, NDM- en KPC-CPE nauwelijks werden aangetroffen. Van alle longitudinaal verworven MCR-EC isolaten (350 in totaal) had 99,4% het *mcr-1* gen en twee isolaten (0,6%) het *mcr-3* gen. Isolaten met het *mcr-3* gen werden op twee momenten gevonden en bij dezelfde RWZI: in augustus 2020 (meetronde 1) en augustus 2021 (meetronde 10) bij RWZI 's Hertogenbosch. Op die meetmomenten waren daar ook isolaten met *mcr-1* aanwezig in het rioolwater. Net zoals voor CPE was er geen effect waarneembaar van COVID-19 maatregelen.



Figuur 3-6.1 Longitudinale analyse van CPE bij provinciehoofdstad RWZI's. Weergegeven is de vracht per dag op negen of tien meetdagen tussen mei 2020 en september 2021. Op de x-as staan de maand en het jaar van de monstername dag weergegeven. De OXA-48 EC en OXA-48 KEC geven de resultaten weer voor alle OXA-48-achtige allelen gezamenlijk. Zie voor de bijbehorende provincies bijlage 8.2.



Figuur 3 6.2 Longitudinale analyse van CPE bij provinciehoofdstad RWZI's. Weergegeven is de vracht per dag op negen of tien meetdagen tussen mei 2020 en september 2021. Op de x-as staan de maand en het jaar van de monstername dag weergegeven. De OXA-48 EC en OXA-48 KEC geven de resultaten weer voor alle OXA-48-achtige allelen gezamenlijk. Zie voor de bijbehorende provincies bijlage 8.2.



Figuur 3-7 Bacterievrachten per 100.000 inwoners. Weergegeven is per meetronde de gewogen vrachten van de positieve RWZI's, het meetkundige gemiddelde (lijnen) en de standaarderror (grijze vlak). Op de x-as staan de mediane weeknummers waarin de monsterrondes plaats vonden (de 12 RWZI's werden iedere ronde verspreid over een aantal weken bemonsterd) en het jaartal. In week w50/'20 zijn slechts 7 van de 12 RWZI's geanalyseerd.

Week*/jaar	Garmerwolde	Leeuwarden	Assen	Zwolle	Lelystad	Arnhem	Utrecht	Haarlem-Waarderp	Houtrust	Walcheren	's Hertogenbosch	Bossherveld
w22/'20	Positief	Positief	Negatief	Positief	Negatief	Positief	Negatief	Positief	Negatief	Positief	Positief	Positief
w31/'20	Positief	Positief	Negatief	Positief	Negatief	Positief	Negatief	Positief	Negatief	Positief	Positief	Positief
w38/'20	Positief	Positief	Negatief	Positief	Negatief	Positief	Negatief	Positief	Negatief	Positief	Positief	Positief
w45/'20	Positief	Positief	Negatief	Positief	Negatief	Positief	Negatief	Positief	Negatief	Positief	Positief	Positief
w50/'20	Positief	Positief	Donkergrijs	Positief	Negatief	Positief	Negatief	Positief	Donkergrijs	Positief	Positief	Donkergrijs
w7/'21	Positief	Positief	Negatief	Positief	Negatief	Positief	Negatief	Positief	Negatief	Positief	Positief	Positief
w13/'21	Positief	Positief	Negatief	Positief	Negatief	Positief	Negatief	Positief	Negatief	Positief	Positief	Positief
w21/'21	Positief	Positief	Negatief	Positief	Negatief	Positief	Negatief	Positief	Negatief	Positief	Positief	Positief
w28/'21	Negatief	Positief	Negatief	Positief	Negatief	Positief	Negatief	Positief	Negatief	Positief	Positief	Positief
w36/'21	Negatief	Positief	Negatief	Positief	Negatief	Positief	Negatief	Positief	Negatief	Positief	Positief	Positief
w43/'21	Positief	Positief	Negatief	Positief	Negatief	Positief	Negatief	Positief	Negatief	Positief	Positief	Positief

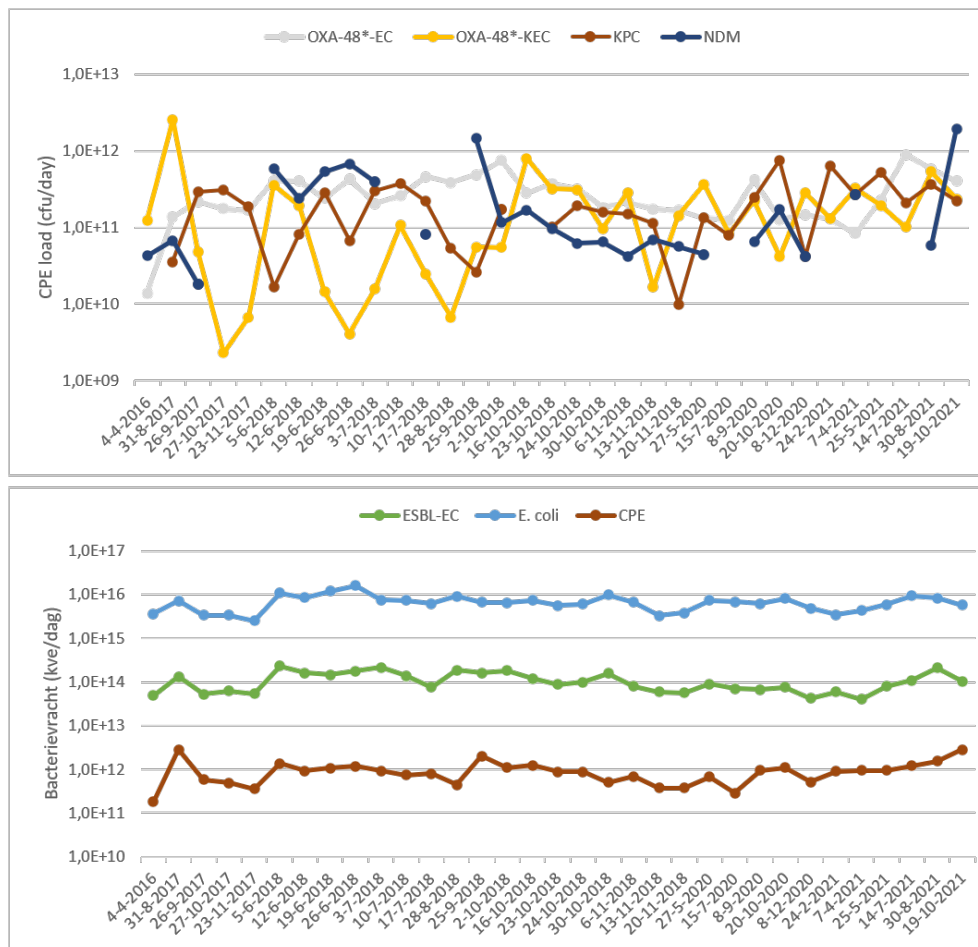
Figuur 3-8 Longitudinale analyse van MCR-EC bij provinciehoofdstad RWZI's. Donkerblauw geeft aan dat MCR-EC zijn aangetroffen, lichtblauw dat deze niet werden aangetroffen; donkergrijs = niet getest. *De weeknummers geven de mediaan aan van de weeknummers waarin de monsterronde plaats vond (de 12 RWZI's werden iedere ronde verspreid over een aantal weken bemonsterd).

3.5.1

RWZI Utrecht voor en tijdens COVID-19 pandemie

Het influent van RWZI Utrecht is in de periode tussen 2016 en 2021 tijdens meerdere projecten herhaaldelijk bemonsterd en geanalyseerd op de aanwezigheid van CPE. Dit maakt voor deze RWZI een

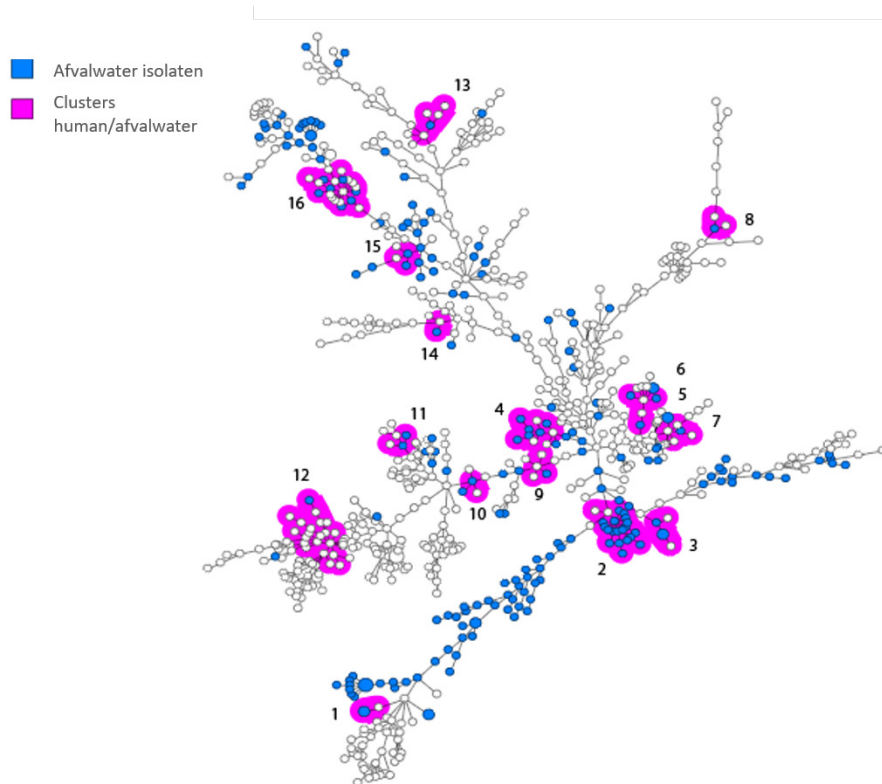
vergelijking mogelijk van de situatie vóór en tijdens de COVID-19 pandemie. Hieruit blijkt dat de niveaus die in de surveillance van 2020-2021 gemeten zijn (gestart op 27 mei 2020), zeer vergelijkbaar zijn met het niveau wat einde 2018 gemeten is (Figuur 3-9a). Dit bevestigt dat er geen negatief effect is geweest van de COVID-19 pandemie op de CPE vrachten in deze stad. Dit geldt ook voor ESBL-EC en *E. coli* vrachten (Figuur 3-9b).



Figuur 3-9 Analyse van RWZI Utrecht tussen april 2016 en november 2021. Weergegeven zijn de vrachten van vier verschillende CPE subtypen (boven) en de totale CPE vrachten vergeleken met dat van ESBL-EC en *E. coli* (onder).

3.6 Moleculaire epidemiologie van CPE: hele genoom analyse van isolaten uit rioolwater en mensen

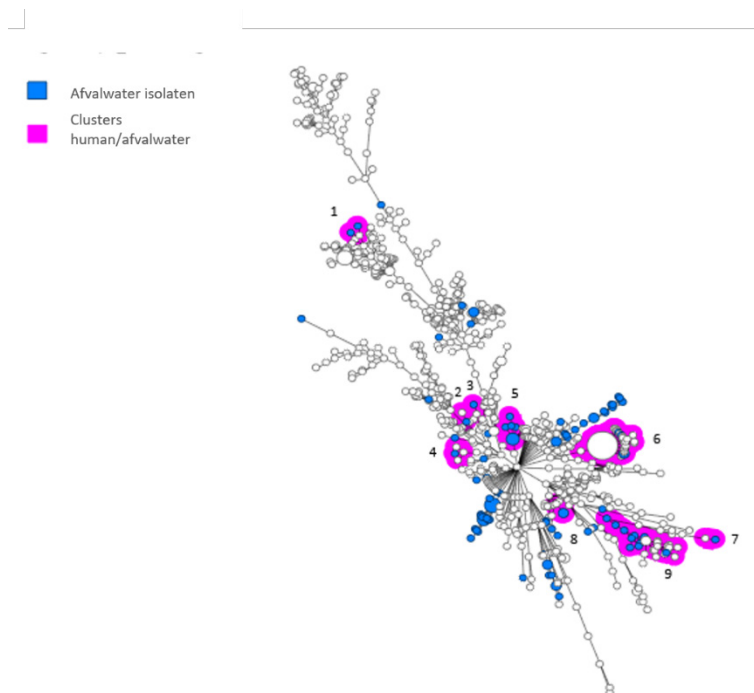
Om een indruk te krijgen van de overeenkomsten tussen CPE die in rioolwater worden gevonden en stammen die uit patiënten afkomstig zijn, zijn de hele genomen van *E. coli* en *K. pneumoniae* isolaten uit rioolwater en patiënten met elkaar vergeleken. Deze analyse is in eerste instantie uitgevoerd met rioolwaterisolaten die zijn geïsoleerd tijdens de nulmetingen van 2016 en onderzoeksprojecten die zijn uitgevoerd in 2017 en 2018 (Blaak *et al.*, 2021; Blaak *et al.*, 2019; Schmitt *et al.*, 2018; Schmitt *et al.*, 2017). Op het moment van schrijven van dit rapport zijn de isolaten uit 2020 en 2021 nog niet op deze manier geanalyseerd.



Figuur 3-10 Een 'minimum spanning tree' gebaseerd op wgMLST van *E. coli* isolaten uit afvalwater en mensen. In blauw zijn de afvalwater isolaten weergegeven, in wit de humane isolaten. Genetische clusters zijn met roze omkadering weergegeven.

Figuur 3-10 en Figuur 3-11 geven de verwantschap weer tussen de *E. coli* en *K. pneumoniae* uit afvalwater en de patiënten door middel van een zogenaamde "minimum spanning tree". Elke cirkel in deze "boom" is een genetische variant, hoe dichter 2 cirkels bij elkaar liggen hoe meer de varianten op elkaar lijken. Er waren in totaal 25 clusters van genetisch zeer verwante bacteriestammen waarin zowel rioolwater- en humane isolaten vertegenwoordigd waren: 16 voor *E. coli* en 9 voor *K. pneumoniae* (Figuur 3-10 en Figuur 3-11). Onder de 16 *E. coli* clusters waren er vijf (31%) waarin (enkele van de) rioolwater en humane isolaten ook geografisch gezien bij elkaar clusterden (<25 km afstand). Onder de 9 *K. pneumoniae* clusters waren dat er 6 (67%). In een enkel

geval viel de woonplaats van de patiënt en/of van het insturende laboratorium zelfs binnen het verzorgingsgebied van de RWZI waar het verwante rioolwater isolaat was geïsoleerd (Tabel 3-8). In deze gevallen varieerde de tijd tussen detectie in het rioolwater en in mensen tussen de 2 en 24 maanden. In drie van de vier gevallen werd de variant eerder in het rioolwater aangetroffen dan in de mens. In de meeste gevallen waren de rioolwater- en humane isolaten in een cluster echter niet aan elkaar gerelateerd in tijd en ruimte (d.w.z. de stammen waren op een andere plek en/of datum aangetroffen in water aangetroffen dan bij mensen).



Figuur 3-11 Een 'minimum spanning tree' gebaseerd op wgMLST van *K. pneumoniae* isolaten uit rioolwater en mensen. In blauw zijn de rioolwaterisolaten weergegeven, in wit de humane isolaten. Genetische clusters zijn met roze omkadering weergegeven.

Tabel 3-8 Genetische clusters met geografische match

Species	Cluster	CP/ST	RWZI ^a	Datum isolatie rioolwater	Datum isolatie humaan
<i>E. coli</i>	4	NDM-5/ST167	Amsterdam-West	20-6-16	27-7-17 & 3-12-17
<i>E. coli</i>	12	OXA-48/ST38	UMCG ^{ab}	12-9-17	22-1-2018
<i>K. pneumoniae</i>	2	NDM-1/ST1	Nijmegen	10-10-17	11-10-19
<i>K. pneumoniae</i>	8	NDM-5/ST16	Garmerwolde ^a	12-9-17	7-7-17

^aRWZI Garmerwolde zuivert het rioolwater afkomstig uit de stad Groningen waaronder het rioolwater van het Universitair Medisch Centrum Groningen (UMCG); ^bDit isolaat is aangetroffen in het rioolwater van het UMCG; OXA-48-positieve isolaten zijn wel aangetroffen in het rioolwater van RWZI Garmerwolde, maar deze zijn niet getypeerd met behulp van WGS.

4 Discussie

CPE prevalentie in 2020

Met behulp van rioolwatersurveillance is de verspreiding van CPE en MCR-EC in 2020 onderzocht. CPE was aantoonbaar in het onbehandelde rioolwater van 88% van 76 representatieve RWZI's. Dit percentage is heel vergelijkbaar met wat in 2016 werd gevonden (Blaak *et al.*, 2021). Wel was de CPE vracht in 2020 gemiddeld 2,5 keer zo hoog als in 2016, terwijl de vrachten van *E. coli* nagenoeg identiek waren gebleven. Deze toename in de CPE vracht was echter niet statistisch significant. Ook was er een verandering in de verdeling van de verschillende CPE typen: de relatieve bijdrage van NDM en KPC-type CPE aan de totale CPE vracht (d.w.z., de som van alle vrachten) was toegenomen van 7% in 2016 naar 41% in 2020. Een toename van juist deze typen CPE is mogelijk zorgwekkend, omdat deze typen, meer dan OXA-48-positieve CPE varianten, in het algemeen een hoge mate van resistentie hebben tegen carbapenems (Nethmap, 2021; van der Zwaluw *et al.*, 2020). Vanwege het lage aantal RWZI's waar NDM en KPC werden aangetroffen kan het echter niet uitgesloten worden dat het verschil tussen beide jaren (mede) door toeval wordt verklaard.

Om de trends te kunnen blijven volgen en de huidige bevindingen al dan niet te bevestigen is het belangrijk om: a) de metingen bij provinciehoofdsteden door te laten lopen en b) de metingen bij alle 76 RWZI's over enkele jaren te herhalen. Voor een betere statistische onderbouwing zal bij een volgende reeks metingen de huidige data gebruikt worden voor een statistische poweranalyse, waarmee van te voren bepaald kan worden hoeveel monsters onderzocht moeten worden om een geringe toename, zoals de huidige factor 2,5, statistisch te kunnen onderbouwen. Mogelijk moet elke locatie daarvoor vaker dan eens bemonsterd worden.

CPE prevalentie tijdens de SARS-CoV-2 epidemie

De meetcampagne is half mei 2020 gestart, ongeveer 2 maanden na de start van de eerste (intelligente) lockdown in reactie op de SARS-CoV-2 pandemie in Nederland. Naar verwachting hebben de COVID-19 maatregelen niet alleen een remmend effect op de verspreiding van respiratoire pathogenen, maar ook op de verspreiding van fecale pathogenen die voornamelijk via hand-mond contact worden overgedragen. Denk bijvoorbeeld aan verbeterde handhygiëne, maar ook het zeer beperkte bezoek aan publieke ruimtes zoals horeca en kantoor (en dus ook geen toiletbezoek in publieke ruimtes) en het niet meer schudden van handen. Omdat reizen een grote risicofactor is voor het oplopen van CPE (Nethmap, 2021; Reuland *et al.*, 2016a; Reuland *et al.*, 2016b; van Hattem *et al.*, 2016) zou ook het sterk verminderde aantal reizen – er gold gedurende het grootste deel van het jaar een advies om niet onnodig te reizen en grote delen van de wereld waren niet of nauwelijks toegankelijk – naar verwachting een remmend effect hebben op de prevalentie van CPE in Nederland. Het leek daarom te verwachten dat *social distancing*, verbeterde handhygiëne en een beperkte nieuwe aanvoer van CPE dragers via buitenlandse reizen zou leiden tot een afname in het aantal dragers, en daarmee de CPE

vrachten in het rioolwater. Ten opzichte van de situatie van vier jaar geleden was dit echter niet het geval. Een mogelijke verklaring kan liggen in het feit dat mensen CPE wel een jaar bij zich zouden kunnen dragen, zoals eerder is beschreven voor ESBL (Teunis *et al.*, 2018). Langdurig dragerschap zou een vertraging kunnen veroorzaken in het zichtbaar worden van een effect van de maatregelen, waardoor een dergelijk effect mogelijk (nog) niet waarneembaar was tijdens de meetperiode. Maar ook bij de provinciehoofdstad RWZI's, waar herhaaldelijk is gemeten tot en met 20 á 21 maanden in de pandemie, was geen duidelijk effect waarneembaar. Vanwege de mogelijke (deels tegenstrijdige) effecten van enerzijds langdurig dragerschap en anderzijds de elkaar afwisselende perioden van diverse maatregelpakketten en de steeds verder afnemende bereidheid van mensen om de maatregelen na te leven, is het echter lastig om gebaseerd op de huidige gegevens conclusies te trekken over het effect van de COVID-19 maatregelen op de verspreiding van CPE. Dit wordt nog verder bemoeilijkt door het feit dat er geen meetgegevens zijn van vlak vóór de pandemie. Op één locatie (RWZI Utrecht) zijn in verband met eerder uitgevoerd onderzoek in 2018 CPE-metingen gedaan. De CPE vrachten bleken toen vergelijkbaar met het niveau van 2020 en 2021. Omdat dit echter maar één locatie is en misschien niet representatief voor de situatie in het hele land, is het echter niet uit te sluiten dat op landelijk niveau eind 2019/begin 2020 de prevalentie hoger was dan tijdens de meetcampagne. Deze mogelijkheid lijkt te worden bevestigd door data uit de humane surveillance, waar het percentage CPE onder *E. coli* en *K. pneumoniae* isolaten in de routine-diagnostiek in 2020 iets lager waren dan in het jaar daarvoor, namelijk 0,05% vergeleken met 0,08% voor *E. coli* en 0,3% vergeleken met 0,5% voor *K. pneumoniae* (Nethmap, 2020; 2021)

Van metingen in rioolwater naar schatten van dragerschap

De verdubbeling in 2020 van de totale CPE vracht (d.w.z. de som van 41 RWZIs) ten opzichte van dat in 2016, suggereert een verdubbeling van het aantal CPE dragers. Voor de zeldzamere CPE varianten (CPE+) was er zelfs een bijna 6-voudige toename. De in het huidige rapport beschreven schatting van het aantal dragers is gebaseerd op een in 2016 gemaakte puntschatting waarbij was aangenomen dat CPE-dragers evenveel CPE in hun darmen hebben als ESBL-dragers ESBL in hun darmen hebben (zie Blaak *et al.* 2021). Daarnaast is het gebaseerd op de aanname dat de uitscheiding van *E. coli* per persoon bij dezelfde RWZI's in beide jaren gelijk is, wat wordt ondersteund door nagenoeg dezelfde totale *E. coli* vracht in beide jaren, en dat CPE dragers in beide jaren gemiddeld evenveel CPE uitscheidde. De huidige schatting van dragerschap heeft daarom meerdere beperkingen en geeft alleen een ruwe indicatie van het aantal CPE dragers. Op de eerste plaats is het een puntschatting, waarbij de foutmarges niet zijn bepaald. Een nauwkeurigere schatting door middel van modellering zal in 2022 worden uitgevoerd. Daarnaast is het belangrijk om vast te stellen hoeveel CPE dragers in hun darmen hebben en hoe zich dat verhoudt tot de vrachten in het riool. Omdat CPE zo weinig voorkomen (de schatting is 0,05%, of 1 drager op 2000 personen) is deze vraag moeilijk te onderzoeken in de algemene bevolking. Er zijn op dit moment concrete plannen om deze vraag binnen de ziekenhuissetting te onderzoeken in samenwerking met een aantal ziekenhuizen.

Voor deze toepassing van rioolwatermetingen, het schatten van het aantal dragers en niet alleen het volgen van trends, is het ook nog nodig om de gevoeligheid van de methode vast te stellen. Dat wil zeggen, hoeveel CPE dragers moeten er in een verzorgingsgebied – of beter gezegd per m³ rioolwater en dus per inwoner – aanwezig zijn, om deze te kunnen detecteren. CPE werden zowel in 2016 als 2020 vaker bij grote dan bij kleine RWZI's gevonden, en bij kleine RWZI's werden CPE vaker in het ene jaar wel en in het andere jaar niet gevonden (zonder een voorkeur voor jaar). Bij een zelfde gemiddelde uitscheiding per drager is de detectiegrens, oftewel het relatieve aantal dragers wat nodig is voor detectie, bij elke RWZI gelijk (dat wil zeggen, het minimaal aantal dragers per inwoner of per m³ rioolwater). Dit is in schijnbare tegenstelling met de bevinding dat bij kleinere RWZI's een grotere kans was om géén CPE te vinden, terwijl bij grote RWZI (>100.000) altijd CPE werden gedetecteerd. Dit zou echter verklaard kunnen worden als de test zo gevoelig is, dat bij een kleine RWZI al een fractie van CPE die uitscheiden wordt door één drager kan worden gedetecteerd (bijvoorbeeld de helft van de CPE van één drager). Omdat aanwezigheid van minder dan één drager in de praktijk niet mogelijk is, wordt de kans op detectie bij zo'n kleine RWZI bepaald door de kans op de aanwezigheid van één drager (bijv. één drager in een gebied met 4000 inwoners, terwijl de test bij dit voorbeeld in principe ook één drager op de 8000 inwoners kan aantonen). Bij een grotere RWZI zijn in dit voorbeeld in verhouding minder dragers nodig om boven de detectielimiet uit te komen (namelijk één drager op de 8000 inwoners). In dat geval zou, bij eenzelfde prevalentie onder inwoners, bij een grotere RWZI de kans groter zijn dat er "genoeg" dragers aanwezig zijn om te kunnen detecteren. Een andere mogelijke verklaring voor het verschil in detectie tussen grote en kleine RWZIs is dat het percentage dragers bij de grote RWZI relatief hoger is, of dat de uitscheiding daar gemiddeld hoger is. Beide alternatieven zijn in overeenstemming met de waargenomen correlatie tussen de CPE vracht en de grootte van de RWZI. Welke factoren in welke mate meespelen is echter niet bekend en kan worden opgehelderd met een gevoeligheidsanalyse. Daarvoor zijn er naast gegevens over hoeveel ontlasting mensen gemiddeld per dag produceren en hoeveel water er in het riool zit, gegevens nodig over de hoeveelheid CPE in de ontlasting van dragers. Op dit moment worden gegevens gebruikt over de hoeveelheid ESBL in de ontlasting van ESBL-dragers (data van vd Bunt, persoonlijke communicatie) voor de ontwikkeling van een wiskundig model waarmee dragerschap geschat kan worden aan de hand van rioolwatervrachten. Het model zal worden aangepast zodra gegevens over CPE concentraties beschikbaar komen.

CPE prevalentie in relatie tot populatiekenmerken

De gewogen CPE vrachten correleerden met alle onderzochte populatiekenmerken. De sterkste associatie werd gevonden met de mate van stedelijkheid en de fractie niet-westerse migranten. De associatie met de aan- of afwezigheid van ziekenhuizen was relatief zwak. Dit is in overeenstemming met bevindingen uit eerder onderzoek waaruit bleek dat ziekenhuisafvalwater in het algemeen minder dan 10% van de in het RWZI influent aanwezige CPE verklaart (Schmitt *et al.*, 2018). De verschillende populatiekenmerken waren echter onderling sterk aan elkaar gecorreleerd, wat het identificeren van de werkelijke risicofactoren van CPE dragerschap bemoeilijkt. Zo is het bijvoorbeeld

mogelijk dat de omgevingsadressendichtheid correleert met het aantal CPE dragers in een gebied, niet omdat bevolkingsdichtheid een risicofactor is, maar omdat dit kenmerk een proxy is voor andere variabelen die mogelijk samenhangen met een andere levensstijl (waaronder reisgedrag) tussen inwoners van landelijk en stedelijk gebied.

Hoewel door de onderlinge correlaties ook een multivariate analyse geen uitsluitel kan geven over de werkelijke risicofactoren van CPE dragerschap bleek daar wel uit dat de onderzochte populatiekenmerken op zijn hoogst slechts een klein deel van de variatie in de CPE vracht kunnen verklaren. Dit geeft aan dat er ook nog andere, onbekende factoren zijn die de CPE vracht bepalen. Dat kunnen risicofactoren zijn voor dragerschap, maar het is niet uit te sluiten dat ook factoren die concentraties in het riool beïnvloeden daar een rol bij kunnen spelen. Zoals bijvoorbeeld eigenschappen van de rioolstelsels, de hoeveelheid neerslag en de temperatuur. Hoewel in de huidige analyses neerslag inderdaad een zwakke associatie bleek te hebben met *E. coli* en ESBL-EC vrachten was dit echter niet het geval voor CPE.

Hoewel het niet precies duidelijk is welke van de onderzochte populatiekenmerken samenhangen met de gewogen CPE vrachten, is het wel duidelijk dat deze associatie specifiek was voor CPE en niet bestond voor ESBL-EC. Dit geeft aan dat verschillende risicofactoren een rol spelen bij de verspreiding of mate van dragerschap van verschillende soorten van antibioticaresistente bacteriën. Omdat voor MCR-EC nog geen kwantitatieve data beschikbaar zijn kan nog niet onderzocht worden of de betreffende populatiekenmerken wel correleren met MCR-EC vrachten. De bevinding dat MCR-EC vaker bij kleine RWZI's werden aangetroffen dan CPE kan er op wijzen dat risicofactoren voor het oplopen van CPE en MCR-EC verschillend zijn. Om hier meer inzicht in te krijgen is het belangrijk om ook voor MCR-EC in de toekomst een kwantitatieve methode te gebruiken.

Aanwezigheid van ziekenhuizen in het RWZI verzorgingsgebied

Hoewel er geen sterke associatie was tussen een hoge CPE vracht en de aanwezigheid van een ziekenhuis in het RWZI verzorgingsgebied, kunnen ziekenhuizen wel degelijk een bijdrage leveren aan de totale CPE vracht in het gemeentelijke afvalwater. Dat kan op sommige momenten en voor specifieke typen zelfs aanzienlijk zijn (Schmitt *et al.*, 2018). De aanwezigheid van ziekenhuizen in het RWZI verzorgingsgebied bemoeilijkt daardoor de schatting van het percentage dragers in de algemene bevolking. Het is mogelijk dat patiënten met een CPE infectie meer CPE uitscheiden dan asymptomatische CPE dragers in de algemene bevolking. Dat zou betekenen dat een verandering in de vracht mogelijk ook veroorzaakt kan worden door een verschuiving in het type drager (symptomatisch versus asymptomatisch), en niet alleen door een verandering in het aantal dragers. In hoeverre de aantallen CPE in de darmen van asymptomatische dragers en patiënten verschillen zou toekomstig onderzoek moeten uitwijzen. Een te ontwikkelen model waarmee dragerschap geschat kan worden gebaseerd op rioolwatervrachten zal dergelijke informatie moeten incorporeren.

Het vergelijken van RWZI's met en zonder aangesloten ziekenhuis(zen) die zo goed mogelijk gematcht zijn op regio en aantal inwoners, kan meer inzicht geven in het effect van de aanwezigheid van ziekenhuizen op CPE vrachten en typen bij de RWZI. In de longitudinale metingen van 2022 zullen daarom de bestaande meetlocaties, de provinciehoofdstad RWZI's, elk zo goed mogelijk worden gematcht aan een andere RWZI in dezelfde provincie. Beide RWZI's van een koppel zullen bovendien in dezelfde week worden geanalyseerd.

Vergelijking rioolwatersurveillance en humane surveillance

De huidige surveillance van antibioticaresistentie bij mensen bestaat voornamelijk uit het surveillance netwerk Infectieziekten Surveillance Informatie Systeem-Antibiotica Resistentie (ISIS-AR) en het Typeringsnetwerk-Nederland (Type-Ned). In het surveillance netwerk ISIS-AR worden de antibioticaresistentie patronen van isolaten afkomstig uit de klinische diagnostiek verzameld en in de tijd vergeleken. Onder andere gegevens over resistentie van isolaten uit ziekenhuizen (bloed- en andere infecties), huisartsenpraktijken (urine- en andere infecties) en verpleeghuizen worden zo verzameld. Daarnaast worden bepaalde risicogroepen bij opname in het ziekenhuis gescreend op asymptomatisch dragerschap. De CPE isolaten die op deze manier worden geïdentificeerd en verder gekarakteriseerd weerspiegelen dus de verspreiding van CPE in Nederland onder patiënten en risicogroepen. Het riool bevat daarentegen alle CPE varianten die in de algemene bevolking circuleren: varianten die voorkomen in de kliniek en mogelijk infecties veroorzaken en klinisch minder relevante varianten bij gezonde dragers die niet in aanraking komen met de gezondheidszorg. Bij een prevalentie van ongeveer 0,05% overstijgt het totaal aantal dragers in Nederland (ongeveer 8000 op de 17 miljoen) het aantal infecties waarvan in NethMap worden gerapporteerd (180 personen in 2020; Nethmap 2021). Dit kan verklaren waarom een deel van de isolaten die in de rioolwatersurveillance zijn gevonden niet zijn aangetroffen in de humane surveillance. Het riool kan echter ook stammen bevatten die in de toekomst alsnog problemen gaan geven.

Dat anderzijds niet alle CPE uit de humane surveillance werden teruggevonden in het riool is te verklaren door de beperktheid van het aantal rioolwatermeetlocaties en -tijdstippen, en het feit dat deze niet specifiek zijn afgestemd op de vindlocaties van CPE bij patiënten en mensen met verhoogd risico op dragerschap: de metingen in het riool zijn bij een derde van de Nederlandse RWZI's uitgevoerd, en voor de meeste slechts op één tijdstip in 2016 (de rioolwaterisolaten van 2020/2021 zijn in deze analyse nog niet meegenomen). Van de humane isolaten was slechts 13% afkomstig uit 2016. Daarnaast is slechts een selectie van de geïsoleerde rioolwaterstammen gekarakteriseerd met *whole genome sequencing*.

Ondanks dat de humane CPE surveillance en de rioolwatersurveillance niet op elkaar waren afgestemd in tijd en ruimte en de kans op discrepanties dus groot was, werden in het rioolwater CPE aangetroffen die een zeer hoge mate van genetische overeenkomst hadden met CPE gevonden in mensen. In de meeste gevallen was er tussen deze nauw verwante CPE uit rioolwater en uit mensen geen overeenkomst wat betreft locatie en tijd van isolatie. Dat duidt erop dat bepaalde stammen

gedurende langere tijd en op verschillende plekken in het land circuleren, ook al wordt dat niet altijd zichtbaar in de humane surveillance. Opmerkelijk was dat in een enkel geval de woonplaats van de patiënt en/of van het insturende laboratorium precies binnen het verzorgingsgebied van de RWZI viel waar het verwante rioolwater isolaat was geïsoleerd, hoewel niet altijd in hetzelfde jaar. Het is in deze gevallen uiteraard onbekend of de patiënt waar de CPE werd aangetoond ook de bron is van de CPE in het rioolwater, maar gezien de lange draagtijd van CPE behoort dat – zeker wanneer de vinddatum minder dan een jaar uit elkaar ligt – tot de mogelijkheden.

De bevinding van genetisch zeer nauw verwante isolaten in onafhankelijk van elkaar onderzochte rioolwatermonsters en mensen, bevestigt dat rioolwater surveillance ingezet kan worden om te monitoren wat in mensen circuleert. Omdat grotendeels juist ook andere varianten worden gevonden dan in de kliniek is rioolwatersurveillance een waardevolle aanvulling op de humane surveillance voor het vaststellen waar en in welke mate BRMO's in Nederland circuleren.

5 Conclusies en aanbevelingen

Conclusies

- Met behulp van rioolwatersurveillance is de huidige verspreiding van CPE in Nederland geografisch en temporeel in kaart gebracht.
- Tussen 2016 en 2020 werd geen statistisch significante verandering in de gemiddelde CPE vracht gevonden. De COVID-19 maatregelen lijken daarmee geen negatief effect gehad te hebben gehad op de prevalentie van CPE, tenminste niet in vergelijking met 2016.
- De grotere relatieve bijdrage van NDM- en KPC-typen CPE aan de totale CPE vracht ten opzichte van 2016, duidt erop dat deze typen zich de afgelopen jaren verder hebben verspreid, en/of vaker zijn geïntroduceerd.
- De bevinding van genetisch zeer verwante isolaten in onafhankelijk van elkaar onderzochte rioolwatermonsters en mensen, toont aan dat rioolwater inzicht kan geven in wat in mensen circuleert.
- Rioolwatersurveillance is een waardevolle aanvulling van de humane surveillance voor onderzoek naar de trends in de verspreiding van zeldzame BRMO's in de algemene bevolking, en de genetische diversiteit van deze BRMO's.

Aanbevelingen

- Toekomstige metingen bij de provinciehoofdsteden en de 76 RWZI's moeten uitwijzen hoe de trends zich verder zullen ontwikkelen, en of de statistisch niet significante verhoging van de CPE vracht en de relatieve toename van NDM- en KPC typen bevestigd kunnen worden of door blijven zetten.
- Om door middel van rioolwatermetingen niet alleen veranderingen in CPE dragerschap waar te kunnen nemen, maar ook het absolute aantal dragers in de bevolking nauwkeuriger te kunnen schatten, moet het verband tussen CPE concentraties in ontlasting en in rioolwater nog vastgesteld worden.
- Om beter inzicht te krijgen in de prevalentie van MCR-EC (en eventueel andere MCR-positieve Enterobacterales species) en voor de identificatie van risicofactoren, moeten in toekomstige surveillance activiteiten ook voor dit type resistente bacterie kwantitatieve metingen toegevoegd worden.
- Ook andere *emerging* BRMO's kunnen in de ABR rioolwatersurveillance geïncorporeerd worden, afhankelijk van de actualiteit en waar aanvulling op de humane surveillance wenselijk wordt geacht.

6 Dankwoord

Voor het verkrijgen van de rioolwatermonsters zijn wij dank verschuldigd aan veel mensen. Mensen werkzaam bij de diverse waterschappen, RWZI's, AWZI's en Aquon (in het bijzonder Robert Weterings), maar ook intern: Kees van de Kraats en Marcel Menkhorst voor het altijd beschikbaar zijn voor hulp bij logistieke vraagstukken, en onze directe collega's Willemijn Lodder en Anne-Merel van der Drift, voor de onderlinge afstemming met de monsternames voor NRS en het delen van debietendata.

Daarnaast willen we het CBS, en in het bijzonder Kees Baas en Jeldrik Bakker bedanken voor het delen van de uit hun analyses afkomstige gegevens van de RWZI/AWZI verzorgingskringen.

7 Referenties

- Aarestrup, F.M. and Woolhouse, M.E.J. 2020. Using sewage for surveillance of antimicrobial resistance. *Science* 367(6478), 630-632.
- Albiger, B., Glasner, C., Struelens, M.J., Grundmann, H., Monnet, D.L. and European Survey of Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae working group 2015. Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in Europe: assessment by national experts from 38 countries, May 2015. *Euro Surveill* 20(45).
- Blaak, H., Kemper, M., De Man, H., van Leuken, J., Hierink, F., Van Passel, M., Schmitt, H. and de Roda Husman, A.M. 2020. Nationwide surveillance reveals frequent detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in Dutch municipal wastewater. In voorbereiding.
- Blaak, H., Kemper, M.A., de Man, H., van Leuken, J.P.G., Schijven, J.F., van Passel, M.W.J., Schmitt, H. and de Roda Husman, A.M. 2021. Nationwide surveillance reveals frequent detection of carbapenemase-producing Enterobacteriales in Dutch municipal wastewater. *Sci Total Environ* 776.
- Blaak, H., Kemper, M.A., Schilperoort, R., de Rijk, S.E., de Roda Husman, A.M. and Schmitt, H. 2019. Carbapenemase-producerende Enterobacteriaceae (CPE) in het riool in Utrecht. RIVM Rapport 2019-0199.
- Borowiak, M., Fischer, J., Hammerl, J.A., Hendriksen, R.S., Szabo, I. and Malorny, B. 2017. 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* 72(12), 3317-3324.
- CBS 2021 Inwoners per rioolwaterzuiveringsinstallatie, 1-1-2020. <https://www.cbs.nl/nl-nl/maatwerk/2021/01/inwoners-per-rioolwaterzuiveringsinstallatie-1-1-2020>.
- CBS Statline 2020a Bevolking op 1 januari en gemiddeld; geslacht, leeftijd en regio. <https://opendata.cbs.nl/statline/#/CBS/nl/dataset/03759ned/table?ts=1588234977905>.
- CBS Statline 2020b Kerncijfers wijken en buurten 2020. <https://opendata.cbs.nl/#/CBS/nl/dataset/84799NED/table?searchKeywords=stedelijkheid>.
- Coronadashboard 2022 <https://coronadashboard.rijksoverheid.nl/>.
- Dallenne, C., Da Costa, A., Decré, D., Favier, C. and Arlet, G. 2010. Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important β -lactamases in Enterobacteriaceae. *J Antimicrob Chemother* 65(3), 490-495.
- Dierikx, C., Gijsbers, E., van Duijkeren, E., Hengeveld, P. and Meijs, A. 2021. CPE en colistine resistentie. RIVM Rapport 2021-0030.
- Fattouh, R., Tijet, N., McGeer, A., Poutanen, S.M., Melano, R.G. and Patel, S.N. 2015. What Is the Appropriate Meropenem MIC for Screening of Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae in Low-Prevalence Settings? *Antimicrob Agents Chemother* 60(3), 1556-1559.

- Fresia, P., Antelo, V., Salazar, C., Gimenez, M., D'Alessandro, B., Afshinnekoo, E., Mason, C., Gonnet, G.H. and Iraola, G. 2019. Urban metagenomics uncover antibiotic resistance reservoirs in coastal beach and sewage waters. *Microbiome* 7(1), 35.
- Friedman, N.D., Carmeli, Y., Walton, A.L. and Schwaber, M.J. 2017. Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae: A Strategic Roadmap for Infection Control. *Infect Control Hosp Epidemiol* 38(5), 580-594.
- Hendrickx, A.P.A., Landman, F., de Haan, A., Witteveen, S., van Santen-Verheувel, M.G., Schouls, L.M. and The Dutch Cpe Surveillance Study, G. 2021. bla OXA-48-like genome architecture among carbapenemase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in the Netherlands. *Microb Genom* 7(5).
- Hendriksen, R.S., Munk, P., Njage, P., van Bunnik, B., McNally, L., Lukjancenکو, O., Roder, T., Nieuwenhuijse, D., Pedersen, S.K., Kjeldgaard, J., Kaas, R.S., Clausen, P., Vogt, J.K., Leekitcharoenphon, P., van de Schans, M.G.M., Zuidema, T., de Roda Husman, A.M., Rasmussen, S., Petersen, B., Global Sewage Surveillance project, c., Amid, C., Cochrane, G., Sicheritz-Ponten, T., Schmitt, H., Alvarez, J.R.M., Aidara-Kane, A., Pamp, S.J., Lund, O., Hald, T., Woolhouse, M., Koopmans, M.P., Vigre, H., Petersen, T.N. and Aarestrup, F.M. 2019. Global monitoring of antimicrobial resistance based on metagenomics analyses of urban sewage. *Nat Commun* 10(1), 1124.
- Huijbers, P.M.C., Larsson, D.G.J. and Flach, C.F. 2020. Surveillance of antibiotic resistant *Escherichia coli* in human populations through urban wastewater in ten European countries. *Environ Pollut* 261, 114200.
- Hutinel, M., Huijbers, P.M.C., Fick, J., Åhrén, C., Larsson, D.G.J. and Flach, C.F. 2019. Population-level surveillance of antibiotic resistance in *Escherichia coli* through sewage analysis. *Eurosurveillance* 24(37).
- Kieffer, N., Royer, G., Decousser, J.W., Bourrel, A.S., Palmieri, M., Ortiz De La Rosa, J.M., Jacquier, H., Denamur, E., Nordmann, P. and Poirel, L. 2019. Erratum for Kieffer et al., "mcr-9, an Inducible Gene Encoding an Acquired Phosphoethanolamine Transferase in *Escherichia coli*, and Its Origin". *Antimicrob Agents Chemother* 63(11).
- Kwak, Y.K., Colque, P., Byfors, S., Giske, C.G., Mollby, R. and Kuhn, I. 2015. Surveillance of antimicrobial resistance among *Escherichia coli* in wastewater in Stockholm during 1 year: does it reflect the resistance trends in the society? *Int J Antimicrob Agents* 45(1), 25-32.
- Lee, Y.L., Chen, H.M., Hii, I.M. and Hsueh, P.R. 2022. Carbapenemase-producing Enterobacterales infections: recent advances in diagnosis and treatment. *Int J Antimicrob Agents* 59(2), 106528.
- Liu, Y.Y., Wang, Y., Walsh, T.R., Yi, L.X., Zhang, R., Spencer, J., Doi, Y., Tian, G., Dong, B., Huang, X., Yu, L.F., Gu, D., Ren, H., Chen, X., Lv, L., He, D., Zhou, H., Liang, Z., Liu, J.H. and Shen, J. 2016. 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* 16(2), 161-168.

- Lodder, W. and de Roda Husman, A.M. 2020. SARS-CoV-2 in wastewater: potential health risk, but also data source. *Lancet Gastroenterol Hepatol* 5(6), 533-534.
- Logan, L.K. and Weinstein, R.A. 2017. The Epidemiology of Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae: The Impact and Evolution of a Global Menace. *J Infect Dis* 215(suppl_1), S28-S36.
- Lu, J., Dong, N., Liu, C., Zeng, Y., Sun, Q., Zhou, H., Hu, Y., Chen, S., Shen, Z. and Zhang, R. 2020. Prevalence and molecular epidemiology of mcr-1-positive *Klebsiella pneumoniae* in healthy adults from China. *J Antimicrob Chemother* 75(9), 2485-2494.
- Nethmap (2015) Monitoring of antimicrobial resistance and antibiotic usage in the Netherlands in 2014., <https://www.rivm.nl/bibliotheek/rapporten/2020-0065.pdf>.
- Nethmap (2020) Consumption of antimicrobial agents and antimicrobial resistance among medically important bacteria in the Netherlands in 2019., <https://www.rivm.nl/bibliotheek/rapporten/2020-0065.pdf>.
- Nethmap (2021) Consumption of antimicrobial agents and antimicrobial resistance among medically important bacteria in the Netherlands in 2020., <https://www.rivm.nl/bibliotheek/rapporten/2020-0065.pdf>.
- Pärnänen, K.M.M., Narciso-Da-Rocha, C., Kneis, D., Berendonk, T.U., Cacace, D., Do, T.T., Elpers, C., Fatta-Kassinos, D., Henriques, I., Jaeger, T., Karkman, A., Martinez, J.L., Michael, S.G., Michael-Kordatou, I., O'Sullivan, K., Rodriguez-Mozaz, S., Schwartz, T., Sheng, H., Sørum, H., Stedtfeld, R.D., Tiedje, J.M., Giustina, S.V.D., Walsh, F., Vaz-Moreira, I., Virta, M. and Manaia, C.M. 2019. Antibiotic resistance in European wastewater treatment plants mirrors the pattern of clinical antibiotic resistance prevalence. *Science Advances* 5(3).
- Poirel, L., Potron, A. and Nordmann, P. 2012. OXA-48-like carbapenemases: the phantom menace. *J Antimicrob Chemother* 67(7), 1597-1606.
- Quan, J., Li, X., Chen, Y., Jiang, Y., Zhou, Z., Zhang, H., Sun, L., Ruan, Z., Feng, Y., Akova, M. and Yu, Y. 2017. Prevalence of mcr-1 in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* recovered from bloodstream infections in China: a multicentre longitudinal study. *Lancet Infect Dis* 17(4), 400-410.
- Rebelo, A.R., Bortolaia, V., Kjeldgaard, J.S., Pedersen, S.K., Leekitcharoenphon, P., Hansen, I.M., Guerra, B., Malorny, B., Borowiak, M., Hammerl, J.A., Battisti, A., Franco, A., Alba, P., Perrin-Guyomard, A., Granier, S.A., De Frutos Escobar, C., Malhotra-Kumar, S., Villa, L., Carattoli, A. and Hendriksen, R.S. 2018. 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* 23(6).
- Reuland, E.A., Al Naiemi, N., Kaiser, A.M., Heck, M., Kluytmans, J.A., Savelkoul, P.H., Elders, P.J. and Vandenbroucke-Grauls, C.M. 2016a. Prevalence and risk factors for carriage of ESBL-producing Enterobacteriaceae in Amsterdam. *J Antimicrob Chemother* 71(4), 1076-1082.

- Reuland, E.A., Sonder, G.J., Stolte, I., Al Naiemi, N., Koek, A., Linde, G.B., van de Laar, T.J., Vandenbroucke-Grauls, C.M. and van Dam, A.P. 2016b. Travel to Asia and traveller's diarrhoea with antibiotic treatment are independent risk factors for acquiring ciprofloxacin-resistant and extended spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae-a prospective cohort study. *Clin Microbiol Infect* 22(8), 731 e731-737.
- Schmitt, H., Blaak, H., Kemper, M., de Rijk, S.E., Van de Schans, M. and De Roda Husman, A.M. 2018. Carbapenemase-producerende Enterobacteriaceae (CPE) in ziekenhuisafvalwater. RIVM Rapport 2018-0114.
- Schmitt, H., Blaak, H., Kemper, M., van Passel, M., Hierink, F., van Leuken, J., De Roda Husman, A.M., van der Grinten, E., Rutgers, M., Schijven, J., De Man, H., Hoeksma, P. and Zuidema, T. 2017. Bronnen van antibioticaresistente bacterien in het milieu en mogelijke maatregelen. RIVM Rapport 2017-0085.
- Shen, C., Zhong, L.L., Zhong, Z., Doi, Y., Shen, J., Wang, Y., Ma, F., Ahmed, M., Zhang, G., Xia, Y., Chen, C. and Tian, G.B. 2021. Prevalence of mcr-1 in Colonized Inpatients, China, 2011-2019. *Emerg Infect Dis* 27(9), 2502-2504.
- Sun, J., Zhang, H., Liu, Y.H. and Feng, Y. 2018. Towards Understanding MCR-like Colistin Resistance. *Trends Microbiol* 26(9), 794-808.
- Teunis, P.F.M., Evers, E.G., Hengeveld, P.D., Dierikx, C.M., Wielders, C.C.H. and van Duijkeren, E. 2018. Time to acquire and lose carriage of ESBL/pAmpC producing *E. coli* in humans in the Netherlands. *PLoS One* 13(3), e0193834.
- van den Bunt, G., van Pelt, W., Hidalgo, L., Scharringa, J., de Greeff, S.C., Schurch, A.C., Mughini-Gras, L., Bonten, M.J.M. and Fluit, A.C. 2019. Prevalence, risk factors and genetic characterisation of extended-spectrum beta-lactamase and carbapenemase-producing Enterobacteriaceae (ESBL-E and CPE): a community-based cross-sectional study, the Netherlands, 2014 to 2016. *Euro Surveill* 24(41).
- van der Zwaluw, K., de Haan, A., Pluister, G.N., Bootsma, H.J., de Neeling, A.J. and Schouls, L.M. 2015. The carbapenem inactivation method (CIM), a simple and low-cost alternative for the Carba NP test to assess phenotypic carbapenemase activity in gram-negative rods. *PLoS One* 10(3), e0123690.
- van der Zwaluw, K., Witteveen, S., Wielders, L., van Santen, M., Landman, F., de Haan, A., Schouls, L.M., Bosch, T. and Dutch, C.P.E.s.S.G. 2020. Molecular characteristics of carbapenemase-producing Enterobacteriales in the Netherlands; results of the 2014-2018 national laboratory surveillance. *Clin Microbiol Infect* 26(10), 1412.e1417-1412.e1412.
- van Duin, D., Kaye, K.S., Neuner, E.A. and Bonomo, R.A. 2013. Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: a review of treatment and outcomes. *Diagn Microbiol Infect Dis* 75(2), 115-120.

- van Hattem, J.M., Arcilla, M.S., Bootsma, M.C., van Genderen, P.J., Goorhuis, A., Grobusch, M.P., Molhoek, N., Oude Lashof, A.M., Schultsz, C., Stobberingh, E.E., Verbrugh, H.A., de Jong, M.D., Melles, D.C. and Penders, J. 2016. Prolonged carriage and potential onward transmission of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in Dutch travelers. *Future Microbiol* 11, 857-864.
- van Hoek, A.H., Schouls, L., van Santen, M.G., Florijn, A., de Greeff, S.C. and van Duijkeren, E. 2015. Molecular characteristics of extended-spectrum cephalosporin-resistant Enterobacteriaceae from humans in the community. *PLoS One* 10(6), e0129085.
- Wang, X., Wang, Y., Zhou, Y., Li, J., Yin, W., Wang, S., Zhang, S., Shen, J., Shen, Z. and Wang, Y. 2018. Emergence of a novel mobile colistin resistance gene, *mcr-8*, in NDM-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Emerg Microbes Infect* 7(1), 122.
- Wang, Y., Tian, G.B., Zhang, R., Shen, Y., Tyrrell, J.M., Huang, X., Zhou, H., Lei, L., Li, H.Y., Doi, Y., Fang, Y., Ren, H., Zhong, L.L., Shen, Z., Zeng, K.J., Wang, S., Liu, J.H., Wu, C., Walsh, T.R. and Shen, J. 2017. Prevalence, risk factors, outcomes, and molecular epidemiology of *mcr-1*-positive Enterobacteriaceae in patients and healthy adults from China: an epidemiological and clinical study. *Lancet Infect Dis* 17(4), 390-399.
- WHO 2017 Prioritisation of pathogens to guide discovery, research and development of new antibiotics for drug resistant bacterial infection, including tuberculosis. Available at: http://www.who.int/medicines/areas/rational_use/prioritization-of-pathogens/en/ (accessed January 2020).
- WHO 2018 Critically important antimicrobials for human medicine. 6th revision 2018. <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/312266/9789241515528-eng.pdf> (accessed December 2021).
- WHO 2021 GLASS - The detection and reporting of colistin resistance. 2nd edition. <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/343654/9789240019041-eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y> (accessed December 2021).

8 Bijlagen

8.1 Representativiteit van de geselecteerde RWZI's

Voor een representatieve selectie zijn grote en kleine RWZI's geïncludeerd en RWZI's in niet stedelijk tot zeer stedelijke gebieden. Vanwege het streven om de meetlocaties te beperken en tegelijkertijd een zo groot mogelijk deel van de bevolking te representeren én alle 12 de hoofdsteden te vertegenwoordigen, is er wel sprake van een relatieve oververtegenwoordiging van grote RWZI's (>50,000 inwoners) en RWZI's in zeer stedelijke gebieden (Tabel 8-1, Tabel 8-2).

Tabel 8-1 Indeling van de geselecteerde RWZI's naar aantal inwoners.

Inwoner categorie	Alle RWZI's	Selectie	Percentage
<10.000	68	13	19%
10.000-50.000	155	24	15%
50.000-100.000	46	14	30%
>100.000	48	25	52%
Totaal	317	76	24%

Weergegeven zijn de indeling in inwoner categorieën voor alle - op het moment van de analyse aanwezige - 317 RWZI's van Nederland en voor de surveillance selectie van 76 RWZI's. De inwoner categorieën zijn gebaseerd op het aantal inwoners per zuiveringskring, gebaseerd op inwoneraantallen per 1-1-2020 afkomstig van het CBS (CBS, 2021).

Tabel 8-2 Indeling van de gemeenten in de verzorgingskringen van de geselecteerde RWZI's.

Stedelijkheid	Aantal gemeenten		% van totaal
	In RWZI-gebieden	Totaal	
Niet stedelijk	28	56	50%
Weinig stedelijk	59	128	46%
Matig stedelijk	31	76	41%
Sterk stedelijk	33	74	45%
Zeer sterk stedelijk	14	21	67%
Totaal	165	355	46%

De 76 zuiveringskringen omvatten (delen van) 165 gemeenten. Weergegeven is de verdeling van de mate van stedelijkheid voor deze 165 gemeenten, vergeleken met de verdeling van alle - op het moment van analyse - 355 gemeenten van Nederland. Data gebruikt voor deze analyse zijn afkomstig van het CBS (CBS, 2021; CBS Statline, 2020b).

8.2 Lijst van geselecteerde RWZI's en AWZI's

Rwzi Code	RWZI/AWZI naam	Woonplaats	Provincie hoofdstad	Provincie	Beheerder
01033	GARMERWOLDE	GARMERWOLDE	<input checked="" type="checkbox"/>	GRONINGEN	Ws Noorderzijlvest
01034	FEERWERD	FEERWERD		GRONINGEN	Ws Noorderzijlvest
01039	SCHEEMDA	SCHEEMDA		GRONINGEN	Ws Noorderzijlvest
02011	LEEWARDEN	LEEWARDEN	<input checked="" type="checkbox"/>	FRIESLAND	Ws Fryslân
02012	DRACHTEN	DRACHTEN		FRIESLAND	Ws Fryslân
02015	GORREDIJK	GORREDIJK		FRIESLAND	Ws Fryslân
02021	DAMWOUDE	WOUTERSWOUDE		FRIESLAND	Ws Fryslân
02022	JOURE	BROEK (FRL)		FRIESLAND	Ws Fryslân
02037	WARNS	MOLKWERUM		FRIESLAND	Ws Fryslân
02038	FRANEKER	FRANEKER		FRIESLAND	Ws Fryslân
03027	SMILDE	SMILDE		DRENTHE	Ws Drents Overijsselse Delta
03032	DIEVERBRUG	DIEVERBRUG		DRENTHE	Ws Drents Overijsselse Delta
03033	ECHTEN	HOOGEVEEN		DRENTHE	Ws Drents Overijsselse Delta
03010	ASSEN	ASSEN	<input checked="" type="checkbox"/>	DRENTHE	Ws Hunze en Aa's
03023	TWEEDE EXLOERMOND	2E EXLOERMOND		DRENTHE	Ws Hunze en Aa's
03028	SLEEN	SLEEN		DRENTHE	Ws Vechtstromen
04019	DEVENTER	DEVENTER		OVERIJSSSEL	Ws Drents Overijsselse Delta
04023	KAMPEN	KAMPEN		OVERIJSSSEL	Ws Drents Overijsselse Delta
04026	ZWOLLE	ZWOLLE	<input checked="" type="checkbox"/>	OVERIJSSSEL	Ws Drents Overijsselse Delta
04024	HARDENBERG	BERGENTHEIM		OVERIJSSSEL	Ws Vechtstromen
05002	ENSCHEDÉ	ENSCHEDÉ		OVERIJSSSEL	Ws Vechtstromen
05012	OLDENZAAL	OLDENZAAL		OVERIJSSSEL	Ws Vechtstromen
05025	DEN HAM	DEN HAM (OV)		OVERIJSSSEL	Ws Vechtstromen
04027	TOLLEBEEK	TOLLEBEEK		FLEVOLAND	Ws Zuiderzeeland
06004	LELYSTAD	LELYSTAD	<input checked="" type="checkbox"/>	FLEVOLAND	Ws Zuiderzeeland
06006	ZEEWOLDE	ZEEWOLDE		FLEVOLAND	Ws Zuiderzeeland
07016	WINTERSWIJK	WINTERSWIJK		GELDERLAND	Ws Rijn en IJssel
07022	ETTEN	ETTEN (G)		GELDERLAND	Ws Rijn en IJssel
09013	ASPEREN	ASPEREN		GELDERLAND	Ws Rivierenland
09016	ARNHEM	ARNHEM	<input checked="" type="checkbox"/>	GELDERLAND	Ws Rivierenland
09017	BERGHAREN	BERGHAREN		GELDERLAND	Ws Rivierenland
09024	NIJMEGEN	WEURT		GELDERLAND	Ws Rivierenland
08017	EPE	EPE		GELDERLAND	Ws Vallei en Veluwe
08021	EDE	EDE		GELDERLAND	Ws Vallei en Veluwe
08022	APELDOORN	APELDOORN		GELDERLAND	Ws Vallei en Veluwe
10037	LOENEN	LOENEN AAN DE VECHT		UTRECHT	Hhs Amstel, Gooi en Vecht / WATERNET
10008	DRIEBERGEN	DRIEBERGEN-RIJSENBURG		UTRECHT	Hhs De Stichtse Rijnlanden
10009	UTRECHT	UTRECHT	<input checked="" type="checkbox"/>	UTRECHT	Hhs De Stichtse Rijnlanden
10020	WOUDENBERG	WOUDENBERG		UTRECHT	Ws Vallei en Veluwe

Rwzi Code	RWZI/AWZI naam	Woonplaats	Provincie hoofd-stad	Provincie	Beheerder
10027	AMERSFOORT	AMERSFOORT		UTRECHT	Ws Vallei en Veluwe
12023	DEN HELDER	DEN HELDER		NOORD-HOLLAND	Hhs Hollands Noorderkwartier
11008	BLARICUM	BLARICUM		NOORD-HOLLAND	Hhs Amstel, Gooi en Vecht / WATERNET
11014	AMSTERDAM WEST	AMSTERDAM		NOORD-HOLLAND	Hhs Amstel, Gooi en Vecht / WATERNET
12006	ALKMAAR	ALKMAAR		NOORD-HOLLAND	Hhs Hollands Noorderkwartier
12016	KATWOUDE	KATWOUDE		NOORD-HOLLAND	Hhs Hollands Noorderkwartier
12018	WIERINGEN	DEN OEVER		NOORD-HOLLAND	Hhs Hollands Noorderkwartier
12021	WERVERSHOOF	WERVERSHOOF		NOORD-HOLLAND	Hhs Hollands Noorderkwartier
13010	HAARLEM WAARDERPOLDER	HAARLEM	<input checked="" type="checkbox"/>	NOORD-HOLLAND	Hhs van Rijnland
15007	DE GROOTE LUCHT	VLAARDINGEN		ZUID-HOLLAND	Hhs van Delfland
15008	HARNASCHPOLDER	DEN HOORN		ZUID-HOLLAND	Hhs van Delfland / Delfluent
15005	HOUTRUST	'S-GRAVENHAGE	<input checked="" type="checkbox"/>	ZUID-HOLLAND	Hhs van Delfland / Delfluent
13033	LEIDEN ZUID-WEST	LEIDEN		ZUID-HOLLAND	Hhs van Rijnland
13038	NIEUWVEEN	NIEUWVEEN		ZUID-HOLLAND	Hhs van Rijnland
16010	KRALINGSEVEER	CAPELLE AD IJSSEL		ZUID-HOLLAND	Hhs van Schieland en de Krimpenerwaard
17011	RIDDERKERK	RIDDERKERK		ZUID-HOLLAND	Ws Hollandse delta
17054	PIERSHIL	PIERSHIL		ZUID-HOLLAND	Ws Hollandse delta
18006	WESTERSCHOUWEN	BURGH HAAMSTEDEN		ZEELAND	Ws Scheldestromen
21001	WALCHEREN	RITTHEM	<input checked="" type="checkbox"/>	ZEELAND	Ws Scheldestromen
23002	TERNEUZEN	TERNEUZEN		ZEELAND	Ws Scheldestromen
27008	'S HERTOGENBOSCH	'S HERTOGENBOSCH	<input checked="" type="checkbox"/>	NOORD-BRABANT	Ws Aa en Maas
28002	ASTEN	HEUSDEN		NOORD-BRABANT	Ws Aa en Maas
28003	AARLE-RIXTEL	AARLE RIXTEL		NOORD-BRABANT	Ws Aa en Maas
27005	HAPERT	HAPERT		NOORD-BRABANT	Ws De Dommel
27010	SINT-OEDENRODE	ST. OEDENRODE		NOORD-BRABANT	Ws De Dommel
25012	PUTTE	PUTTE		NOORD-BRABANT	Ws Brabantse Delta

Rwzi Code	RWZI/AWZI naam	Woonplaats	Provincie hoofdstad	Provincie	Beheerder
25013	RIEL	RIEL		NOORD-BRABANT	Ws Brabantse Delta
25017	NIEUWVEER	BREDA		NOORD-BRABANT	Ws Brabantse Delta
25020	KAATSHEUVEL	KAATSHEUVEL		NOORD-BRABANT	Ws Brabantse Delta
25021	BATH	RILLAND BATH		NOORD-BRABANT	Ws Brabantse Delta
30007	BOSSCHERVELD	MAASTRICHT	☑	LIMBURG	Wsb Limburg
30011	SIMPELVELD	SIMPELVELD		LIMBURG	Wsb Limburg
30017	VENLO	VENLO		LIMBURG	Wsb Limburg
30020	VENRAY	VENRAY		LIMBURG	Wsb Limburg
30022	SUSTEREN	SUSTEREN		LIMBURG	Wsb Limburg
30023	PANHEEL	HEEL		LIMBURG	Wsb Limburg
30025	GENNEP	GENNEP		LIMBURG	Wsb Limburg

Ws = waterschap, Hhs = hoogheemraadschap

8.3 Gebruikte primers voor moleculaire analyses

Tabel 8-3 PCR primers gebruikt voor aantonen aanwezigheid van carbapenemase genen.

Primer	Sequentie	Grootte PCR product (bp)	Ref ^a
GES_463F	5'-AGT CGG CTA GAC CGG AAA G-3'	399	1
GES_861R	5'-TTT GTC CGT GCT CAG GAT-3'		1
IMP_194F	5'-TTG ACA CTC CAT TTA CDG-3'	139	1
IMP_332R	5'-GAT YGA GAA TTA AGC CAC YCT-3'		1
KPC_32F	5'-CTT GTC TCT CAT GGC CGC TGG-3'	449	2
KPC_480R	5'-ACG GAA CGT GGT ATC GCC GAT-3'		2
NDM_45F	5'-CGC ATT AGC CGC TGC ATT GA-3'	591	2
NDM_635R	5'-TCC TTG ATC AGG CAG CCA CC-3'		2
OXA48_31F	5'-TTG GTG GCA TCG ATT ATC G-3'	704	3
OXA48_774R	5'-GAG CAC TTC TTT TGT GAT GGC-3'		3
VIM_151F	5'-GAT GGT GTT TGG TCG CAT A-3'	390	1
VIM_540R	5'-CGA ATG CGC AGC ACC AG-3'		1

^aReferenties: 1 (Dallenne et al., 2010), 2(van der Zwaluw et al., 2015),3 (Blaak et al., 2020).
bp=baseparen.

Tabel 8-4 PCR primers gebruikt voor aantonen aanwezigheid van mcr genen

Primer	Sequentie	Grootte PCR product (bp)	Ref ^a
mcr1_320bp_fw	5'- AGT CCG TTT GTT CTT GTG GC -3'	320	1
mcr1_320bp_rev	5'- AGA TCC TTG GTC TCG GCT TG -3'		1
mcr2_700bp_fw	5'- CAA GTG TGT TGG TCG CAG TT -3'	715	1
mcr2_700bp_rev	5'- TCT AGC CCG ACA AGC ATA CC -3'		1
mcr3_900bp_fw	5'- AAA TAA AAA TTG TTC CGC TTA TG -3'	929	1
mcr3_900bp_rev	5'- AAT GGA GAT CCC CGT TTT T -3'		1
mcr4_1100bp_fw	5'- TCA CTT TCA TCA CTG CGT TG -3'	1116	1
mcr4_1100bp_rev	5'- TTG GTC CAT GAC TAC CAA TG -3'		1
MCR5_fw	5'- ATG CGG TTG TCT GCA TTT ATC -3'	1644	1, 2
MCR5_rev	5'- TCA TTG TGG TTG TCC TTT TCT G -3'		1, 2
MCR_6F	5'- GTC CGG TCA ATC CCT ATC TGT -3'	556	3

Primer	Sequentie	Grootte PCR product (bp)	Ref ^a
MCR_6R	5'- ATC ACG GGA TTG ACA TAG CTA C -3'		3
MCR_7F	5'- TGC TCA AGC CCT TCT TTT CGT -3'	892	3
MCR_7R	5'- TTC ATC TGC GCC ACC TCG T -3'		3
MCR_8F	5'- AAC CGC CAG AGC ACA GAA TT -3'	667	3
MCR_8R	5'- TTC CCC CAG CGA TTC TCC AT -3'		3
MCR_9F	5'- GGT GAA AGT TAT TCC GCT GG -3'	1578	4

Referenties: 1(Rebelo et al., 2018); 2(Borowiak et al., 2017);3(Wang et al., 2018);4(Kieffer et al., 2019)

8.4 Associatie tussen populatiekenmerken onderling

	Spearman's correlatie coefficient					
	Aantal inwoners	Stedelijk -heid	Ziekenhuis	% Allochtonen	% Westerse allochtonen	% Niet-westerse allochtonen
Aantal inwoners	1	0,821	0,737	0,709	0,522	0,795
Stedelijkheid	0,821	1	0,610	0,746	0,535	0,849
Ziekenhuis	0,737	0,610	1	0,517	0,441	0,601
% Allochtonen	0,709	0,746	0,517	1	0,762	0,814
% Westerse allochtonen	0,522	0,535	0,441	0,762	1	0,542
% Niet-westerse allochtonen	0,795	0,849	0,601	0,814	0,542	1

8.5 Uitslagen CPE aan- en afwezigheid in 2016 en 2020

In de tabellen staat weergegeven hoe veel RWZI's in beide jaren positief waren, hoe veel in beide jaren negatief, en hoeveel in een van de twee jaren positief en in welk jaar. Ook weergegeven is de uitkomst van de statistische test (McNemar test).

CPE		2016			p=0,1
		POS	NEG	Total	
2020	POS	13 (32%)	3 (7,3%)	16 (39%)	
	NEG	7 (17%)	18 (44%)	25 (61%)	
	Total	20 (49%)	21 (51%)	41 (100%)	

CPE+		2016			p=0,344
		POS	NEG	Total	
2020	POS	13 (31%)	3 (7,3%)	16 (39%)	
	NEG	7 (17%)	18 (44%)	25 (61%)	
	Total	20 (49%)	21 (51%)	41 (100%)	

OXA-48* EC		2016		
		POS	NEG	Total
2020	POS	31 (76%)	4 (9,8%)	35 (85%)
	NEG	4 (9,8%)	2 (4,9%)	6 (15%)
	Total	35 (85%)	6 (15%)	41 (100%)

p=0,1

OXA-48* KEC		2016		
		POS	NEG	Total
2020	POS	10 (24%)	3 (7,3%)	13 (32%)
	NEG	7 (17%)	21 (51%)	28 (68%)
	Total	17 (41%)	24 (59%)	41 (100%)

p=0,344

NDM		2016		
		POS	NEG	Total
2020	POS	4 (10%)	7 (17%)	11 (27%)
	NEG	3 (7,3%)	27 (66%)	30 (73%)
	Total	7 (17%)	34 (83%)	41 (100%)

p=0,344

KPC		2016		
		POS	NEG	Total
2020	POS	0 (0%)	5 (12%)	5 (12%)
	NEG	3 (7,3%)	33 (80%)	36 (88%)
	Total	3 (7,3%)	38 (93%)	41 (100%)

p=0,727

RIVM

De zorg voor morgen begint vandaag