



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

# CPE uit de rioolwater surveillanc en het nationale CPE surveillanc programma;

Een vergelijking van volledige genomen



**CPE uit de rioolwater surveillance en het  
nationale CPE surveillance programma;**

Een vergelijking van volledige genomen

RIVM-briefrapport 2022-0247

## Colofon

© RIVM 2023

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](http://www.rivm.nl/toegankelijkheid).

DOI 10.21945/RIVM-2022-0247

H. Blaak (auteur), RIVM  
M.A. Kemper (auteur), RIVM  
S. Witteveen (auteur), RIVM  
A.P.A. Hendrickx (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](mailto: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](http://www.rivm.nl)

## Publiekssamenvatting

### **CPE uit de rioolwater surveillance en het nationale CPE surveillance programma**

Een vergelijking van volledige genomen

Carbapenemase-producerende Enterobacterales (CPE) zijn bacteriën die moeilijk met antibiotica zijn te behandelen. Om maatregelen te kunnen nemen, is het belangrijk dat we weten hoeveel CPE in Nederland voorkomen en waar. Daarom wordt bijgehouden hoe vaak en bij wie CPE worden gevonden in ziekenhuizen, verpleeghuizen of bij huisartsen. Ook wordt onderzocht welke eigenschappen deze CPE hebben. Dit heet het nationale CPE surveillance programma.

Maar niet iedereen die CPE bij zich draagt, wordt er ziek van of wordt hierop getest. Dus niet alle CPE worden via dit systeem gevonden. Daarom wordt ook in rioolwater gemeten of er CPE in zitten, de zogeheten rioolwatersurveillance. CPE zitten namelijk in de darmen en komen via de ontlasting in het rioolwater terecht. Zo kunnen ze ook worden opgemerkt als mensen ze ongemerkt in hun darmen hebben.

Het RIVM heeft nu onderzocht in hoeverre de CPE die in de surveillance bij mensen zijn gevonden, dezelfde varianten zijn als de CPE in de rioolwatersurveillance. Het heeft hiervoor de genen van CPE uit rioolwater van 76 rioolwaterzuiveringsinstallaties (RWZI's) vergeleken met de CPE die bij mensen zijn gevonden. Er blijken overeenkomsten en verschillen te zijn. De rioolwatersurveillance is daarom een nuttige aanvulling op het nationale surveillance programma. Samen geven de surveillances een completer beeld van de CPE in heel Nederland.

Soms bleken de CPE sterk genetisch verwant te zijn. Dit bevestigt dat er in rioolwater dezelfde CPE zitten die bij mensen zijn gevonden. Maar in het rioolwater zaten ook varianten van CPE die niet bij mensen waren gezien. Deze komen waarschijnlijk uit mensen die niet op CPE zijn getest in de surveillance van mensen.

Aan de andere kant waren er CPE-varianten die wel bij mensen zijn gevonden maar niet in het rioolwater. Dit kan meerdere oorzaken hebben. Voor een deel komt het omdat de onderzochte RWZI's op andere plekken in Nederland liggen dan de woonplaats of het ziekenhuis van de mensen die voor de humane surveillance zijn onderzocht. Het kan ook zijn dat de RWZI's veel eerder of later zijn onderzocht dan het moment waarop er een patiënt in die regio was. Een CPE is gemiddeld na een half jaar uit een mens verdwenen, en is dan niet meer terug te zien in de rioolwatersurveillance.

**Kernwoorden:** carbapenemases, CPE, rioolwater, RWZI, AWZI surveillance



## Synopsis

### **CPE from sewage-based surveillance and the national CPE surveillance programme**

A comparison of whole genomes

Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* (CPE) are bacteria that are difficult to treat with antimicrobials. Before we can take measures, we have to know where in the Netherlands CPE occur and at what levels. That is why records are being kept of how often CPE are found in patients in hospitals, nursing homes and at general practitioners, as well as characteristics of these patients. In addition, researchers are examining the genetic properties of these CPE. These efforts are part of the national CPE surveillance programme.

Not everyone who carries CPE becomes ill or is tested. Consequently, the system cannot detect all CPE. This is why additional research is being carried out to measure the presence of CPE in sewage. CPE live mainly in the intestines and enter the sewage system via human faeces. Sewage-based surveillance can thus detect if people are unknowingly carrying CPE in their intestinal tract.

RIVM has investigated whether the CPE variants detected in people are the same as those found in sewage. For this purpose it compared the genetic properties of the CPE variants found in sewage from 76 treatment plants with those of the CPE variants detected in people. This revealed both similarities and differences, which underscores the added value of carrying out sewage-based surveillance alongside the national surveillance programme. Taken in combination, these two surveillance efforts render a more complete picture of CPE throughout the Netherlands.

Some of the CPE showed strong genetic similarities, confirming that sewage contains CPE variants that are the same as those detected in people. However, in sewage CPE variants were also found that were not documented in people. These most likely come from people not tested as part of the national CPE surveillance programme.

The comparison also turned up CPE variants detected in people, that were not found in sewage. There are several possible explanations for this. One is that the investigated treatment plants are located in other parts of the country than the home or hospital addresses of people identified as part of the national CPE surveillance programme. Another possibility is that measurements at these treatment plants were carried out long before or after a patient was documented in that region. CPE normally disappear on their own after around six months, after which they are no longer detectable in sewage.

Keywords: carbapenemases, CPE, sewage, sewage treatment plants, wastewater treatment plant surveillance





## Inhoudsopgave

### **Samenvatting — 9**

#### **1 Introductie — 13**

- 1.1 Aanleiding — 13
- 1.2 Doel — 13
- 1.3 Aanpak — 14
- 1.4 Achtergrond — 15
  - 1.4.1 Klinische relevantie van CPE — 15
  - 1.4.2 De nationale CPE surveillance — 15
  - 1.4.3 CPE prevalentie in Nederland — 16
  - 1.4.4 Rioolwater surveillance — 16

#### **2 Materiaal en methoden — 19**

- 2.1 Herkomst rioolwater isolaten — 19
- 2.2 Herkomst humane isolaten — 19
- 2.3 *Whole genome sequencing* en wgMLST — 20
- 2.4 Geografische en temporele overeenkomst humane en rioolwater isolaten — 21
- 2.5 Data analyse — 22
- 2.6 Ethische verklaring — 23

#### **3 Resultaten — 25**

- 3.1 Vergelijking CPE typen en varianten in humane surveillance en rioolwater surveillance — 25
- 3.2 Geografische overeenkomsten tussen CPE detectie in rioolwater en in mensen — 28
- 3.3 Relatie tussen locatie en tijdstip van identificatie van dragers en de detectie van "humane CPE varianten" bij RWZI's — 31

#### **4 Discussie — 33**

- 4.1 Mate van overeenkomst van CPE in rioolwater met CPE dragers zoals bekend uit de humane surveillance — 33
- 4.2 Toegevoegde waarde van de rioolwatersurveillance ten opzichte van de humane surveillance — 35

#### **5 Conclusie — 37**

#### **6 Referenties — 39**

#### **7 Bijlage — 43**

- 7.1 Overzicht humane gevallen, PC4s en gekoppelde RWZI — 43
- 7.2 Herkomst humane en rioolwaterisolaten in gemengde clusters — 44
- 7.3 Resultaten binaire logistische analyse — 46



## Samenvatting

### *Achtergrond*

Metingen in rioolwater zijn zeer geschikt voor het onderzoeken van het vóórkomen in de bevolking van relatief zeldzame organismen die niet altijd gepaard gaan met ziekteverschijnselen. Dit geldt ook voor "bijzondere antibioticaresistente micro-organismen" (BRMOs), zoals carbapenemase-producerende Enterobacterales (CPE). Om temporele en geografische trends hierin te kunnen monitoren, worden rioolwatermetingen herhaaldelijk uitgevoerd bij een representatieve selectie van Nederlandse rioolwaterzuiveringsinstallaties (RWZI's) en afvalwaterzuiveringsinstallaties (AWZI's)<sup>1</sup>. In 2016 zijn door het RIVM de eerste verkennende metingen naar CPE in rioolwater gedaan. In 2020 en 2021 zijn vervolgmetingen uitgevoerd, waarvoor de selectie van bemonsteringslocaties geoptimaliseerd was met het oog op een doorlopende rioolwatersurveillance. CPE worden in Nederland ook gemonitord bij mensen, in het Nationale CPE Surveillance programma. Binnen het kader van dit programma worden CPE die in gezondheidszorginstellingen worden aangetroffen bij mensen die een infectie doormaken, of mensen die uit voorzorg worden gescreend op CPE dragerschap, geregistreerd en verder gekarakteriseerd. De resultaten van deze surveillance worden jaarlijks gerapporteerd (Nethmap, 2022).

### *Doel van het onderzoek en aanpak*

Eerder RIVM onderzoek liet zien dat rioolwatersurveillance een gevoelige methode is om de verspreiding van CPE en andere zeldzame "bijzonder resistente micro-organismen" (BRMO's) aan te tonen. De toegevoegde waarde van rioolwatersurveillance ten opzichte van bevolkingsonderzoek gebaseerd studies, is dat het ook "onopgemerkt dragerschap" op een efficiënte manier in kaart kan brengen. Dat wil zeggen, dragerschap bij mensen die niet in contact komen met de gezondheidszorg, omdat ze geen infectie doormaken of om andere redenen medische zorg nodig hebben en gescreend worden op CPE dragerschap. De verwachting is daarom dat rioolwatersurveillance een waardevolle aanvulling kan zijn op het nationale CPE surveillance programma. Het doel van het huidige onderzoek was om dit verder te onderbouwen door overeenkomsten en verschillen tussen beide vormen van surveillance te onderzoeken voor wat betreft de gedetecteerde CPE varianten en de geografische verspreiding. Hiervoor zijn de hele genomen (d.w.z. het DNA) van alle unieke varianten van het NDM- en KPC-type CPE die gevonden zijn in de rioolwatersurveillance van 2020 en 2021 (68 isolaten uit 29 RWZIs) vergeleken met de NDM- en KPC-type CPE die tussen 2018 en augustus 2022 zijn gevonden bij mensen in de humane surveillance (396 unieke isolaten afkomstig uit 353 personen). De mate van genetische verwantschap geeft informatie over de relatie tussen CPE uit mensen en uit het rioolwater. Om antwoord te krijgen op de vraag of er een correlatie is tussen het vinden van CPE in

<sup>1</sup> Afhankelijk van het beherende waterschap/hoogheemraadschap worden zuiveringsinstallaties aangeduid met rioolwater zuiveringsinstallatie (RWZI) of afvalwaterzuiveringsinstallatie (AWZI). In de rest van dit rapport wordt naar beide verwezen met de afkorting RWZI.

rioolwater en de aanwezigheid van bekende dragers, is daarnaast retrospectief onderzocht in hoe veel van de gevallen dat een persoon als drager werd gedetecteerd in de humane surveillance, het ziekenhuis of het huisadres aangesloten was op een in de surveillance geïncorporeerde RWZI, en binnen welk tijdsbestek de RWZI's bemonsterd waren ten opzichte van de detectie in de mens. Op deze manier kon worden bepaald voor welk deel van de CPE dragers er een redelijke kans was geweest om hun specifieke CPE variant(en) in de rioolwatersurveillance op te pikken. Deze analyse is gedaan aan de hand van de postcodes van ziekenhuizen en de 4 cijfers van postcodes (PC4) van de huisadressen van CPE dragers, en informatie over de verzorgingsgebieden van de RWZIs. Deze informatie is ook gebruikt om te bepalen wáár in de onderzoeksperiode in Nederland CPE werden gedetecteerd met beide typen surveillance, en de associatie te onderzoeken tussen de detectie van aan-humaan-verwante varianten bij RWZI's en de aanwezigheid van dragers in een gebied.

### *Resultaten*

Van 68 NDM- en KPC-positieve CPE isolaten afkomstig uit de rioolwatersurveillance, waren er 16 (24%) die een zeer grote genetische overeenkomst hadden met een of meer van de humane isolaten. In zeven (10%) van deze gevallen was het woonadres en/of de zorginstelling van de CPE drager in kwestie, gelegen in het verzorgingsgebied van de RWZI waar de CPE was aangetroffen.

Voor 224 van de 396 (57%) van de dragers lag het woonadres en/of de zorginstelling in het verzorgingsgebied van een in de rioolwatersurveillance onderzochte RWZI. Dit was het geval voor 42 van de 76 rioolwatersurveillance RWZI's. Dat wil zeggen dat alleen bij deze 42 RWZI's minstens op één moment tussen 2018 en augustus 2022 een bekende NDM- of KPC-drager aanwezig was in het verzorgingsgebied. In 28 (7,3%) van deze gevallen was de gekoppelde RWZI ook nog bemonsterd binnen 6 maanden voor of na de detectie in de drager. En in vier van deze gevallen (14%) werden daadwerkelijk genetische nauw verwante varianten bij de gekoppelde RWZI gevonden. Een associatie tussen de detectie van aan-humaan-verwante varianten in rioolwater en de aanwezigheid van bekende dragers in het RWZI verzorgingsgebied werd bevestigd door een multivariate statistische analyse. Een grote genetische overeenkomst op dezelfde plek en ongeveer op hetzelfde moment, kan betekenen dat de CPE die in het riool is aangetroffen afkomstig is van de in de humane surveillance geïdentificeerde persoon, of van mensen in de naaste omgeving van deze persoon, bijvoorbeeld huisgenoten of andere patiënten of medewerkers in dezelfde zorginstelling.

Behalve dat in rioolwater deels andere varianten werden gedetecteerd dan in de humane surveillance, werden ook CPE gevonden op locaties waar geen dragers waren gedetecteerd. Dit toont aan dat met behulp van rioolwatersurveillance ook CPE-gevallen kunnen worden opgespoord die onder de radar blijven van de humane surveillance.

### *Conclusie*

De bevindingen bevestigen dat CPE die in mensen circuleren in rioolwater aangetoond kunnen worden (en vice versa). Dit, en het feit dat ook andere CPE varianten worden gevonden en CPE op andere locaties worden gevonden dan in de humane surveillance, geeft aan dat rioolwatersurveillance een goede aanvulling is op het nationale CPE surveillance programma.



# 1 Introductie

## 1.1 Aanleiding

Metingen in rioolwater lijken zeer geschikt voor het monitoren van de verspreiding bij mensen van relatief zeldzame micro-organismen die niet altijd gepaard gaan met ziekte, zoals darmbacteriën met zeldzame vormen van antibioticaresistentie, waaronder carbapenemase-producerende Enterobacterales (CPE) (Blaak *et al.*, 2021; Blaak *et al.*, 2022). De reden hiervoor is dat met behulp van rioolwatermetingen zeer veel mensen tegelijk gescreend kunnen worden, op een eenvoudige en gevoelige manier. Omdat meer dan 99% van de Nederlandse bevolking op de riolering is aangesloten (Oosterom en Hermans, 2013), komen nagenoeg alle CPE die op enig moment in de bevolking aanwezig zijn met ontlasting in rioolwater terecht. Rioolwater biedt daarmee in principe een weergave van alle CPE die in de bevolking voorkomen. Indien monsterlocaties goed worden gekozen, vormen de CPE die tijdens de rioolwatersurveillance worden gevonden een representatieve steekproef van de CPE die aanwezig zijn in de gehele populatie. Dit is anders bij het nationale CPE surveillance programma, waarbij mensen worden onderzocht op de aanwezigheid van CPE in geval van een infectie, of bij een niet aan CPE-infectie gerelateerde ziekenhuisopname waarbij een reden is tot screening, bijvoorbeeld in het geval van verhoogde kans op dragerschap omdat iemand recent in een ander (binnen- of buitenlands) ziekenhuis opgenomen is geweest. Hoewel de CPE-dragers die in de humane CPE surveillance worden gedetecteerd dus zowel uit mensen bestaan die een infectie doormaken als asymptomatische dragers, gaat het in alle gevallen om mensen die in aanraking komen met de gezondheidszorg. In rioolwater komen daarnaast ook de CPE voor van dragers die buiten het blikveld van de gezondheidszorg blijven. Herhaaldelijke metingen in rioolwater in de vorm van rioolwatersurveillance geven een *unbiased* beeld van de geografische verspreiding van CPE over het land en is een graadmeter van de mate van dragerschap in de algemene bevolking, over de tijd.

De huidige studie bouwt verder op de eerdere bevindingen, door overeenkomsten en verschillen tussen CPE-varianten afkomstig uit de rioolwater en humane surveillance met elkaar te vergelijken. De verwachting is dat deze varianten deels, maar niet geheel, met elkaar overlappen, omdat beide vormen van surveillance een deels andere populatie in de bevolking weerspiegelen.

## 1.2 Doel

Het doel van het huidige onderzoek was om de conclusie uit eerder onderzoek te onderbouwen dat rioolwatersurveillance van CPE een waardevolle aanvulling is op het reeds geïmplementeerde nationale CPE surveillance programma. Dit is gedaan door de genetische verwantschap tussen CPE uit mensen en rioolwater vast te stellen en de relatie te onderzoeken tussen beide vormen van surveillance voor wat betreft de detectie van CPE. De specifieke onderzoeksvragen waren:

- 1) Wat is de mate van overeenkomst van CPE in rioolwater met CPE in dragers zoals bekend uit de humane surveillance – met andere woorden: vinden we in rioolwater varianten terug die circuleren in mensen, en is er een correlatie met bekende dragers in ruimte en tijd?
- 2) Wat is de toegevoegde waarde van de rioolwatersurveillance ten opzichte van de humane surveillance - met andere woorden: geeft de rioolwatersurveillance ook extra informatie over diversiteit aan varianten en de geografische verspreiding van CPE over het land?

### 1.3 Aanpak

In het kader van de rioolwatersurveillance zijn in 2020 76 RWZI's eenmalig bemonsterd en onderzocht op de aanwezigheid van CPE (Blaak *et al.*, 2022). Deze 76 RWZI's zuiveren gezamenlijk het afvalwater van 7,5 miljoen Nederlanders, oftewel 43% van de bevolking. Vanwege hun ligging door het hele land en de gelijkwaardige verdeling over provincies worden deze RWZI's daarmee representatief verondersteld voor de hele bevolking. Daarnaast zijn in 2020 en 2021 herhaaldelijk metingen gedaan bij 12 RWZI's die verantwoordelijk zijn voor de zuivering van (een deel van) het rioolwater van de provinciehoofdsteden. Een deel van de CPE isolaten die in 2020 en 2021 zijn verkregen uit de rioolwatermetingen zijn geanalyseerd met behulp van "whole genome sequencing" (WGS), een techniek waarbij het volledige genoom (dus al het DNA) in kaart wordt gebracht. Dit is vergeleken met het genoom van CPE isolaten afkomstig uit de nationale CPE surveillance in de periode 2018 tot augustus 2022. De periode van de humane surveillance is ruimer genomen dan de duur van de rioolwatersurveillance-metingen, met het idee dat CPE varianten mogelijk langer in rioolwater gedetecteerd kunnen worden dan het moment van detectie in een mens, omdat mensen langer drager kunnen blijven of de CPE kunnen verspreiden in hun omgeving (van Hattem *et al.*, 2016). Omdat om kostentechnische redenen niet alle uit afvalwater geïsoleerde CPE isolaten geanalyseerd kunnen worden met WGS, is een keuze gemaakt voor twee typen CPE: de KPC- en de NDM-typen. Deze typen behoren tot de meest zeldzame in Nederland, maar ook de klinisch meest relevante typen CPE.

Om antwoord te krijgen op de vraag of er een correlatie is tussen het vinden van CPE in rioolwater en de aanwezigheid van bekende dragers, is met terugwerkende kracht onderzocht bij hoeveel van de NDM- of KPC-dragers in de humane surveillance, het ziekenhuis of het huisadres het afvalwater loosde op een in de surveillance geïncorporeerde RWZI, en binnen welk tijdsbestek. Op deze manier kon worden bepaald bij welk deel van de dragers er een redelijke kans was geweest om hun specifieke variant in de rioolwatersurveillance op te pikken, en hoe vaak een dergelijke variant ook was gevonden op de juiste plek. Deze analyse is gedaan aan de hand van de postcodes van ziekenhuizen en de 4 cijfers van postcodes (PC4) van de huisadressen van CPE dragers, en informatie over de verzorgingskringen van de RWZI's. Aan de hand van deze data kon tevens bepaald worden waar CPE wel in de rioolwatersurveillance maar niet in de humane surveillance waren gevonden.



## 1.4 Achtergrond

### 1.4.1 *Klinische relevantie van CPE*

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 en Paterson, 2015; Tzouveleki *et al.*, 2014). Infecties met CPE worden daarom gezien als een belangrijke bedreiging voor de volksgezondheid wereldwijd (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 *Escherichia coli* en *Klebsiella pneumoniae*. Carbapenemases zijn onderverdeeld in drie klassen, de klasse A (o.a. GES, KPC), klasse B (o.a. de metallo- $\beta$ -lactamases, zoals NDM, VIM en IMP) en de klasse D carbapenemases (OXA-48 en OXA-48-achtige carbapenemases). De mate van resistentie tegen  $\beta$ -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 (multi-) resistenties tegen andere antibiotica (Lee *et al.*, 2022).

Carbapenem resistentie komt 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 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 en in mindere mate bij mensen met een normale afweer, kunnen ook relatief onschuldige Enterobacterales tot infectie leiden. Daarnaast kan dragerschap bijdragen tot een verdere verspreiding van CPE binnen de gemeenschap, waardoor ook de kans toeneemt dat kwetsbare personen blootgesteld worden.

### 1.4.2 *De nationale CPE surveillance*

De nationale 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. Gegevens over resistentie van isolaten uit ziekenhuizen, huisartsenpraktijken en verpleeghuizen worden zo verzameld. Middels Type-Ned wordt surveillance uitgevoerd naar BRMOs, waaronder CPE. Deelnemende medisch microbiologische laboratoria kunnen isolaten naar het RIVM sturen, waar deze worden getypeerd door middel van onder

andere WGS. De CPE isolaten die via ISIS-AR en Type-Ned worden geïdentificeerd en gekarakteriseerd, zijn deels afkomstig uit mensen die een infectie met CPE hebben doorgemaakt (bijvoorbeeld urineweginfecties, bloedvergiftiging), en deels uit asymptomatische dragers die vanwege een verhoogd risico op dragerschap werden gescreend, bijvoorbeeld bij opname in een ziekenhuis. Daarnaast is in Nederland voor CPE sprake van een meldingsplicht groep C, waarbij aanvullende epidemiologische gegevens worden gemeld en geanalyseerd van personen bij wie voor het eerst kolonisatie of infectie met een CPE wordt vastgesteld. De resultaten van deze surveillance worden jaarlijks gepubliceerd in een rapportage (Nethmap, 2022) welke te vinden is op de webpagina van het RIVM.

#### 1.4.3 *CPE prevalentie in Nederland*

De prevalentie van CPE is in Nederland nog altijd laag, waarbij de COVID-19 pandemie mogelijk ook nog een verlagend effect heeft gehad in 2020 en 2021 (Nethmap, 2022). Vlak vóór de pandemie, in 2019, had 0,7% van alle klinische *E. coli* en *K. pneumoniae* isolaten, die in Nederland zijn onderzocht op carbapenem gevoeligheid en geregistreerd waren in ISIS-AR, een verhoogde ongevoeligheid voor carbapenems (Nethmap, 2020). De lage prevalentie van CPE die dit cijfer suggereert wordt bevestigd door studies uitgevoerd tussen 2011 en 2016 naar ESBL en CPE dragerschap in de Nederlandse bevolking, waar bij van de in totaal ongeveer 4400 onderzochte personen, slechts één CPE-drager werd gevonden (Reuland *et al.*, 2016; 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 en 2020 (Blaak *et al.*, 2021; Blaak *et al.*, 2022). In die metingen bleken de totale aantallen CPE in rioolwater 2 log-units lager te zijn dan de totale ESBL-EC aantallen. Uitgaande van een ESBL prevalentie van 5% in Nederland, gemeten in de periode 2014 tot 2016 (van den Bunt *et al.*, 2019), en aannemende dat asymptomatische CPE dragers evenveel CPE bacteriën in hun ontlasting hebben als ESBL-dragers ESBL bacteriën, werd de CPE prevalentie in 2016 en 2020 geschat op ongeveer 0,02% en 0,05%, respectievelijk (Blaak *et al.*, 2021; Blaak *et al.*, 2022).

#### 1.4.4 *Rioolwater surveillance*

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 de mate van verontreiniging 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. 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 en 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 311 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 COVID-19 pandemie is rioolwatersurveillance een waardevolle aanvulling gebleken op de gegevens over aantallen en percentages SARS-CoV-2-positieve testen. Ruim voor die tijd, 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). In 2020 en 2021 zijn de monsterlocaties geoptimaliseerd met het oog op doorlopende surveillance doeleinden en is een tweede reeks metingen uitgevoerd (Blaak *et al.*, 2022).

Ook in de internationale wetenschappelijke AMR gemeenschap wordt rioolwatersurveillance 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 en 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 rioolwatersurveillance op het gebied van ABR variëren van het inventariseren van complete populaties van micro-organismen ("microbiomen") en hun resistenties ("resistomen") door middel van WGS (Aarestrup en 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).



## 2 Materiaal en methoden

### 2.1 Herkomst rioolwater isolaten

CPE isolaten werden geïsoleerd uit RWZI influent bemonsterd als onderdeel van de rioolwatersurveillance metingen in 2020 en 2021 (Blaak *et al.*, 2022). Hiervoor waren 64 RWZI's eenmalig bemonsterd in 2020 en 12 provinciehoofdstad RWZI's meerdere malen bemonsterd gedurende 2020 en 2021 (Blaak *et al.*, 2022).

De rioolwatermonsters werden gefiltreerd door een filtermembraan met een 0.45 µm porie grootte (Millipore, Darmstadt, Duitsland). Voor de isolatie van NDM- en KPC-typen CPE werden deze filters geplaatst op ChromID CARBA agar (Biomerieux, Zaltbommel, Nederland), een agar wat selectief is voor deze typen CPE, en 4 tot 5 uur geïncubeerd bij 36±1°C gevolgd door 21±3 h bij 44±0.5°C. Na incubatie zijn de carbapenem-resistente Enterobacterales herkenbaar als roze (*E. coli*) en blauwe (*Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp.) kolonies. Per monster werden maximaal 16 kolonies (8 roze, 8 blauwe) reïngestreekt. Deze isolaten werden vervolgens op soort of genus getypeerd met MALDI-TOF MS (Bruker, Leiderdorp, Nederland) en getest op de aanwezigheid van een carbapenemasegen die codeert voor een KPC- of NDM-carbapenemase (*bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>NDM</sub>) door middel van PCR.

Vier CPE typen werden geselecteerd voor WGS analyse: 1) *bla*<sub>NDM</sub>-positieve *E. coli*, 2) *bla*<sub>NDM</sub>-positieve *K. pneumoniae* complex (*K. pneumoniae*, *K. variicola* of *K. quasipneumoniae*), 3) *bla*<sub>KPC</sub>-positieve *E. coli* of 4) *bla*<sub>KPC</sub>-positieve *K. pneumoniae* complex. Van elke RWZI waar een of meer van deze vier CPE typen waren gevonden (n=29), werden de isolaten geanalyseerd door middel van WGS analyse. Voor de longitudinaal bemonsterde RWZI's is voor elk CPE type alleen het eerste monster gebruikt waarin het type was gevonden. Per monster en per CPE type werden alle isolaten gesequenced, tot een maximum van vijf. Indien in een monster meer dan vijf van eenzelfde CPE type waren geïsoleerd werden er random 5 gekozen. In totaal zijn er 170 isolaten gesequenced: 97 NDM-*E. coli* (afkomstig van 23 RWZI's), 31 KPC-*K. pneumoniae* (afkomstig van 10 RWZI's), 25 NDM-*K. pneumoniae* (afkomstig van 9 RWZI's) en 17 KPC-*E. coli* (afkomstig van 5 RWZI's).

### 2.2 Herkomst humane isolaten

Voor het nationale CPE surveillance programma sturen medische microbiologische labs routinematig Enterobacterales isolaten met een meropenem "minimum inhibitory concentration" (MIC) van >0.25 mg/L en/of een imipenem MIC van >1 mg/L, of met een genotypisch bewijs van carbapenemase productie (d.w.z. aanwezigheid van een carbapenemase gen aangetoond d.m.v. PCR), of met een fenotypisch bewijs van carbapenemase productie (d.w.z. carbapenemase activiteit is aangetoond), naar het RIVM.

In het RIVM worden deze isolaten gekarakteriseerd door middel van WGS. In de huidige studie zijn alle *E. coli* en *K. pneumoniae* complex isolaten geïncubeerd die zijn ingestuurd door een Nederlands MML vanaf januari 2018 tot en met augustus 2022, waarin een NDM- of KPC-

gen was aangetoond. In gevallen waar meerdere isolaten per patiënt waren ingestuurd werd één isolaat per bacteriesoort, carbapenemase allel en 7-loci ST combinatie per jaar geïncludeerd. In totaal zijn 396 isolaten geïncludeerd (164 *E. coli* en 232 *K. pneumoniae*), afkomstig van 353 personen. Zevenendertig personen hadden meerdere entries in de database. Dit was het geval als een persoon verschillende typen CPE had gehad (bijvoorbeeld een *E. coli* en een *K. pneumoniae*, of CPE met verschillende carbapenemase-allelen), of als hij/zij in verschillende jaren als drager was gedetecteerd. Meerdere entries van eenzelfde persoon kunnen daarom gezien worden als dragerschap van een ander type CPE, of als dragerschap op een andere moment. De meeste analyses in deze rapportage zijn op het niveau van "drager" gedaan, waarbij een drager is gedefinieerd als iemand waarvan op een bepaald moment een bepaalde CPE type is geregistreerd in de humane surveillance. Eenzelfde persoon kan daarmee dus twee (of meer) afzonderlijke keren als drager zijn geteld. Omdat er één variant per persoon per jaar was geïncludeerd was er sprake van evenveel dragers als isolaten: 396.

Bij 301 dragers (76%) was de inzender van de kweek een ziekenhuis, bij 72 (18%) een huisartspraktijk en bij 14 (3,5%) een verpleeghuis of zorgcentrum. In de overige gevallen was de ingevoerde inzender een niet nader gespecificeerde kliniek/praktijk/behandelcentrum (1,0%), een revalidatiecentrum (1,0%), een gezondheidsdienst (0,5%) of "thuissituatie" (0,2%). De kweken waren grotendeels afkomstig van rectum-, perineum- of periaanaal swabs (65% tot 69%; niet helemaal duidelijk omdat soms is ingevuld: "swab van keel en/of neus en/of perineum") of urine (18%). Andere matrices waren o.a. neus- of keel swabs (3,8 % tot 7,8%), wondvocht, wonduitstrijk of pus (3,3%) en bloed (1,3%). Bij 105 (33%) van de gevallen dat de inzender een ziekenhuis of een verpleeghuis/zorgcentrum was, is in een vragenlijst de locatie van kweekafname ingevuld: thuis (5,7%), poliklinisch (30%), klinisch (50%), intensive care (11%), of onbekend (1,9%).

### 2.3 **Whole genome sequencing en wgMLST**

De *E. coli* en *K. pneumoniae* complex isolaten uit personen (n= 396) en uit rioolwater (n= 170) zijn geanalyseerd met behulp van WGS, gebruik makend van de Illumina HiSeq 2500. De verkregen rioolwater sequenties zijn in eerste instantie geassembleerd en de genen geannoteerd, gebruikmakend van de zogenaamde "calculation engine" binnen Bionumerics v7.6.3 software (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, België). Gebruikmakend van dezelfde software is de genetische opmaak van de isolaten onderling vergeleken door middel van een cgMLST ("core genome multi-locus sequence typing") analyse, volgens het Enterobase schema (Zhou *et al.*, 2020). Hierbij worden voor *E. coli* 2315 genen vergeleken en voor *K. pneumoniae* 634. Deze analyse was uitgevoerd om "kopie-isolaten" te identificeren, dat wil zeggen isolaten uit één monster die waarschijnlijk uit dezelfde bron komen. Wanneer isolaten uit één monster minder dan 0,5% verschil hadden, dan is van deze isolaten één isolaat random gekozen voor de vergelijking met de humane isolaten. Daarmee vielen 94 van de 170 rioolwater isolaten af en zijn er in totaal 68 "unieke" isolaten (d.w.z., unieke isolaat-monster combinaties) geïncludeerd voor de vergelijkende analyse: 45 *E. coli* en

23 *K. pneumoniae*, gezamenlijk afkomstig uit 38 monsters van 29 RWZI's (22 RWZI's met 1 monster, 7 RWZI's met 2 of 3 monsters).

De sequenties van de geïncubeerde rioolwater isolaten zijn vervolgens opnieuw verwerkt volgens dezelfde methode als de humane sequenties, waarbij gebruik werd gemaakt van Unicycler v0.4.4 software voor het assembleren, Prokka v1.14.6 software voor de annotatie van de voorspelde genen en SeqSphere software version 6.0.2 (Ridom GmbH, Münster, Germany). Een wgMLST analyse werd uitgevoerd volgens in-house ontwikkelde wgMLST schema's (Hendrickx *et al.*, 2021) en met behulp van BioNumerics v7.6.3 zijn "minimum spanning trees" (MST) gemaakt om de onderlinge verwantschap tussen isolaten te visualiseren. Clusters van isolaten met zeer hoge mate van genetische overeenkomst zijn geïdentificeerd en gedefinieerd als varianten met verschillen in minder dan 25 van de 4503 genen voor *E. coli* (0,6%) en minder dan 20 van de 4978 *K. pneumoniae* complex (0,4%).

## **2.4 Geografische en temporele overeenkomst humane en rioolwater isolaten**

Gebaseerd op de PC4s van de thuisadressen van de 396 CPE-dragers en waar van toepassing van de insturende zorginstelling (ziekenhuis of verpleeghuis), is achteraf uitgezocht of instellingen en/of thuisadressen aangesloten waren op het riool in de verzorgingskringen van de in de rioolwatersurveillance onderzochte RWZI's.

Voor het koppelen van PC4 aan RWZI's is gebruik gemaakt van openbare gegevens van het CBS (CBS, 2021). In sommige gevallen vallen verschillende delen van een PC4 gebied binnen de verzorgingsgebieden van verschillende RWZI's, of is van een deel van het gebied niet bekend aan welke RWZI dit gekoppeld is. Wanneer dit het geval was bij de PC4 van een instelling is de gekoppelde RWZI geïdentificeerd gebaseerd op de volledige postcode; deze informatie is verstrekt door het CBS via persoonlijke communicatie. Wanneer dit het geval was bij de PC4 van een adres, is aangenomen dat de gekoppelde RWZI de RWZI was waar minstens 75% van de inwoners van het PC4 gebied op aangesloten is. In enkele gevallen was op deze manier geen RWZI toe te kennen, namelijk wanneer het aandeel van de RWZI met het grootste aandeel binnen een PC4 gebied minder was dan 75%.

Voor 394 van de 396 dragers was een PC4 bekend van het huisadres van de persoon, waarvan 389 gekoppeld konden worden aan een RWZI (waarvan 310 een 100% match hadden volgens de CBS data en 79 een match met meer dan 75% waarschijnlijkheid). In 316 gevallen was de kweek ingezonden door een ziekenhuis (n=302) of verpleeghuis (n=14). In 310 van deze gevallen was de naam en PC4 of postcode van de instelling bekend en kon de instelling aan een RWZI gekoppeld worden. In totaal waren er 393 dragers waar aan het huisadres en/of aan de instelling een RWZI gekoppeld kon worden (83 alleen via huisadres, 4 alleen via instelling, 306 zowel via huisadres als via instelling). Waar sprake was van een koppeling via huisadres én instelling betrof dit in 169 van de gevallen een andere RWZI; in deze gevallen werden de dragers dus gekoppeld aan twee RWZI's.

Voor elke drager waar een RWZI gekoppeld kon worden aan het huisadres en/of aan de instelling, is vervolgens bepaald hoe vaak de RWZI('s) was (waren) bemonsterd binnen het kader van de rioolwater surveillance, én hoe vaak binnen een half jaar voor of na de isolatie van de CPE van de persoon. Deze periode is gebaseerd op de duur van dragerschap van ESBL-producerende Enterobacterales: de mediane duur daarvan is 2 maanden en ongeveer driekwart van de dragers raken hun ESBL kwijt gedurende de eerste 6 maanden (Ling *et al.*, 2022). Indien een drager gekoppeld was aan twee RWZIs werd dit voor beide RWZIs apart bepaald, indien deze op een andere datum waren bemonsterd.

## 2.5 Data analyse

De NDM- en KPC-isolaten afkomstig uit de beide typen surveillance zijn vergeleken voor wat betreft het type, gebaseerd op allel en bacteriële soort, en het voorkomen van genetische varianten. Overeenkomsten en verschillen in de frequentie van voorkomen van bacteriesoort en specifieke allelen zijn statistisch getoetst door middel van de Pearson chi-square test. Clusters van genetisch sterk met elkaar overeenkomende varianten in rioolwater en mensen zijn geïdentificeerd, en het aandeel van rioolwater-isolaten en humane isolaten in deze clusters bepaald. De geografische verspreiding van dragers van NDM- en KPC-type CPE, surveillance RWZI's en RWZI's waar NDM- en KPC-type CPE zijn gedetecteerd is gevisualiseerd met behulp van ArcMap 1081 (versie 10.8.1).

Met behulp van binaire logistische regressie analyse is de associatie onderzocht tussen de detectie van sterk op humaan gelijkende varianten in rioolwater, en de aanwezigheid van dragers in het verzorgingsgebied (d.w.z., personen waarvan bekend is dat ze minstens enige tijd drager zijn geweest en gebaseerd op PC4 was geconcludeerd dat ze in het gebied woonden of in een instelling aanwezig waren geweest). De afhankelijke variabele in deze analyse was de aan- of afwezigheid van een sterk op een humane variant gelijkende CPE variant bij RWZI's. De onafhankelijke variabelen waren het aantal bekende dragers, het totaal aantal inwoners, de aan- of afwezigheid van een ziekenhuis in het verzorgingsgebied, en het aantal monsters dat bij de RWZI's was genomen (wat óf 1x was óf 10 of 11x). Het totaal aantal inwoners en de aanwezigheid van ziekenhuizen waren meegenomen in de analyse, omdat eerder onderzoek had aangetoond dat deze variabelen geassocieerd zijn met de aanwezigheid van CPE bij RWZI's (Blaak *et al.*, 2021).

Daarnaast is bepaald voor hoeveel van de dragers die via woonadres of instelling waren gekoppeld aan een surveillance RWZI én die als drager waren geïdentificeerd binnen 6 maanden voor of na de rioolwatermonster-name, een zeer vergelijkbare variant is teruggevonden in rioolwater op dezelfde locatie. Of deze (enigszins arbitrair) gekozen periode van 6 maanden ook werkelijk geassocieerd is met het meer of minder vinden van nauw verwante varianten in rioolwater, is onderzocht met de Chi-square test.

Alle statistische analyses zijn uitgevoerd met SPSS versie (28.0.1.1).



## **2.6 Ethische verklaring**

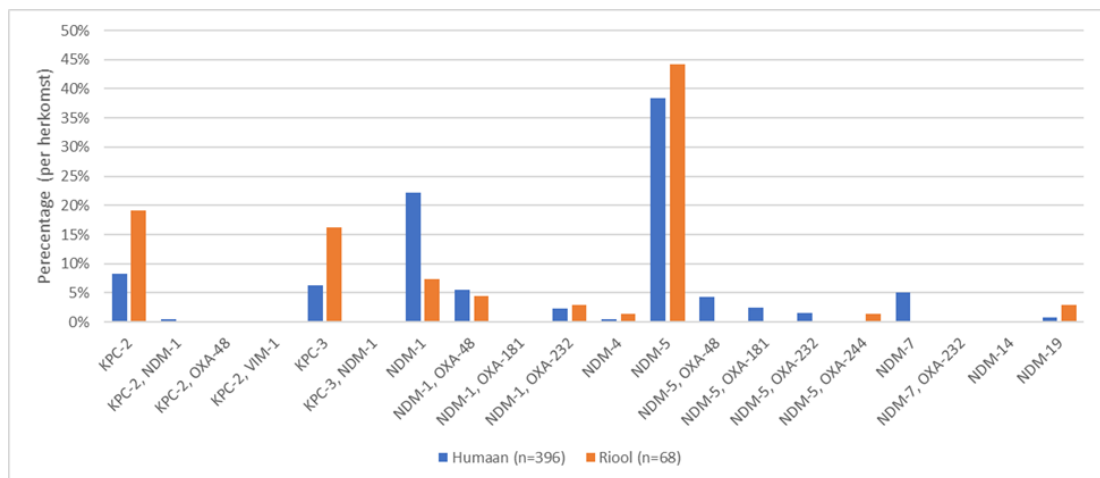
De humane isolaten zijn eigendom van de medisch microbiologische laboratoria die deelnemen aan het nationale CPE surveillance programma. De persoonlijke gegevens (PC4, geslacht, leeftijd) in de humane surveillance database zijn gepseudominiseerd. De verwerkte data zijn niet herleidbaar naar de personen. Volgens de Wet medisch-wetenschappelijk onderzoek met mensen (WMO) is de studie vrijgesteld van beoordeling door een medisch-ethische toetsingscommissie (METC).



## 3 Resultaten

### 3.1 Vergelijking CPE typen en varianten in humane surveillance en rioolwater surveillance

Onder de 396 humane isolaten was 59% *K. pneumoniae* complex en 41% *E. coli*. Bij de rioolwater isolaten was de verhouding andersom: 66% *E. coli* en 34% *K. pneumoniae* complex. Dit verschil was statistisch significant ( $p < 0,001$ , Pearson Chi-square test). Hoewel in beide typen van surveillance dezelfde allelen dominant waren ( $bla_{KPC-2}$ ,  $bla_{KPC-3}$ ,  $bla_{NDM-1}$  en  $bla_{NDM-5}$ ), waren er wel verschillen in de frequentie waarmee deze allelen werden gevonden. In beide typen surveillance waren  $bla_{NDM-5}$ -positieve CPE het meest frequent gedetecteerde type: respectievelijk 47% en 46% van de humane en rioolwater isolaten had dit allel ( $p = 0,833$ , Pearson Chi-square test) (Figuur 3-1). Daarentegen was het aandeel  $bla_{NDM-1}$  positieve CPE groter in de humane surveillance (31% vs. 15% van de rioolwaterisolaten;  $p = 0,006$ , Pearson Chi-square test) en het aandeel  $bla_{KPC-2}$ -positieve isolaten en  $bla_{KPC-3}$ -positieve isolaten kleiner in de humane surveillance (respectievelijk: 9,3% vs. 19%;  $p = 0,016$  en 6,6 en 16%;  $p = 0,007$ , Pearson Chi-square test).



Figuur 3-1 Percentages CPE-typen gevonden in de humane en rioolwatersurveillance. Weergegeven is het aandeel van elk CPE-type uitgedrukt per het totaal aantal isolaten per herkomst (d.w.z. 396 voor humane surveillance en 68 voor rioolwatersurveillance).

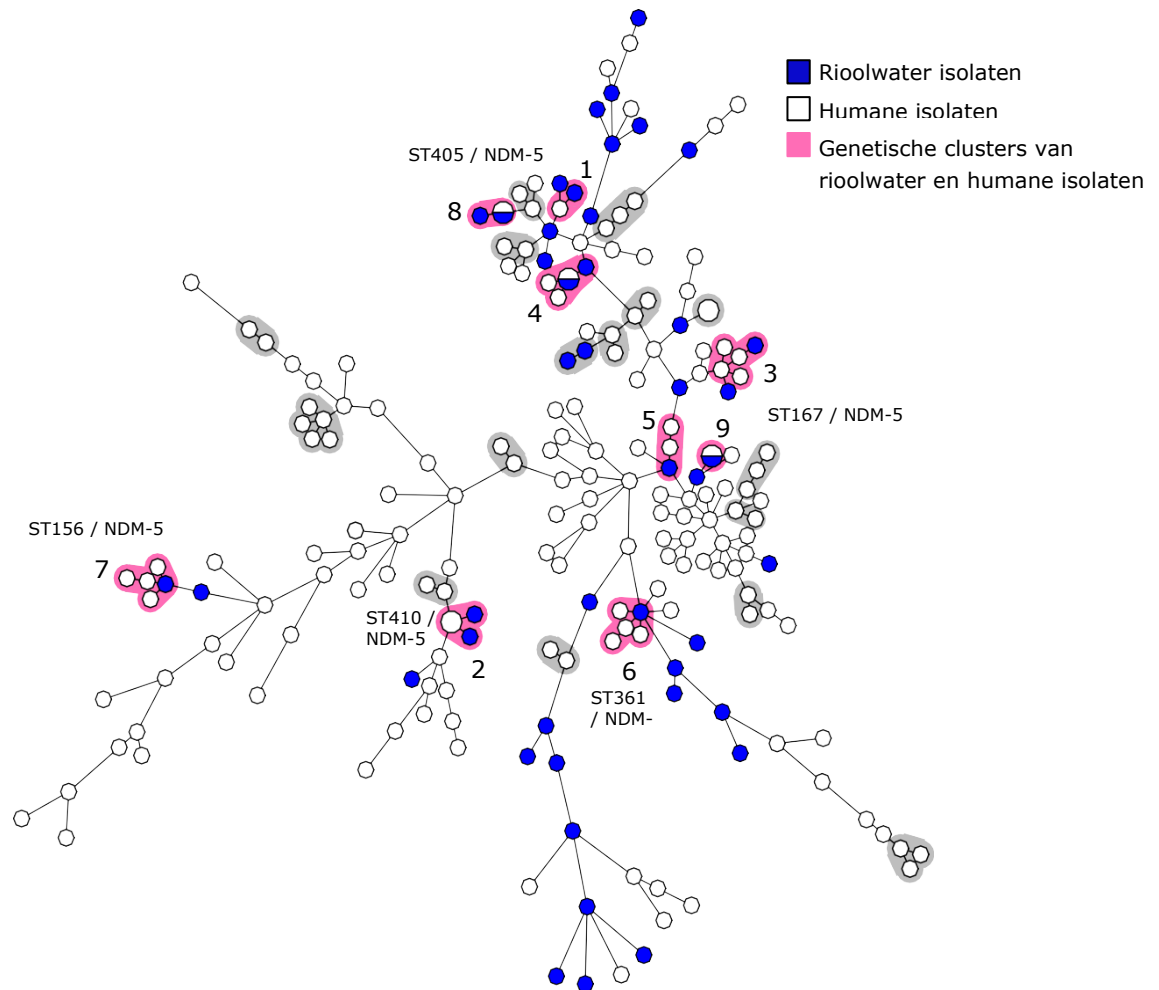
Opsplitsen naar bacteriesoort liet zien dat  $bla_{NDM-1}$  vaker voorkwam bij *K. pneumoniae* dan bij *E. coli* in beide typen surveillance, en dat bij beide bacteriesoorten de prevalentie van dit allel hoger was in de humane surveillance dan in rioolwater (Tabel 3-1). Ook  $bla_{KPC}$  kwam in het algemeen vaker voor bij *K. pneumoniae* dan bij *E. coli*. Hoewel dit gen bij beide bacteriesoorten vaker werd aangetroffen in de rioolwater surveillance dan bij de humane surveillance, was vooral het tienvoudige verschil in de frequentie bij *E. coli* opvallend (respectievelijk 24% en 2.4% van de *E. coli*, vergeleken met respectievelijk 57% en 25% van de *K. pneumoniae*). Het  $bla_{NDM-5}$  allel kwam in beide typen surveillance meer voor bij *E. coli*.

Tabel 3-1 Aantallen en percentages van de meest voorkomende carbapenemase allelen per bacteriesoort en per type surveillance.

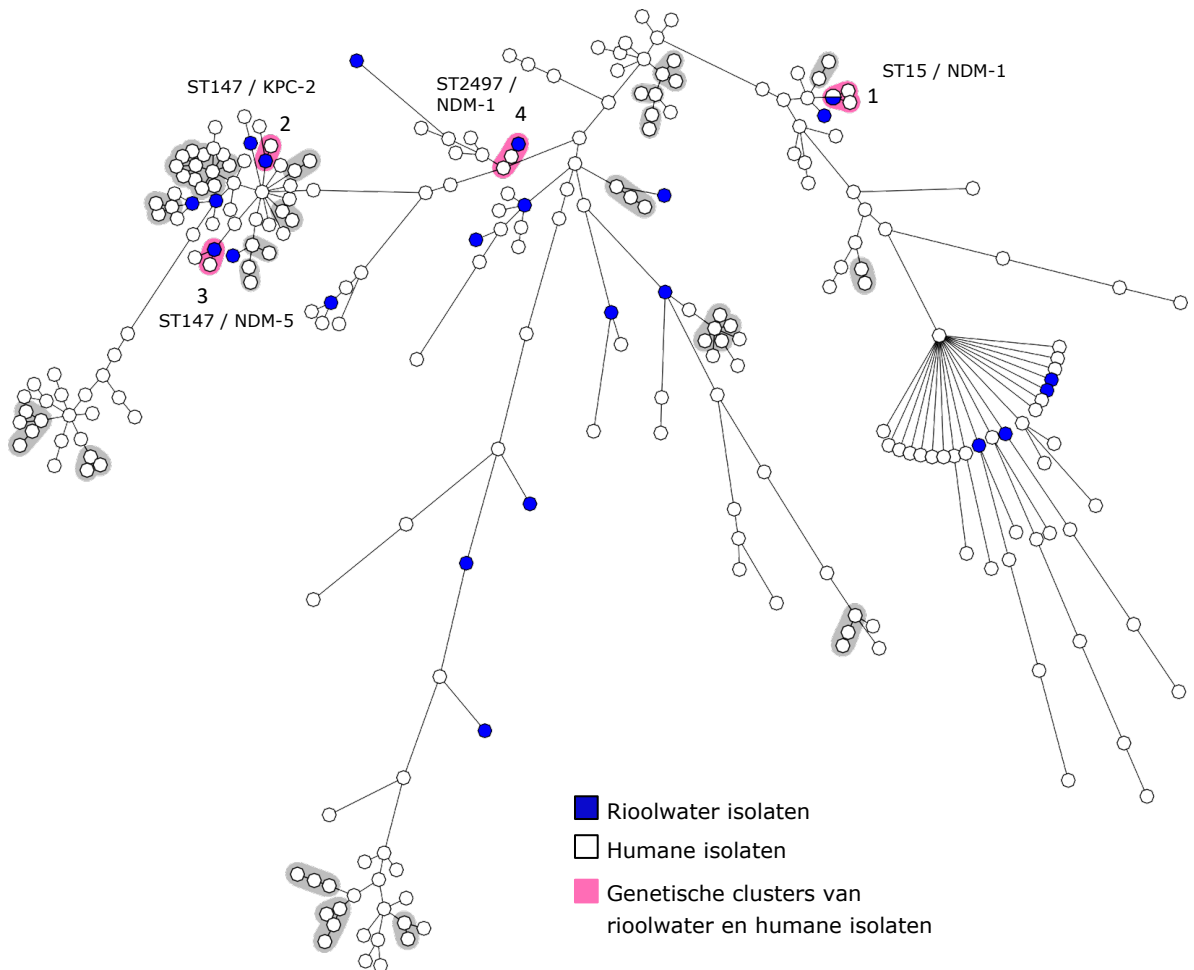
	Humaan	Rioolwater
<i>E. coli</i>	164	45
<i>bla</i> <sub>KPC</sub>	4 (2,4%)	11 (24%)
<i>bla</i> <sub>NDM-1</sub>	14 (8,5%)	2 (4,4%)
<i>bla</i> <sub>NDM-5</sub>	133 (81%)	29 (64%)
<i>bla</i> <sub>KPC</sub> , <i>bla</i> <sub>NDM-1</sub> , <i>bla</i> <sub>NDM-5</sub> totaal	151	42
	Humaan	Rioolwater
<i>K. pneumoniae</i>	232	23
<i>bla</i> <sub>KPC</sub>	59 (25%)	13 (57%)
<i>bla</i> <sub>NDM-1</sub>	108 (47%)	8 (35%)
<i>bla</i> <sub>NDM-5</sub>	53 (23%)	2 (8,7%)
<i>bla</i> <sub>KPC</sub> , <i>bla</i> <sub>NDM-1</sub> , <i>bla</i> <sub>NDM-5</sub> totaal	220	23

De genetische verwantschap van de rioolwater en humane isolaten is geanalyseerd door middel van een zogenaamde wgMLST analyse, waarbij een groot aantal genen worden vergeleken. Dit is voor *E. coli* en *K. pneumoniae* beide gevisualiseerd in een zogenaamde minimal spanning tree (MST) (Figuur 3-2 en Figuur 3-3). In deze MST is elk bolletje een isolaat, en hoe dichter 2 cirkels bij elkaar liggen, hoe meer de wgMLST varianten op elkaar lijken. De rioolwaterisolaten zaten verspreid tussen de humane isolaten in de boom, wat aangeeft dat er geen specifieke humane of specifieke rioolwater varianten bestaan. Wel is er in de *E. coli* boom één tak te zien met relatief weinig rioolwater isolaten erin vergeleken met de andere twee takken.

In totaal werden 13 clusters van genetisch zeer nauw verwante isolaten gevonden (minder dan 25 en 20 genen verschil voor respectievelijk *E. coli* en *K. pneumoniae*), met daarin minstens één humane en één rioolwater isolaat: negen *E. coli* en vier *K. pneumoniae* clusters. Van de 68 unieke rioolwater NDM- en KPC-varianten die tijdens de rioolwatersurveillance waren gevonden, zaten er 16 (24%) in een van deze gemengde clusters. Van de 396 humane NDM- en KPC-isolaten zaten er 29 (7,3%) in een van deze gemengde clusters.



*Figuur 3-2 Een MST gebaseerd op wgMLST van E. coli isolaten uit afvalwater en mensen. In blauw zijn de rioolwater isolaten weergegeven en in wit de humane isolaten. Genetische clusters zijn met roze (rioolwater en humaan) of grijze (alleen humaan) omkadering weergegeven. Isolaten in een cluster hebben onderling maximaal 25 genen verschil. Voor de gemengde clusters is het klassieke multi locus sequence type (ST, gebaseerd op zeven huishoudgenen) en het carbapenemase allel weergegeven. De grootte van de cirkels geven het aantal isolaten per type weer (meestal 1).*



*Figuur 3-3 Een MST gebaseerd op wgMLST van *K. pneumoniae* complex isolaten uit afvalwater en mensen. In blauw zijn de afvalwater isolaten weergegeven en in wit de humane isolaten. Genetische clusters zijn met roze (rioolwater en humaan) of grijze (alleen humaan) omkadering weergegeven. Isolaten in een cluster hebben onderling maximaal 20 genen verschil. Voor de gemengde clusters is het klassieke multi locus sequence type (ST) en het carbapenemase-allel weergegeven. De grootte van de cirkels geven het aantal isolaten per type weer (meestal 1).*

### 3.2 Geografische overeenkomsten tussen CPE detectie in rioolwater en in mensen

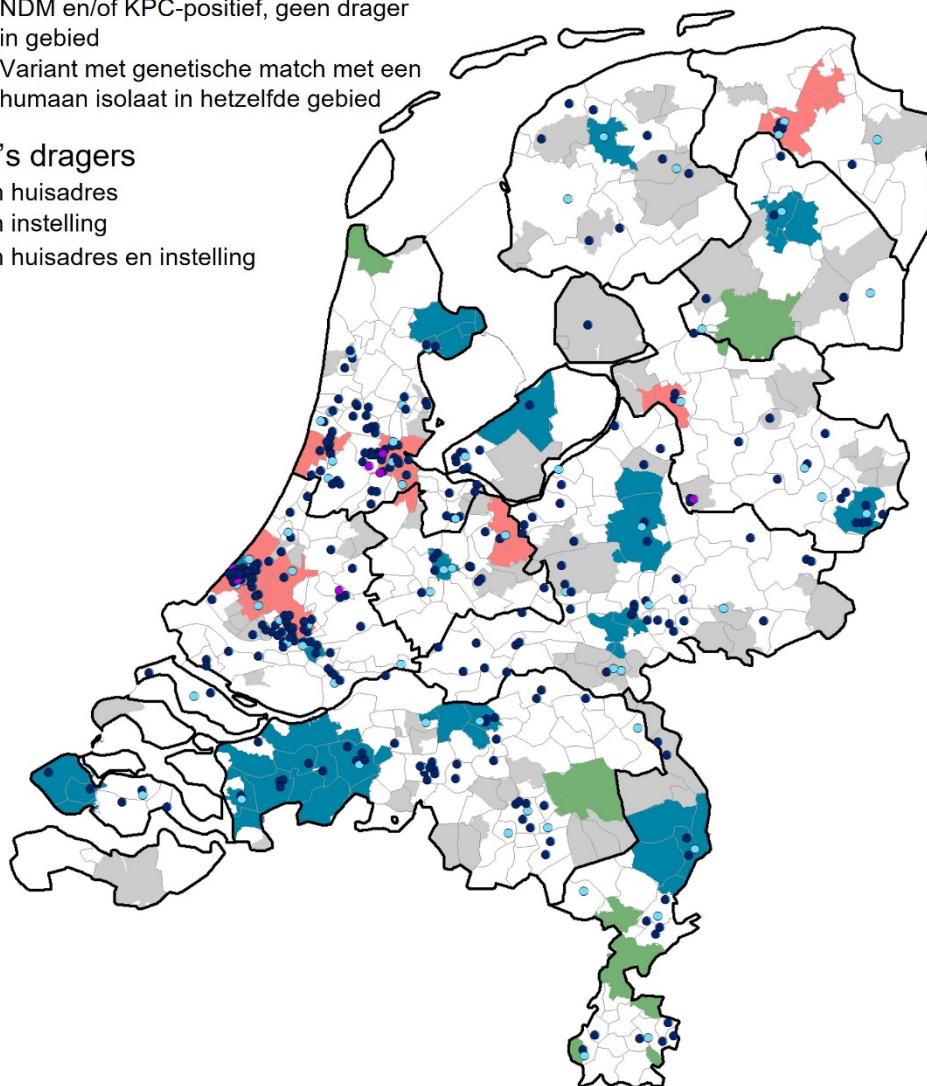
In totaal konden 393 van de 396 dragers aan een of twee RWZI's gekoppeld worden, gebaseerd op de PC4 van het huisadres en/of de postcode van de instelling waar de persoon had verbleven, gezamenlijk resulterend in 357 verschillende PC4's (bijlage 7.1). De 357 PC4's lagen in de verzorgingsgebieden van 129 verschillende RWZI's, waarvan 160 (van 224 dragers) in het verzorgingsgebied van een van de 76 surveillance RWZI's (Figuur 3-4), bij 42 RWZI's in totaal. Van deze 42 RWZI's was het dus bekend dat er tussen 2018 en augustus 2022 gedurende enige tijd een NDM- of KPC-dragers woonde of in een instelling aanwezig was geweest in het verzorgingsgebied, bij sommige RWZI's waren dat meerdere dragers en meerdere momenten. In de verzorgingskringen van de overige 34 surveillance RWZI's zijn in de

## RWZIs in surveillance

- NDM- en/of KPC-negatief
- NDM- en/of KPC-positief, drager(s) in gebied
- NDM en/of KPC-positief, geen drager in gebied
- Variant met genetische match met een humaan isolaat in hetzelfde gebied

## PC4's dragers

- van huisadres
- van instelling
- van huisadres en instelling



*Figuur 3-4 Geografische weergave van PC4's van bekende dragers, de verzorgingsgebieden van rioolwatersurveillance RWZI's, en detectie van NDM- en KPC-type CPE bij RWZI's. De cirkels geven de PC4's weer die behoren bij het woonadres of zorginstelling van de dragers (let op: er is geen één-op-één relatie tussen symbool en drager: in sommige gevallen hebben meerdere dragers dezelfde PC4 of zijn twee verschillende symbolen een en dezelfde drager, via woonadres en via ziekenhuis). De ingekleurde oppervlakken geven de verzorgingsgebieden van de 76 RWZIs in de rioolwatersurveillance weer en de aan- of afwezigheid van NDM- en/of KPC-type CPE.*

studieperiode dus geen humane gevallen gedetecteerd. Bij in totaal 49 (65%) van de 76 surveillance RWZI's was er een overeenkomst tussen het wel of niet detecteren van NDM- of KPC-type CPE in rioolwater en de aanwezigheid van drager(s) in het verzorgingsgebied (22/76 detectie in beide surveillances, 27/76 geen detectie in beide surveillances). Bij 27 (35%) van de surveillance RWZI's was er een discrepantie tussen de

detectie in het riool en de identificatie van dragers (7/76 wel detectie in de rioolwatersurveillance, geen dragers, 20/76 geen detectie in de rioolwatersurveillance, wel dragers) (Figuur 3-4). Bij zeven van de RWZI's mét bekende dragers werd een variant aangetroffen met grote genetische overeenkomst met een humane variant afkomstig van een drager in hetzelfde gebied (Figuur 3-4)(elke RWZI in een ander cluster, zie Bijlage 7.2). Tegelijkertijd werden in de meeste genetische clusters – additioneel of enkel – isolaten gevonden waar géén geografische overeenkomst was tussen RWZI en de drager, of tussen dragers onderling (Bijlage 7.2).

Multivariate statistische analyse laat zien dat de detectie van een sterk aan-humaan-verwante variant in rioolwater op een bepaalde locatie, geassocieerd is met het aantal NDM- of KPC-dragers in het verzorgingsgebied van de RWZI (Tabel 3-2). Dit was afwijkend vergeleken met de detectie van NDM- of KPC-type CPE *in het algemeen*, waar het totaal aantal inwoners in het verzorgingsgebied een sterkere voorspeller was dan het aantal bekende dragers. Voor beide parameters had daarnaast het aantal genomen rioolwatermonsters een positief effect, en was er een zwakke associatie met de aanwezigheid van een ziekenhuis in het verzorgingsgebied. De aanwezigheid van een ziekenhuis was duidelijk sterker geassocieerd met de detectie van NDM- of KPC-CPE in het algemeen dan met de detectie van een aan-humaan-gerelateerde variant, maar voor geen van beide parameters significant in de beste modellen in de multivariate analyse (zie ook Bijlage 7.3).



Tabel 3-2 Correlatie tussen detectie van aan humaan verwante varianten bij RWZI's en eigenschappen van de verzorgingsgebieden

	Genetisch nauw aan humaan verwante CPE variant bij RWZI		Univariate analyse	
	JA (n=11)	NEE (n=65)	Spearman's rho	p-value
Ziekenhuis (% Ja)	73%	40%	0,232	0,044
Aantal inwoners x 100,000 (mediaan)	2,1	0,37	0,410	< 0,001
Aantal dragers (mediaan) <sup>a</sup>	6,0	1,0	0,449 <sup>a</sup>	< 0,001
Frequent bemonsterd (% Ja) <sup>a,b</sup>	55%	9,2%	0,437 <sup>a</sup>	< 0,001

	NDM- of KPC-type CPE bij RWZI		Univariate analyse	
	JA (n=29)	NEE (n=47)	Spearman's rho	p-value
Ziekenhuis (% Ja)	76%	26%	0,492	< 0,001
Aantal inwoners x 100,000 (mediaan) <sup>a</sup>	1,5	0,32	0,665 <sup>a</sup>	< 0,001
Aantal dragers (mediaan)	3,0	0,0	0,475	< 0,001
Frequent bemonsterd (% Ja) <sup>a,b</sup>	41%	0%	0,551 <sup>a</sup>	< 0,001

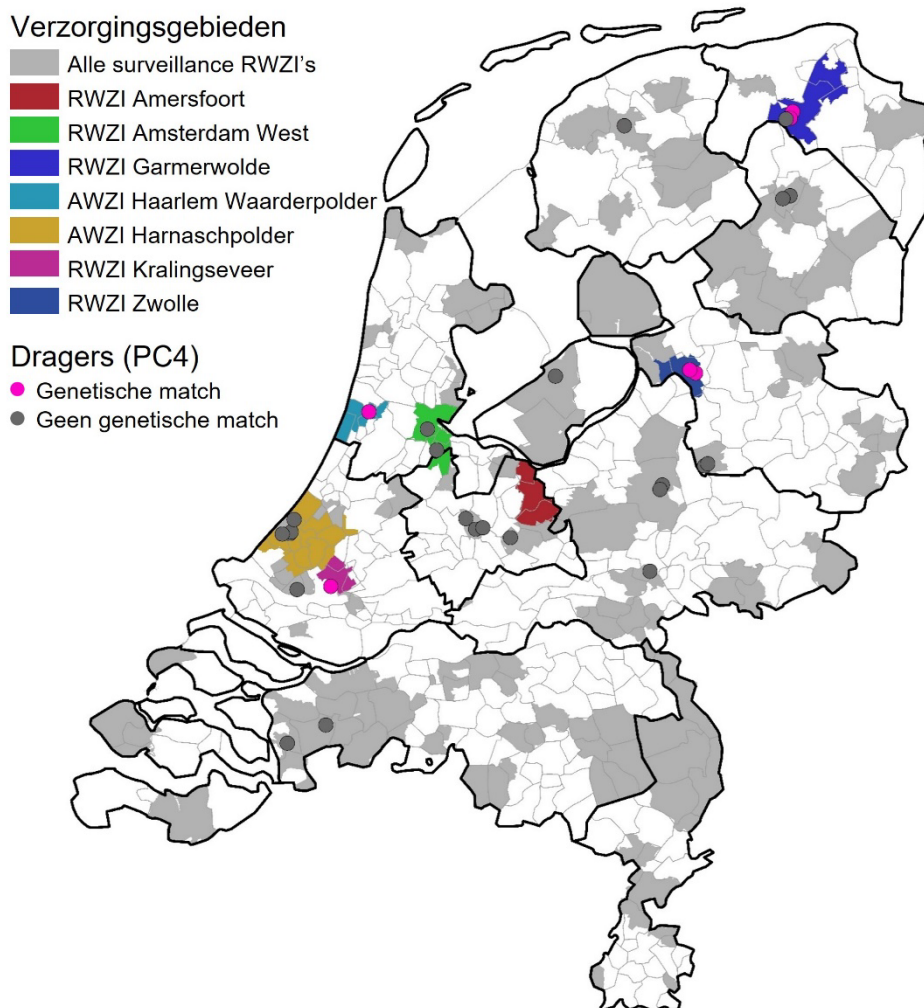
<sup>a</sup> Geselecteerde variabelen in beste binary logistische model (in Forward en Backward stepwise analyses), zie ook appendix 7-2; <sup>b</sup>RWZIs waren of 1 keer, of 10-11 keer bemonsterd, "frequent" is gedefinieerd als 10-11 keer.

### 3.3 Relatie tussen locatie en tijdstip van identificatie van dragers en de detectie van "humane CPE varianten" bij RWZI's

Een relatief klein deel (7,3%) van alle varianten die gevonden waren bij de dragers, werden ook in rioolwater gevonden. Dit kan deels verklaard worden doordat in de rioolwatersurveillance maar een beperkt deel van alle Nederlandse RWZI's waren bemonsterd, en de meeste (n=64) eenmalig. Een groot deel (43%) van de dragers woonde niet en was niet aanwezig geweest in een zorginstelling gekoppeld aan een surveillance RWZI, wat de kans verkleint dat varianten van deze dragers in de rioolwatersurveillance hadden kunnen worden opgepikt. Van de 224 dragers die dat wél waren, waren de meeste langer dan 6 maanden voor of na de rioolwatermonsternamen als drager geïdentificeerd, wat eveneens de kans verkleint dat zo'n variant nog gedetecteerd kan worden, omdat de meeste mensen tijdelijk drager zijn.

Slechts bij 28 van de 393 dragers die via het huisadres en/of zorginstelling gekoppeld waren aan een RWZI, was de RWZI bemonsterd in de rioolwatersurveillance én was het moment van detectie in de persoon binnen een tijdsbestek van 6 maanden ten opzichte van de RWZI bemonstering (Figuur 3-5). Deze 28 dragers waren, via woonadres en/of ziekenhuis, gekoppeld aan 17 verschillende RWZI's (9 via huisadres, 7 via instelling, 12 via beide; zie ook Bijlage 7.2). Voor

vier (14%) van deze dragers, uit vier verschillende genetische clusters, werd een genetisch zeer verwant isolaat bij de gekoppelde RWZI gevonden (Bijlage 7.2). Binnen de groep van 224 dragers die gelinkt waren met een surveillance RWZI, werden de isolaten vaker in clusters gevonden als de RWZI binnen een tijdsbestek van 6 maanden was bemonsterd, dan daarbuiten (6/28: 21,4% vs. 13/196: 6,6%;  $p=0,009$ , Pearson Chi-square test).



*Figuur 3-5 Geografische weergave van de 28 dragers die binnen een tijdsbestek van 6 maanden ten opzichte van de rioolwaterbemonstering waren geïdentificeerd. De ronde symbolen geven de PC4s weer die gekoppeld zijn aan de humane dragers, via woonadres of ziekenhuis (let op: er is geen één-op-één relatie tussen symbolen en een drager: in sommige gevallen hebben twee of drie humane gevallen dezelfde postcode of zijn twee verschillende symbolen een en dezelfde drager, via woonadres en via ziekenhuis). De kleur geeft aan of er een genetische overeenkomst was tussen een humaan en een rioolwater isolaat uit de overeenkomstige RWZI.*

## 4 Discussie

### 4.1 **Mate van overeenkomst van CPE in rioolwater met CPE dragers zoals bekend uit de humane surveillance**

Ongeveer een kwart van de CPE isolaten die afkomstig waren uit rioolwater hadden een hoge mate van genetische overeenkomst met een of meerdere isolaten afkomstig uit mensen. Dit bevestigt het idee dat rioolwater CPE-varianten bevat die voorkomen bij mensen.

Daarnaast werd een correlatie aangetoond tussen de detectie van sterk met humaan overeenkomende varianten bij een RWZI, en het aantal bekende dragers in het verzorgingsgebied, gebaseerd op de vier cijfers van de postcodes (PC4s) van huisadressen en zorginstellingen. Dit suggereert dat de overeenkomsten in varianten niet gebaseerd zijn op toeval, maar direct gelinkt zijn aan de aanwezigheid van een drager in het gebied via woning of zorginstelling. Dit wordt ondersteund door de bevinding dat humane varianten vaker in clusters met rioolwaterisolaten werden gevonden als de monsternamen van rioolwater binnen een tijdsbestek van 6 maanden plaatsvond ten opzichte van de detectie in dragers. Voor vier (14%) van de 28 dragers waarbij de kans om de CPE in het rioolwater te vinden redelijk werd verondersteld, omdat het rioolwater op de juiste plek en binnen een relatief korte termijn bemonsterd was, werd in de gekoppelde RWZI ook daadwerkelijk een CPE gevonden die genetisch zeer verwant was (in vier van de clusters).

De aanwezigheid van een genetisch zeer verwante variant in een bekende drager en bij een geografisch gelinkte RWZI kan betekenen dat de CPE aangetroffen in het riool afkomstig is van de drager in de humane surveillance, of van mensen in de naaste omgeving van deze persoon, dan wel in thuissituatie of uit het ziekenhuis of verpleeghuis waar deze persoon heeft verbleven.

In sommige genetische clusters was er sprake van een geografische match tussen RWZI en drager, maar zat er 19 tot 21 maanden tussen de beide detecties. Zo'n langere tijd tussen detectie in het riool en in een drager zou kunnen betekenen dat er sprake is van langdurig dragerschap. Voor ESBL-dragers is bijvoorbeeld gevonden dat hoewel ongeveer driekwart van de dragers de ESBL binnen een half jaar kwijt zijn, een deel van hen (~20%) langer dan een jaar drager blijven (Ling *et al.*, 2022), dat zou voor CPE ook het geval kunnen zijn. Een alternatieve verklaring is dat een variant blijft circuleren tussen mensen in dezelfde omgeving. Daarnaast is het niet uit te sluiten dat sommige varianten in het rioolstelsel of in leidingen of afvoerputjes van bijvoorbeeld ziekenhuizen langer persisteren, bijvoorbeeld in biofilms (Gholipour *et al.*, 2023; Schwartz *et al.*, 2003).

Sommige rioolwaterisolaten vertoonden een hoge mate van genetische overeenkomst met een humane CPE variant van een drager uit een ander gebied. Dit kan bijvoorbeeld gerelateerd zijn aan het wijder verspreid zijn van dergelijke varianten. In zo'n geval kan de variant in het rioolwater afkomstig zijn uit een andere persoon, die wél in het

verzorgingsgebied woont, maar niet in de humane surveillance was geïdentificeerd. Een ander mogelijke verklaring is dat een drager zijn/haar CPE ook nog op andere plekken kan uitscheiden dan alleen thuis of in de zorginstelling, bijvoorbeeld op het werk of een logeeraadres. Als een dergelijke locatie aan een andere RWZI is gekoppeld dan thuisadres en zorginstelling, én deze RWZI in de rioolwatersurveillance zit, kan de variant van een persoon op een andere plek teruggevonden worden dan verwacht. De gevonden associatie tussen de detectie van aan-humaan-verwante varianten bij RWZI's en het aantal bekende dragers in het gebied gebaseerd op PC4 van huisadres of zorginstelling, suggereert echter ook dat deze twee routes van uitscheiding in ieder geval een belangrijke rol spelen bij de detectie in rioolwater.

Een koppeling via het woonadres geeft mogelijk een groter kans op detectie in de rioolwatersurveillance, dan via een ziekenhuis vanwege een vaak beperkte verblijftijd in het ziekenhuis en omdat de drager de CPE mogelijk nog enkele maanden uitscheidt als hij/zij weer thuis is. De verblijftijd van de dragers in het ziekenhuis was niet bekend, maar de kweekafname was in ongeveer een derde van de gevallen zelfs alleen poliklinisch. Een mogelijk verschil in de kans van detectie van een specifieke CPE variant bij een RWZI afhankelijk van het type connectie tussen drager en RWZI, via huis of zorginstelling, is in de huidige analyse echter niet meegewogen.

Het feit dat in 14% van de dragers, waar binnen een redelijke termijn op de goede plek het rioolwater is gemeten, in rioolwater een genetisch zeer verwant isolaat is gevonden, geeft aan dat meten in rioolwater in principe een doeltreffende methode is om CPE te detecteren die in mensen circuleren. De gevoeligheid van de rioolwatersurveillance is echter afhankelijk van de meetfrequentie en het aantal locaties dat bemonsterd wordt. In de huidige opzet is bij de meeste RWZI's maar één keer gemeten, en de overlap in ruimte en tijd tussen de detectie van dragers en bemonstering van RWZI's was zeer beperkt. Daardoor is de kans om de CPE van een specifieke drager te detecteren gering. Immers, zelfs als bij een gelinkte RWZI wordt gemeten kan de betreffende individu op het meetmoment nog geen drager zijn of al niet meer. Daarnaast kan een drager op het moment van meten niet op het (aan de RWZI-gelinkte) ziekenhuis-toilet zijn geweest (bijv. bij ernstige ziekte, of vanwege tijdelijke aanwezigheid in het ziekenhuis), of niet op zijn of haar (aan de RWZI-gelinkte) thuis-toilet zijn geweest (bijvoorbeeld vanwege toiletgang op het werk in plaats van thuis, of tijdens vakantie of weekendje weg). Daarnaast is de kans om een CPE van een specifieke drager te detecteren afhankelijk van hoeveel deze drager uitscheidt (wat varieert tussen mensen) en het volume water in het riool (wat o.a. afhangt van het aantal aangesloten huishoudens en neerslag). Hoe deze relatie precies is, wordt op dit moment nog onderzocht.

De rioolwater surveillance is echter ook niet opgezet om alle CPE die in de humane surveillance gevonden worden te kunnen detecteren. Voor een dergelijk doel zou bij elke RWZI van Nederland met hoge frequentie gemeten moeten worden. De rioolwater surveillance heeft als doel trends in prevalentie en geografische verspreiding waar te nemen door

middel van een representatieve steekproef. De bemonsterde RWZI's representeren daarom een groot deel van de bevolking (43%), waarbij in elke provincie een evenredig percentage van de bevolking is gerepresenteerd en RWZI's van verschillende grootte en uit stedelijk en niet stedelijk gebied zijn geïnccludeerd (Blaak *et al.*, 2022).

#### **4.2 Toegevoegde waarde van de rioolwatersurveillance ten opzichte van de humane surveillance**

Met rioolwatersurveillance werden grotendeels dezelfde CPE typen gevonden als in de humane surveillance, maar de verhouding waarin de verschillende carbapenemase allelen en de twee bacteriële soorten voorkwamen was verschillend tussen beide vormen van surveillance. Daarnaast bleek ongeveer driekwart van de rioolwaterisolaten genetische varianten te zijn die in de onderzochte periode niet waren gevonden in mensen.

Bij 21% van de rioolwatersurveillance RWZI's waar in de onderzochte periode geen dragers van NDM- of KPC-type CPE waren gedetecteerd, werden deze typen CPE wél gevonden in het rioolwater. Dit waren grotendeels varianten die niet clusterden met een van de humane varianten, wat aangeeft dat deze varianten uit andere personen afkomstig zijn dan in de humane surveillance. Maar ook bij de RWZI's waar wel dragers waren geïdentificeerd werden grotendeels isolaten gevonden die niet clusterden met humane varianten (15/22 RWZI's, 43/57 isolaten).

Deze verschillen in typen/varianten en locatie van detectie tussen beide vormen van surveillance, kunnen verklaard worden door het feit dat in het rioolwater alle CPE terecht komen die in de algemene bevolking circuleren. Dat wil zeggen varianten die voorkomen in de kliniek en (op dat moment) infecties veroorzaken, maar ook varianten bij gezonde dragers die er niet ziek van worden en die ook niet om andere redenen worden gescreend op dragerschap. Bij een geschatte prevalentie van ongeveer 0,05% (Blaak *et al.*, 2022) overstijgt het totaal aantal dragers in Nederland – ongeveer 8000 – het aantal personen die in NethMap worden gerapporteerd: 180 personen in 2020 (Nethmap, 2021). Dit ondersteunt het idee dat slechts een beperkt deel van alle CPE dragers in de humane surveillance wordt gevonden.

De waargenomen verschillen in typen en varianten, weerspiegelen mogelijk een andere verhouding tussen minder en meer virulente stammen in de humane surveillance ten opzichte van de totale bevolking, en daarmee in het rioolwater. Zo is het bijvoorbeeld eerder beschreven dat *K. pneumoniae* CPE vaker geassocieerd zijn met ziekenhuisinfecties dan *E. coli* (Grundmann *et al.*, 2017; Nordmann *et al.*, 2011), en is er een verscheidenheid aan *E. coli* varianten wat betreft ziekmakende potentie, of virulentie, afhankelijk van de aan- of afwezigheid van virulentiegenen (Braz *et al.*, 2020). In deze lijn van denken kan de bevinding van één tak in de *E. coli* wgMLST boom met daarin nauwelijks rioolwaterisolaten, wijzen op een subpopulatie van CPE typen die vaker in de humane surveillance dan in de rioolwatersurveillance worden gevonden. Aan de andere kant kan het niet uitgesloten worden dat de kweekmethode voor rioolwater niet even gevoelig is voor alle CPE varianten en typen en bacteriële soorten. Of is

het theoretisch mogelijk dat bepaalde stammen een grotere overlevingskans hebben in het riool dan andere stammen. In deze gevallen zou de verhouding van typen en varianten in rioolwater af kunnen wijken van de verhouding in de bevolking. Vervolgonderzoek zal moeten uitwijzen of, en in welke mate, hiervan sprake is.

Van de CPE varianten die wel in de rioolwatersurveillance maar niet in de humane surveillance werden gevonden, zullen sommige misschien nooit in de humane surveillance gevonden worden, omdat ze nooit worden geassocieerd met ziekte en door toeval onder de radar van de humane surveillance blijven. Maar omdat Enterobacterales opportunistische bacteriën zijn, kunnen ook relatief onschuldige varianten toch problemen geven in een andere, kwetsbaardere drager (Woerther *et al.*, 2017), of kan een drager alsnog een infectie krijgen op een later tijdstip. In lijn met dit laatste is voor ESBL-producerende Enterobacterales aangetoond dat dragerschap een risicofactor is voor het krijgen van een infectie met deze bacteriën (Denkel *et al.*, 2020; Martinez *et al.*, 2019; Rottier *et al.*, 2018). In deze gevallen zou een variant op een later moment alsnog in de humane surveillance kunnen worden aangetroffen. Dit zal verder worden onderzocht door isolaten afkomstig uit rioolwatermetingen van 2016 en 2020/2021 te vergelijken met humane isolaten van latere momenten.

Daarnaast heeft de aanwezigheid van CPE in de humane bevolking náást wat met de humane surveillance wordt gevonden nog andere, voor de volksgezondheid relevante, implicaties. Op de eerste plaats kan de aanwezigheid van CPE in asymptomatische dragers als reservoir dienen van waaruit mogelijke nieuwe, meer ziekteverwekkendere varianten kunnen ontstaan door mutatie of het oppikken van virulentiegenen vanuit meer pathogene varianten (Braz *et al.*, 2020). Daarnaast kan, omdat carbapenemase-genen vaak op plasmiden liggen, resistentie relatief eenvoudig tussen verschillende varianten kunnen worden overgedragen. In dit geval kunnen relatief onschuldige varianten een bron zijn van resistentie-genen voor meer ziekteverwekkende stammen die problemen geven in ziekenhuizen.

Juist vanwege de discrepanties tussen de humane surveillance en de rioolwatersurveillance – de detectie van CPE op plekken waar ze niet worden gevonden in de humane surveillance en andere varianten – maakt daarom dat rioolwater surveillance een waardevolle aanvulling is op de humane surveillance.

## 5 Conclusie

De vergelijking van de genetische opmaak van NDM- en KPC-typen CPE isolaten afkomstig uit de humane surveillance en de rioolwatersurveillance, laat zien dat CPE die in mensen circuleren in rioolwater aangetoond kunnen worden. Dit, en het feit dat ook andere varianten worden gevonden die (nog) niet in de humane surveillance worden gevonden en dat CPE ook kunnen worden gedetecteerd op andere locaties dan waar humane gevallen worden geregistreerd, geeft aan dat rioolwatersurveillance een goede aanvulling is op het nationale CPE surveillance programma.





## 6 Referenties

- Aarestrup, F.M. en Woolhouse, M.E.J. 2020. Using sewage for surveillance of antimicrobial resistance. *Science* 367(6478), 630-632.
- Blaak, H., Kemper, M.A., de Man, H., van Leuken, J.P.G., Schijven, J.F., van Passel, M.W.J., Schmitt, H. en de Roda Husman, A.M. 2021. Nationwide surveillance reveals frequent detection of carbapenemase-producing Enterobacterales in Dutch municipal wastewater. *Sci Total Environ* 776.
- Blaak, H., Kemper, M.A., Hendrickx, A.P.A., van Santen-Verheuevel, M.G., Leung, K.Y., de Roda Husman, A.M. en Schmitt, H. 2022. ABR riolwater surveillance 2020-2021. RIVM Rapport 2022-0008.
- Braz, V.S., Melchior, K. en Moreira, C.G. 2020. *Escherichia coli* as a Multifaceted Pathogenic and Versatile Bacterium. *Front Cell Infect Microbiol* 10, 548492.
- CBS 2021 Inwoners per riolwaterzuiveringsinstallatie, 1-1-2021. <https://www.cbs.nl/nl-nl/maatwerk/2021/06/inwoners-per-riolwaterzuiveringsinstallatie-1-1-2021>.
- Denkel, L.A., Maechler, F., Schwab, F., Kola, A., Weber, A., Gastmeier, P., Pfafflin, F., Weber, S., Werner, G., Pfeifer, Y., Pietsch, M. en Leistner, R. 2020. Infections caused by extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacterales after rectal colonization with ESBL-producing *Escherichia coli* or *Klebsiella pneumoniae*. *Clin Microbiol Infect* 26(8), 1046-1051.
- Doi, Y. en Paterson, D.L. 2015. Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Semin Respir Crit Care Med* 36(1), 74-84.
- Fattouh, R., Tijet, N., McGeer, A., Poutanen, S.M., Melano, R.G. en 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., Afshinnkoo, E., Mason, C., Gonnet, G.H. en Iraola, G. 2019. Urban metagenomics uncover antibiotic resistance reservoirs in coastal beach and sewage waters. *Microbiome* 7(1), 35.
- Gholipour, S., Shamsizadeh, Z., Gwenzi, W. en Nikaeen, M. 2023. The bacterial biofilm resistome in drinking water distribution systems: A systematic review. *Chemosphere*, 138642.
- Grundmann, H., Glasner, C., Albiger, B., Aanensen, D.M., Tomlinson, C.T., Andrasevic, A.T., Canton, R., Carmeli, Y., Friedrich, A.W., Giske, C.G., Glupczynski, Y., Gniadkowski, M., Livermore, D.M., Nordmann, P., Poirel, L., Rossolini, G.M., Seifert, H., Vatopoulos, A., Walsh, T., Woodford, N., Monnet, D.L. en European Survey of Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae Working, G. 2017. Occurrence of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in the European survey of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae (EuSCAPE): a prospective, multinational study. *Lancet Infect Dis* 17(2), 153-163.

- Hendrickx, A.P.A., Landman, F., de Haan, A., Witteveen, S., van Santen-Verheувel, M.G., Schouls, L.M. en 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. en 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. en 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. en Flach, C.F. 2019. Population-level surveillance of antibiotic resistance in *Escherichia coli* through sewage analysis. *Eurosurveillance* 24(37).
- Kwak, Y.K., Colque, P., Byfors, S., Giske, C.G., Mollby, R. en 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. en Hsueh, P.R. 2022. Carbapenemase-producing Enterobacterales infections: recent advances in diagnosis and treatment. *Int J Antimicrob Agents* 59(2), 106528.
- Ling, W., Peri, A.M., Furuya-Kanamori, L., Harris, P.N.A. en Paterson, D.L. 2022. Carriage Duration and Household Transmission of Enterobacterales Producing Extended-Spectrum Beta-Lactamase in the Community: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Microb Drug Resist* 28(7), 795-805.
- Lodder, W. en 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.
- Martinez, A.E., Widmer, A., Frei, R., Pargger, H., Tuchscherer, D., Marsch, S., Egli, A. en Tschudin-Sutter, S. 2019. ESBL-colonization at ICU admission: impact on subsequent infection, carbapenem-consumption, and outcome. *Infect Control Hosp Epidemiol* 40, 408-413.
- 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>.

- Nethmap (2022) Consumption of antimicrobial agents and antimicrobial resistance among medically important bacteria in the Netherlands in 2021., <https://swab.nl/nl/samenvatting-nethmap-2022>.
- Nordmann, P., Naas, T. en Poirel, L. 2011. Global spread of Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Emerg Infect Dis* 17(10), 1791-1798.
- Oosterom, E. en Hermans, R. 2013. Riolering in beeld. Benchmark rioleringszorg 2013. Rapport Stichting RIONED.
- 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. en 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. en Nordmann, P. 2012. OXA-48-like carbapenemases: the phantom menace. *J Antimicrob Chemother* 67(7), 1597-1606.
- Reuland, E.A., Al Naiemi, N., Kaiser, A.M., Heck, M., Kluytmans, J.A., Savelkoul, P.H., Elders, P.J. en Vandenbroucke-Grauls, C.M. 2016. Prevalence and risk factors for carriage of ESBL-producing Enterobacteriaceae in Amsterdam. *J Antimicrob Chemother* 71(4), 1076-1082.
- Rottier, W.C., van Werkhoven, C.H., Bamberg, Y.R.P., Dorigo-Zetsma, J.W., van de Garde, E.M., van Hees, B.C., Kluytmans, J., Kuck, E.M., van der Linden, P.D., Prins, J.M., Thijsen, S.F.T., Verbon, A., Vlamincx, B.J.M., Ammerlaan, H.S.M. en Bonten, M.J.M. 2018. Development of diagnostic prediction tools for bacteraemia caused by third-generation cephalosporin-resistant enterobacteria in suspected bacterial infections: a nested case-control study. *Clin Microbiol Infect* 24(12), 1315-1321.
- 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. en Zuidema, T. 2017. Bronnen van antibioticaresistente bacterien in het milieu en mogelijke maatregelen. RIVM Rapport 2017-0085.
- Schwartz, T., Kohnen, W., Jansen, B. en Obst, U. 2003. Detection of antibiotic-resistant bacteria and their resistance genes in wastewater, surface water, and drinking water biofilms. *FEMS Microbiol Ecol* (3), 325-335.
- Tzouveleki, L.S., Markogiannakis, A., Piperaki, E., Souli, M. en Daikos, G.L. 2014. Treating infections caused by carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Clin Microbiol Infect* 20(9), 862-872.
- 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. en 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., Witteveen, S., Wielders, L., van Santen, M., Landman, F., de Haan, A., Schouls, L.M., Bosch, T. en Dutch, C.P.E.s.S.G. 2020. Molecular characteristics of carbapenemase-producing Enterobacterales in the Netherlands; results of the 2014-2018 national laboratory surveillance. *Clin Microbiol Infect* 26(10), 1412.e1417-1412.e1412.
- 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. en 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. en van Duijkeren, E. 2015. Molecular characteristics of extended-spectrum cephalosporin-resistant Enterobacteriaceae from humans in the community. *PLoS One* 10(6), e0129085.
- 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/](http://www.who.int/medicines/areas/rational_use/prioritization-of-pathogens/en/) (accessed January 2020).
- Woerther, P.L., Andremont, A. en Kantele, A. 2017. Travel-acquired ESBL-producing Enterobacteriaceae: impact of colonization at individual and community level. *J Travel Med* 24(suppl\_1), S29-S34.
- Zhou, Z., Alikhan, N.F., Mohamed, K., Fan, Y., Agama Study, G. en Achtman, M. 2020. The EnteroBase user's guide, with case studies on Salmonella transmissions, Yersinia pestis phylogeny, and Escherichia core genomic diversity. *Genome Res* 30(1), 138-152.

## 7 Bijlage

## 7.1 Overzicht humane gevallen, PC4s en gekoppelde RWZI

n=396 dragers totaal	PC4s			Dragers*
	Huisadres	Zorginstelling	Totaal	
Totaal aantal PC4s	394	310	704	395
Aantal verschillende PC4s	297	74	362	
PC4s aan RWZI gekoppeld	389	310	699	393
Verskillende PC4s	292	74	357	
Aantal RWZIs	118	57	129	224
PC4s aan onderzochte RWZI gekoppeld	164	152	316	
Verskillende PC4s	129	37	160	224
Aantal RWZIs	39	24	42	

\*aantal NDM/KPC dragers met minstens 1 PC4 (huisadres en/of instelling)

## 7.2 Herkomst humane en rioolwaterisolaten in gemengde clusters

Cluster ID	ID	Publication key	Origin of isolate	RWZI huisadres	RWZI instelling	Datum detectie
Kpn1	22007124	RIVM_C017549	Humaan	<b>Amsterdam West</b>	<b>Amsterdam West</b>	29-10-2018
	22007135	RIVM_C017610	Humaan	Amstelveen	<b>Amsterdam West</b>	30-10-2018
	22007269	RIVM_C017804	Humaan	Zwanenburg	<b>Amsterdam West</b>	10-12-2018
	27001757	RIVM_C046903	<b>RWZI Amsterdam West</b>	-	-	23-9-2020
Kpn2	22007213	RIVM_C017729	Humaan	Nijkerk	<b>Amersfoort</b>	26-11-2018
	27001749	RIVM_C046895	<b>RWZI Amersfoort</b>	-	-	7-7-2020
Kpn3	22008210	RIVM_C000061	Humaan	Harnaschpolder	Harnaschpolder	18-10-2019
	27001755	RIVM_C046901	RWZI Houtrust	-	-	8-9-2020
Kpn4	22008316	RIVM_C028924	Humaan <sup>#</sup>	<b>Haarlem Waarderpolder</b>	n.v.t.	22-11-2019
	22008317	RIVM_C028925	Humaan <sup>#</sup>	<b>Haarlem Waarderpolder</b>	n.v.t.	22-11-2019
	27001739	RIVM_C046885	<b>RWZI Haarlem Waarderpolder</b>	-	-	26-5-2020
Eco1	22007218	RIVM_C017739	Humaan	Nieuwgraaf	n.v.t.	26-11-2018
	27001699	RIVM_C046844	RWZI Haarlem Waarderpolder	-	-	26-5-2020
Eco2	22007342	RIVM_C017935	Humaan	Dokhaven	Dokhaven	1-10-2018
	22008730	RIVM_C036322	Humaan	<b>Kralingseveer</b>	Dokhaven	6-7-2020
	27001718	RIVM_C046863	<b>RWZI Kralingseveer<sup>#</sup></b>	-	-	17-8-2020
	27001719	RIVM_C046864	<b>RWZI Kralingseveer<sup>#</sup></b>	-	-	17-8-2020
Eco3	22007395	RIVM_C018109	Humaan	Groenedijk	Kralingseveer	2-2-2019
	22008221	RIVM_C019713	Humaan	Houtrust	Harnaschpolder	23-10-2019
	22008589	RIVM_C030780	Humaan	Dordrecht	Bath	2-3-2020
	22009103	RIVM_C038804	Humaan	Ede	n.v.t.	2-3-2021
	27001708	RIVM_C046853	RWZI Garmerwolde	-	-	9-6-2020
Eco4	22007412	RIVM_C018214	Humaan	Hengelo	n.v.t.	17-1-2019
	22007930	RIVM_C019468	Humaan	Boxtel	s Hertogenbosch	12-8-2019
	22008034	RIVM_C000163	Humaan	Leiden Noord	Leiden Noord	5-9-2019
	27001694	RIVM_C046839	RWZI Lelystad	-	-	11-5-2020

Cluster ID	ID	Publication key	Origin of isolate	RWZI huisadres	RWZI instelling	Datum detectie
	27001714	RIVM_C046859	RWZI Simpelveld	-	-	17-6-2020
Eco5	22007495	RIVM_C018438	Humaan	Soest	Amersfoort	5-3-2019
	22008297	RIVM_C028468	Humaan	Kralingseveer	Dokhaven	18-11-2019
	27001698	RIVM_C046843	RWZI Arnhem	-	-	18-5-2020
Eco6	22007871	RIVM_C019412	Humaan	Velsen	n.v.t.	20-7-2019
	22008013	RIVM_C019551	Humaan	Zwanenburg	Zwaanshoek	29-8-2019
	22009486	RIVM_C042434	Humaan	Roermond	Weert	17-1-2022
	22009667	RIVM_C044898	Humaan	<b>Harnaschpolder</b>	<b>Harnaschpolder</b>	3-6-2022
	27001734	RIVM_C046879	<b>RWZI Harnaschpolder</b>	-	-	27-10-2020
Eco7	22008004	RIVM_C019542	Humaan	Gennep	Land van Cuijk	2-9-2019
	22008574	RIVM_C030761	Humaan	Gouda	Gouda	5-3-2020
	22008702	RIVM_C036191	Humaan	Nieuwgraaf	Nieuwgraaf	13-6-2020
	22009721	RIVM_C046747	Humaan	Zaandam-Oost	Zaandam-Oost	4-7-2022
	27001726	RIVM_C046871	RWZI Amsterdam West	-	-	23-9-2020
Eco8	22008654	RIVM_C035425	Humaan	<b>Garmerwolde</b>	<b>Garmerwolde</b>	24-4-2020
	27001707	RIVM_C046852	<b>RWZI Garmerwolde</b>	-	-	9-6-2020
	27001720	RIVM_C046865	RWZI Ridderkerk	-	-	17-8-2020
Eco9	22008901	RIVM_C037145	Humaan	<b>Zwolle</b>	<b>Zwolle</b>	7-10-2020
	27001735	RIVM_C046880	<b>RWZI Zwolle</b>	-	-	2-11-2020

# Twee isolaten uit hetzelfde monster/dezelfde persoon

### 7.3 Resultaten binaire logistische analyse

Afhankelijke variabele: RWZI met NDM- of KPC-type CPE	Model parameters		
	Chi-square	p-value	Nagelkerke R <sup>2</sup>
Aantal monsters, aantal inwoners (beste model)	53,949	<0,0001	0,691
Aantal monsters, aantal dragers	42,088	<0,0001	0,578
Aantal monsters, ziekenhuis	44,174	<0,0001	0,599

Afhankelijke variabele: RWZI met variant in cluster met humaan isolaat (isolaten)	Model parameters		
	Chi-square	p-value	Nagelkerke R <sup>2</sup>
Aantal monsters, aantal dragers (beste model)	29,581	<0,0001	0,573
Aantal monsters, aantal inwoners	26,511	<0,0001	0,523
Aantal monsters, ziekenhuis	13,444	0,001	0,288

Weergegeven zijn statistische parameters voor modellen waarbij de onafhankelijke variabelen "aantal monsters", "aantal inwoners" en "aantal dragers" paarsgewijs handmatig zijn ingevoerd.





Dit is een uitgave van:

**Rijksinstituut voor Volksgezondheid  
en Milieu**

Postbus 1 | 3720 BA Bilthoven

[www.rivm.nl](http://www.rivm.nl)

juni 2023

De zorg voor morgen  
begint vandaag