

rivm

Rapport 703719031/2010

H. Blaak | F.M. Schets | R. Italiaander | H. Schmitt | A.M. de Roda Husman

Antibioticaresistente bacteriën in Nederlands oppervlaktewater in veeteeltrijk gebied

RIVM Rapport 703719031/2010

Antibioticaresistente bacteriën in Nederlands oppervlaktewater in veeteeltrijk gebied

H. Blaak
F.M. Schets
R. Italiaander
H. Schmitt
A.M. de Roda Husman

Contact:
Hetty Blaak
Laboratorium voor zoönosen en omgevingsmicrobiologie
hetty.blaak@rivm.nl

Dit onderzoek werd verricht in opdracht van VROM-Inspectie, Programma Schoon en Veilig Water in het kader van project M/703719 Monitoring en Handhaving Drinkwater, deelproject Emerging pathogens and substances.

© RIVM 2010

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'.

Rapport in het kort

Antibioticaresistente bacteriën in Nederlands oppervlaktewater in veeteeltgebied

In oppervlaktewater en slib in veeteeltgebied komen hoge percentages bacteriën voor die resistent zijn tegen een of meerdere antibiotica. Dit blijkt uit verkennend onderzoek van het RIVM. De herkomst van deze bacteriën in het onderzochte gebied is in deze studie niet onderzocht. Wel zijn er aanwijzingen dat ten minste een deel van de bacteriën afkomstig is uit mest van nabijgelegen veeteeltbedrijven. Onderzoek naar de mate waarin antibioticumresistente bacteriën in oppervlaktewater voorkomen is van belang om te kunnen inschatten in hoeverre mensen via het milieu worden blootgesteld aan deze bacteriën.

Er zijn meerdere oorzaken waardoor antibioticaresistente bacteriën in oppervlaktewater terechtkomen. Bijvoorbeeld doordat mest van dieren die met antibiotica zijn behandeld, afspoelt naar het oppervlaktewater. Een andere oorzaak kan zijn dat gedeeltelijk gezuiverd of ongezuiverd afvalwater in oppervlaktewater wordt geloosd, bijvoorbeeld door ziekenhuizen waar mensen zijn behandeld met antibiotica.

Als mensen met verontreinigd oppervlaktewater in aanraking komen, zoals tijdens recreatie, kunnen zij worden blootgesteld aan bacteriën die resistent zijn tegen een of meerdere antibiotica. Dit brengt mogelijk volksgezondheidsrisico's met zich mee omdat deze antibiotica belangrijk kunnen zijn om infecties te behandelen. De risico's kunnen zich op twee manieren manifesteren. Mensen die aan antibioticaresistente bacteriën worden blootgesteld, kunnen zelf het risico lopen ziek te worden van deze – moeilijker te bestrijden – bacteriën. Daarnaast is het mogelijk dat mensen zelf niet ziek worden van de resistente bacteriën maar ze overdragen aan mensen met verminderde weerstand, zoals ziekenhuispatiënten. Deze categorie mensen kan hier vervolgens wel ziek van worden.

Trefwoorden:

antibioticaresistente, bacteriën, resistentiegenen, oppervlaktewater, veeteeltgebied

Abstract

Antibiotic resistant bacteria in surface water in an area with a high density of animal farms in the Netherlands

High percentages of bacteria with resistance to one or more antibiotics are present in surface water and sludge in an agricultural area with a high density of animal farms. This was demonstrated in an exploratory study performed at the RIVM. Although the origin of the bacteria in the area under study was not investigated, there are indications that at least part of the bacteria originates from manure from nearby farms. Research on the prevalence of antibiotic resistant bacteria in surface water is necessary to estimate the contribution of the environment to human exposure to these bacteria.

Antibiotic resistant bacteria can end up in surface water by different routes. Manure of animals treated with antibiotics can run off from land into surface water. Another route is via discharge of partially treated or untreated waste water onto surface water, for instance from hospitals where people are treated with antibiotics.

If they come into contact with contaminated surface water, for instance during recreation, people risk exposure to bacteria that are resistant to one or more antibiotics. Since these antibiotics can be relevant for treatment of human infections, public health risks may be involved. These risks can manifest themselves in two ways. People who are exposed to antibiotic resistant bacteria are at risk of developing disease caused by these bacteria, which is therefore harder to treat. Additionally, if people do not get ill from the resistant bacteria they can transfer them to people who are more vulnerable, such as hospital patients. Subsequently, this category of people can develop disease.

Key words:

antibiotic resistance, bacteria, resistance genes, surface water, intensive husbandry

Inhoud

Samenvatting		9
1	Inleiding	11
1.1	Antibioticagebruik	11
1.2	Antibioticaresistentie bij dieren	12
1.3	Antibioticaresistentie bij de mens	12
1.4	Antibioticaresistentie in het milieu	13
1.5	Doel van het onderzoek	14
2	Materiaal en methoden	17
2.1	Monsterneming	17
2.2	Analyses	18
2.2.1	Water en slib	18
2.2.2	Isolatie en typering van bacteriestammen	18
2.2.3	Antibioticumgevoeligheidsbepaling	18
2.2.4	Minimal Inhibitory Concentration (MIC)	19
2.2.5	Berekening percentage resistente stammen	19
3	Resultaten	21
3.1	Commensalen en opportunistische bacteriën	22
3.1.1	<i>Escherichia coli</i>	22
3.1.2	Enterococcen	24
3.1.3	Staphylococcen	31
3.2	Pathogenen	33
3.2.1	<i>Campylobacter</i>	33
3.3	Milieubacteriën	35
3.3.1	<i>Aeromonas</i>	35
3.3.2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	39
3.3.3	<i>Clostridium</i>	40
3.4	Resultaten op een rij	41
3.5	Vergelijking met resistentie bij landbouwhuisdieren	42
4	Discussie	47
4.1	<i>Enterococcus</i> -, <i>Staphylococcus</i> -, en <i>Campylobacter</i> -soorten in het milieu	47
4.2	Resistentie bij milieubacteriën	48
4.3	Resistentie in relatie tot fecale bronnen	49
4.4	Resistentie in rivieren versus beek op recreatieterrein	51
4.5	Bijzonder-resistente micro-organismen (BRMO) in het milieu	52
4.6	Antibioticaresistentie in milieu en volksgezondheid	52

5	Conclusies	53
	Dankwoord	55
	Literatuur	57
	Bijlage 1. Analysemethoden, isolatiemedia en onderzochte volumes	65
	Bijlage 2. Protocol voor het bepalen van antibioticumgevoeligheid	67
	Bijlage 3. Samenstelling Sensititre MIC-platen en concentratieranges Etesten	69
	Bijlage 4. Gebruikte breakpoints voor resistentiebepalingen	71
	Bijlage 5. MIC-verdelingen voor <i>E. coli</i>-isolaten	75
	Bijlage 6. MIC-verdelingen voor <i>E. faecium</i>-isolaten	79
	Bijlage 7. MIC-verdelingen voor <i>E. faecalis</i>-isolaten	83
	Bijlage 8. MIC-verdelingen voor <i>Staphylococcus</i>-isolaten	87
	Bijlage 9. MIC-verdelingen voor <i>Campylobacter</i>-isolaten	91
	Bijlage 10. MIC-verdelingen voor <i>Aeromonas</i>-isolaten	95
	Bijlage 11. MIC-verdelingen voor <i>P. aeruginosa</i>-isolaten	97

Samenvatting

Door het gebruik van antibiotica in de humane gezondheidszorg en het gebruik van grote hoeveelheden antibiotica in veehouderijen worden steeds meer bacteriën resistent tegen veelgebruikte antibiotica. Als gevolg hiervan wordt de kans dat mensen worden blootgesteld aan antibioticaresistente bacteriën steeds groter. Dit kan door contact met mens en dier, via de voedselketen, maar waarschijnlijk ook via het milieu. Wanneer mensen blootgesteld worden aan antibioticaresistente pathogenen kan dit een infectie tot gevolg hebben die moeilijker te behandelen is. Daarnaast zijn er indirecte volksgezondheidsrisico's die samenhangen met de blootstelling aan resistente bacteriën die relatief onschadelijk zijn, zoals commensalen. Deze kunnen mensen koloniseren en genen uitwisselen met de al aanwezige darmflora, waardoor mensen ongemerkt drager kunnen worden van antibioticaresistente bacteriën. Commensale bacteriën kunnen opportunistische pathogenen zijn voor mensen met een verminderde weerstand, zoals ziekenhuispatiënten. Bij deze groep mensen kunnen infecties veroorzaakt door resistente commensalen ernstige gevolgen hebben. Ook is er een risico dat bij sequentiële infectie met een pathogeen uitwisseling van genen plaatsvindt tussen resistente commensalen en het pathogeen door middel van horizontale genoverdracht.

Commensalen worden in grote hoeveelheden uitgescheiden door mens en dier en komen in het aquatische milieu terecht, bijvoorbeeld door het lozen van ongezuiverd of gedeeltelijk gezuiverd afvalwater of afspoeling van mest. Het is te verwachten dat een deel van deze commensalen resistent is tegen antibiotica door antibioticumgebruik door de oorspronkelijke gastheer. Het aandeel van antibioticaresistente bacteriën zal per bron verschillen en is naar verwachting hoog bijvoorbeeld in mest van landbouwhuisdieren op grote bedrijven en in afvalwater van ziekenhuizen. Behalve dat het oppervlaktewater een verzamelvat is van resistente bacteriën afkomstig uit mens en dier, is het denkbaar dat in het water uitwisseling van genen plaatsvindt tussen bacteriën, waardoor nieuwe combinaties van bacteriesoorten en resistenties ontstaan.

Als mensen in aanraking komen met fecaal gecontamineerd oppervlaktewater, bijvoorbeeld omdat ze in het water recreëren, of als gecontamineerd water wordt gebruikt als irrigatiewater, lopen ze kans te worden blootgesteld aan bacteriën met resistenties tegen klinisch relevante antibiotica. In het huidige onderzoek is het voorkomen van antibioticaresistentie onderzocht bij verschillende bacteriesoorten geïsoleerd uit drie kleine rivieren in een agrarisch gebied in Noord-Brabant, en een beek op een recreatieterrein in dezelfde omgeving. Uit een van de rivieren is tevens slib onderzocht. De onderzochte bacteriën waren de commensalen en opportunistische bacteriën *Escherichia coli*, enterococci en staphylococci, de pathogenen *Campylobacter* en *Salmonella*, en de pathogene milieubacteriën *Aeromonas*, *Pseudomonas aeruginosa* en *Clostridium*. De bacteriën *E. coli*, enterococci, *Campylobacter*, *Aeromonas*, en *Clostridium* werden in alle rivieren, de beek en het slib gevonden. Staphylococci en *P. aeruginosa* werden in watermonsters, maar niet in slib gevonden. *Salmonella* werd in geen van de monsters aangetroffen. Alle geïsoleerde bacteriesoorten werden onderzocht op de gevoeligheid voor zes tot twaalf verschillende antibiotica die in de humane en/of animale gezondheidszorg worden gebruikt.

Het aandeel aan resistente stammen in de milieumonsters was hoog: 29% van *C. coli*, 36% van *E. coli*, 47% van *E. faecalis*, 80% van *E. faecium*, en 75% van staphylococci waren resistent tegen minstens één antibioticum. Daarnaast was een groot gedeelte van deze stammen resistent tegen twee of meer antibiotica. Sommige isolaten waren resistent tegen zeven verschillende antibiotica. De herkomst van de antibioticaresistente bacteriën in het oppervlaktewater en slib werd in deze studie niet onderzocht, maar de gevonden antibioticaresistentieprofielen doen vermoeden dat een deel van de geïsoleerde bacteriën afkomstig is uit mest van veeteeltbedrijven. Tevens zijn er aanwijzingen voor het bestaan van andere, mogelijk humane, contaminatiebronnen op de onderzochte locaties. De aanwezigheid van

antibioticaresistente bacteriën is in overeenstemming met de in eerder RIVM-onderzoek aangetoonde aanwezigheid van resistentiegenen in dezelfde rivieren.

De aanwezigheid van antibioticaresistente bacteriën in oppervlaktewater vormt mogelijk een risico voor de volksgezondheid als mensen hieraan worden blootgesteld. De kansen daarop zijn het grootst als het water betreft waar mensen makkelijk mee in aanraking komen, zoals water waarin gerecreëerd wordt of dat wordt gebruikt als irrigatiewater. In vervolgstudies zal daarom het vóórkomen van antibioticaresistente bacteriën in oppervlaktewateren met genoemde functies onderzocht moeten worden, om vervolgens blootstellingrisico's en daarmee samenhangende gezondheidsrisico's te kunnen bepalen. Vervolgstudies zullen tevens de relatieve bijdrage van verschillende mogelijke contaminatiebronnen moeten uitwijzen, zodat interventiestrategieën ontwikkeld kunnen worden.

1 Inleiding

Door het gebruik van antibiotica in de humane gezondheidszorg, en de grote hoeveelheden antibiotica die gebruikt worden in intensieve veehouderijen, is de verspreiding van antibioticaresistente bacteriën de laatste decennia toegenomen (MARAN, 2007; EARSS, 2008; Nethmap, 2009). Nederland voert een terughoudend beleid voor wat betreft het gebruik van antibiotica in de humane gezondheidszorg. Dit heeft tot gevolg dat in vergelijking met andere Europese landen relatief weinig antibioticaresistente pathogenen bij patiënten worden aangetroffen (EARSS, 2008). In de veterinaire gezondheidszorg worden merendeels dezelfde antibiotica gebruikt als in de humane gezondheidszorg, of antibiotica die daaraan verwant zijn. Hierdoor ontstaan bij dieren resistenties tegen antibiotica die belangrijk zijn voor de behandeling van humane infecties. Omdat resistentie tegen een bepaald antibioticum vaak gepaard gaat met kruisresistentie tegen andere antibiotica uit dezelfde klasse, kan het ontstaan bij dieren van resistentie tegen antibiotica die niet gebruikt worden in de humane gezondheidszorg toch grote gevolgen hebben. Een voorbeeld hiervan is het ontstaan van vancomycine-resistente enterococconen in de jaren 90, als gevolg van avoparcine-gebruik bij vee (Van den Bogaard et al., 1997; Van den Bogaard et al., 2000).

1.1 Antibioticagebruik

In zowel de veterinaire als de humane gezondheidszorg behoort de overgrote meerderheid van voorgeschreven antibiotica tot één van de volgende zes klassen: (fluoro)quinolonen, aminoglycosiden, macroliden, tetracyclines, sulfonamiden/trimethoprim, en penicillines/cephalosporines (Tabel 1). Elke antibioticumklasse omvat verschillende antibiotica die overeenkomen in structuur en werkingsmechanisme. In de veterinaire sector worden vooral tetracyclines en sulfonamiden/trimethoprim voorgeschreven (MARAN, 2007). Er bestaan echter verschillen tussen verschillende diergroepen, zo wordt bijvoorbeeld bij vleesvarkens vooral tetracycline gebruikt (58%), en bij broedkippen vooral penicillines (28%) en fluoroquinolonen (24%) (MARAN, 2007). In de humane gezondheidszorg worden in de primaire zorg (via huisartsen) vooral penicillines (39%) en tetracyclines (25%) voorgeschreven (Nethmap, 2009). In ziekenhuizen bestaat de meerderheid van de

Tabel 1 Antibioticumklassen

Klasse	Voorbeelden
Fluoroquinolonen en Quinolonen	Ciprofloxacin
Aminoglycosiden	Streptomycine, Neomycine, Gentamicine
Macroliden	Erythromycine, Clarithromycine
Tetracyclines	Tetracycline
Sulfonamiden en Trimethoprim	Sulfamethoxazole*
Beta-lactams: Penicillines	Penicilline, Ampicilline, Oxacilline [‡] , Methicilline [‡]
Beta-lactams: Cephalosporines	Cefotaxime
Beta-lactams: Carbapenems	Imipenem, Meropenem
Streptograminen	Quinupristine, Dalfopristine
Lincosamiden	Clindamycine
Glycopeptiden	Vancomycine

*Wordt vaak in combinatie met trimethoprim voorgeschreven.

[‡]Penicillase-resistente penicillines.

voorgeschreven antibiotica uit penicillines/cephalosporines (61%), gevolgd door fluoroquinolonen (13%).

1.2 Antibioticaresistentie bij dieren

Behalve voor therapeutische doeleinden zijn antibiotica in de veterinaire sector jarenlang gebruikt als groeibevorderaar, toegevoegd aan diervoer. Ondanks het feit dat dit sinds 1 januari 2006 niet meer is toegestaan (Anonymous, 2003b), neemt het totale gebruik van antibiotica bij Nederlandse veehouderijen nog steeds toe (MARAN, 2007), en is het vele malen hoger dan in de humane gezondheidszorg (Geijlswijk et al., 2009). Vooral varkens, vleeskalveren en broedkippen krijgen veel antibiotica toegediend om infecties te behandelen, maar ook om de verspreiding onder koppels gezonde dieren te voorkomen. Dit gaat gepaard met het voorkomen van zeer hoge percentages resistente pathogenen en commensalen bij deze dieren (MARAN, 2007). Zo is bijvoorbeeld bijna 90% van *Escherichia coli*-stammen geïsoleerd uit feces van broedkippen resistent tegen minstens één antibioticum en ruim 60% van *Campylobacter jejuni*-stammen resistent tegen fluoroquinolonen (MARAN, 2007). Veel van de resistente bacteriën die bij deze dieren vóórkomen zijn multiresistent: *E. coli*-stammen uit feces van varkens, kippen en kalveren met zes, zeven, of acht resistenties zijn niet zeldzaam (MARAN, 2007).

1.3 Antibioticaresistentie bij de mens

Bacteriën die één of meerdere antibioticaresistenties hebben verworven kunnen een directe of indirecte bedreiging vormen voor de gezondheid van de mens. Als mensen worden blootgesteld aan een resistent pathogeen, kan dit direct ziekte tot gevolg hebben die moeilijk of niet te behandelen is. Indirecte risico's worden gevormd door blootstelling aan onschadelijke of potentieel schadelijke resistente bacteriën, zoals humane en dierlijke commensalen. Deze bacteriën kunnen mensen koloniseren en/of de resistentie doorgeven aan bij de mens aanwezige flora via horizontale genoverdracht. Bij horizontale genoverdracht worden antibioticaresistentiegenen overgedragen aan gevoelige bacteriën. Deze overdracht kan plaatsvinden tussen bacteriën van een soort, maar ook tussen verschillende bacteriesoorten. Mensen kunnen op deze manier ongemerkt 'drager' worden van resistente bacteriën. Als het hierbij om opportunistische bacteriën gaat is er een risico dat ze worden overgedragen aan mensen met een verminderde weerstand, of dat ze tijdens een periode van verminderde weerstand van een drager alsnog ziekte veroorzaken. Daarnaast is er een risico dat bij een sequentiële infectie met een niet-resistent pathogeen er genoverdracht plaatsvindt vanuit de resistente flora.

Bekende voorbeelden van problemen veroorzaakt door resistente commensalen zijn de zogenaamde ziekenhuisinfecties, waarvan het bekendste voorbeeld MRSA is. Hoewel *S. aureus* onschadelijk is voor gezonde mensen, kan deze bacterie ernstige infecties veroorzaken bij mensen met een verminderde weerstand, zoals ziekenhuispatiënten. Andere veroorzakers van ziekenhuisinfecties zijn extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producerende *E. coli* of *Klebsiella* (Cantón et al., 2008; Coque et al., 2008). De antibiotica waar MRSA en ESBL-producerende bacteriën nog gevoelig voor zijn, zijn zeer beperkt, waardoor infecties met deze bacteriën moeilijk te behandelen zijn. MRSA en ESBL-producerende bacteriën komen ook buiten ziekenhuizen voor bij (gezonde) dragers. Bij MRSA gaat het daarbij in Nederland vooral om een veegerelateerde variant van MRSA (V-MRSA). Door contact met varkens komt dragerschap van MRSA bij Nederlandse varkenshouders vele malen vaker voor dan bij de Nederlandse bevolking: 23-28% van de Nederlandse varkenshouders is drager van MRSA (Voss et al., 2005; Van den Broek et al., 2008), vergeleken met 0,03-0,1% van de Nederlandse bevolking (Wertheim et al., 2004; Nethmap, 2009). Dragerschap van ESBL-producerende bacteriën

wordt vooral gezien bij bewoners van verpleegtehuizen (Wiener et al., 1999; Rooney et al., 2009). Bij ziekenhuisbezoek of –opname van dragers van MRSA of ESBL-producerende bacteriën noodzaakt het risico van overdracht naar (kwetsbare) patiënten ziekenhuizen tot het nemen van voorzorgsmaatregelen zoals verpleging in quarantaine.

1.4 Antibioticaresistentie in het milieu

Bacteriën worden door mens en dier uitgescheiden en komen in zeer grote hoeveelheden in het milieu terecht, bijvoorbeeld door afspoeling van mest of via rioolwater. Rioolwater wordt na zuivering op oppervlaktewater geloosd. Als de verwijdering niet volledig is komen bacteriën, of bacterieel DNA, met het effluent in het oppervlaktewater terecht. Daarnaast komt bij hevige regenval ongezuiverd rioolwater direct in het milieu terecht, door riooloverstorten. Afhankelijk van het percentage resistente bacteriën in dierlijke en humane feces zal ook een deel van de bacteriën die in oppervlaktewater terechtkomen resistent zijn tegen antibiotica, en zal een deel van het bacteriële DNA dat aanwezig is in water resistentiegenen bevatten. Met andere woorden, het aquatische milieu dient als reservoir waarin antibioticaresistente bacteriën en resistentiegenen terechtkomen die door mens en dier worden uitgescheiden. In verschillende buitenlandse studies zijn resistente bacteriën aangetoond in afval- en oppervlaktewateren; een overzicht hiervan is weergegeven in Tabel 2. Andere studies hebben met behulp van moleculaire technieken resistentiegenen aangetoond in verschillende typen water (Zhang et al., 2009). Door direct contact met oppervlaktewater waarin zich antibioticaresistente bacteriën bevinden, bijvoorbeeld bij recreatie, maar ook wanneer mensen rechtstreeks in aanraking komen met op het land gebrachte bagger uit sloten in landbouwgebieden waarin antibioticaresistente bacteriën door sedimentatie terecht zijn gekomen, bestaan mogelijk risico's op transmissie.

Behalve als verzamelvat van antibioticaresistentie en indirecte transmissiebron speelt het aquatische milieu mogelijk ook een rol bij verspreiding van antibioticaresistentie tussen bacteriën onderling, doordat hier horizontale genoverdracht plaats kan vinden (Coughter en Stewart, 1989). Zo zouden genen kunnen worden uitgewisseld tussen dierlijke en humane bacteriën, maar ook milieubacteriën zouden op deze manier resistentiegenen kunnen verwerven en verder verspreiden (Genthner et al., 1988; Xu et al., 2007; Cattoir et al., 2008). Door mens en dier uitgescheiden bacteriën hebben in water een beperkte overlevingsduur, afhankelijk van verschillende milieufactoren (Flint, 1987; Rhodes en Kator, 1988; Scheurman et al., 1988; Davies en Evison, 1991; Korhonen en Martikainen, 1991; Davies et al., 1995; Fish en Pettibone, 1995; Sinton et al., 2002; Craig et al., 2004; Noble et al., 2004; Anderson et al., 2005; Tolba et al., 2008). De tijdsperiode waarin recent uitgescheiden antibioticaresistente bacteriën resistentiegenen aan andere bacteriën door kunnen geven zal hierdoor beperkt zijn (Muela et al., 1994; Arana et al., 1997). Eventuele verspreiding naar milieubacteriën heeft mogelijk verderstrekkende gevolgen omdat milieubacteriën in oppervlaktewater goed kunnen overleven en zich vermeerderen. Milieubacteriën zouden daarom een blijvend reservoir kunnen zijn van resistentiegenen, gevoed door bacteriën die door mens en dier worden uitgescheiden. Horizontale genoverdracht vindt voornamelijk plaats op plekken met hoge concentraties bacteriën, zoals in darmen (Kelly et al., 2009) en rioolwater (Schlüter et al., 2007). In welke mate dit proces plaatsvindt in oppervlaktewater of daarin aanwezige sedimenten of biofilms, is niet bekend.

Er zijn grote lokale verschillen te verwachten tussen oppervlaktewateren voor wat betreft het voorkomen van antibioticaresistente bacteriën, afhankelijk van de naburigheid van contaminatiebronnen en de mate van verdunning in het water. Naar verwachting is de prevalentie hoger in de buurt van gebieden met hoge concentraties aan grote veehouderijen, of in de buurt van rioolwaterzuiveringsinstallaties (RWZI's) van grote steden, grote ziekenhuizen of andere

zorginstellingen. Vervolgens kunnen de antibioticaresistente bacteriën en antibioticaresistentiegenen zich via het water verspreiden, bijvoorbeeld via sloten, rivieren en ballastwater van schepen.

Tabel 2 Antibioticaresistente bacteriën in afval- en oppervlaktewater beschreven in de literatuur

Bacterie-soort/ -genus/ -familie	Resistentie	Type water	Land	Referentie
<i>Enterococcus</i>	vancomycine	ziekenhuisafvalwater	Portugal	(Novais et al., 2005)
<i>Enterococcus</i>	vancomycine	ziekenhuisafvalwater/ stedelijk afvalwater/ oppervlaktewater	Zweden	(Iversen et al., 2002)
<i>Enterococcus</i>	vancomycine/ erythromycine	ziekenhuisafvalwater/ stedelijk afvalwater/ oppervlaktewater	Zweden, Spanje, UK	(Blanch et al., 2003)
<i>Enterococcus</i>	vancomycine	ziekenhuisafvalwater/ stedelijk afvalwater/ boerderijafvalwater	UK	(Caplin et al., 2008)
<i>Enterococcus</i> <i>E. coli</i>	diverse antibiotica	ziekenhuisafvalwater/ stedelijk afvalwater/ rivierwater/ agrarisch gebied	Frankrijk	(Servais en Passerat, 2009)
Enterobacteriaceae <i>Aeromonas</i>	diverse antibiotica	rivierwater	Spanje	(Goñi-Urriza et al., 2000)
<i>Enterococcus</i> Coliformen <i>Pseudomonas</i>	diverse antibiotica	stedelijk afvalwater/ grondwater	Duitsland	(Gallert et al., 2005)
<i>P. aeruginosa</i>	ciprofloxacine	ziekenhuisafvalwater/ stedelijk afvalwater/ rivierwater	Duitsland	(Schwartz et al., 2006)
<i>E. coli</i>	beta-lactams*	rivierwater	Korea	(Hong et al., 2004)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	beta-lactams*	ziekenhuisafvalwater	Brazilië	(Prado et al., 2008)
<i>S. aureus</i> CNS	Methicilline	zeewater	USA	(Soge et al., 2009)
CNS	diverse antibiotica	stedelijk afvalwater/ drinkwater	Portugal	(Faria et al., 2009)
diverse bacteriesoorten	diverse antibiotica	afvalwater antibiotica fabriek/ rivierwater	China	(Li et al., 2009)

*Door productie van extended spectrum beta-lactamase (ESBL).

1.5 Doel van het onderzoek

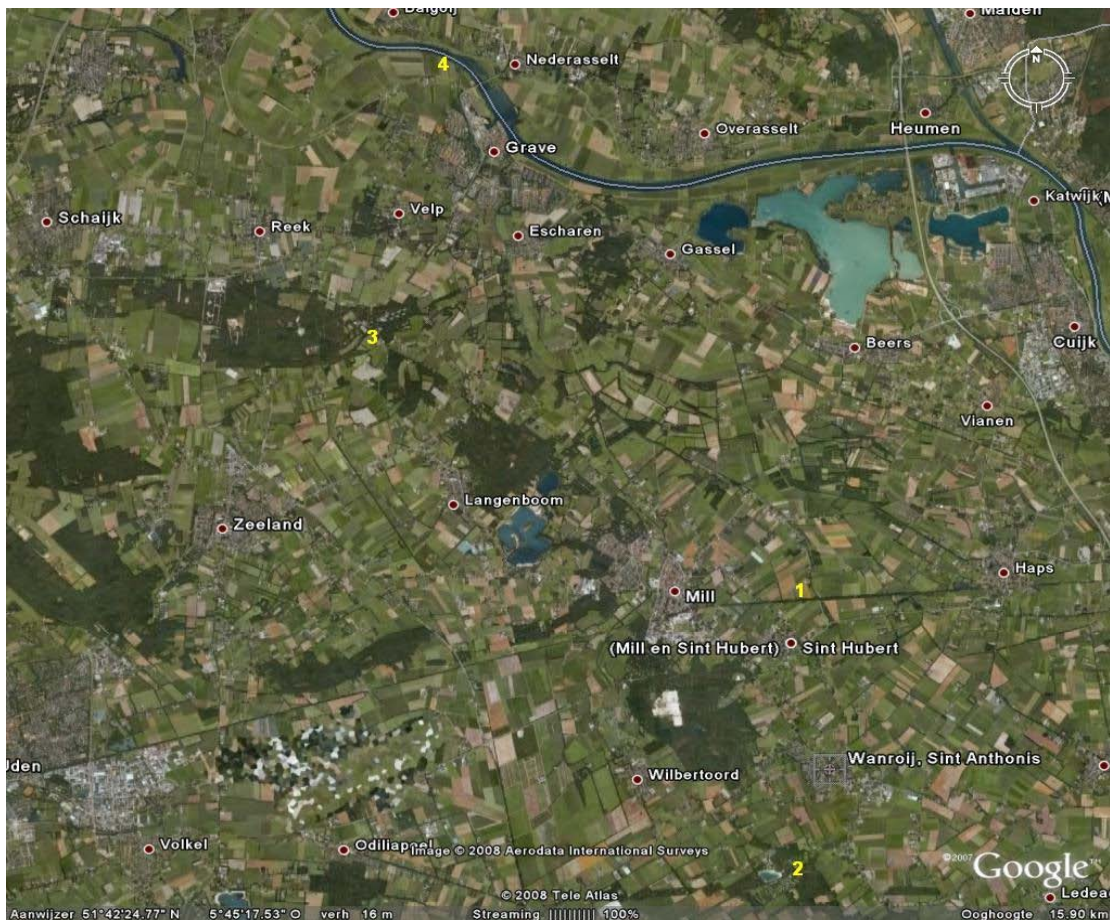
Om een indruk te krijgen van de prevalentie van antibioticaresistente bacteriën in het aquatische milieu in Nederland, is in 2006 en 2007 een inventariserend onderzoek uitgevoerd naar de aanwezigheid van antibioticaresistente bacteriën in oppervlaktewater en slib. Monsters werden genomen in de provincie Noord-Brabant, in de omgeving van Oss. In dit gebied bevinden zich veel veehouderijen. In 2006 bevonden zich in de totale provincie Noord-Brabant 5609 bedrijven met rundvee (635.391 stuks vee), 2759 bedrijven met varkens (4.969.258 stuks vee) en 595 bedrijven met kippen (25.636.276 stuks vee)

(CBS, 2010). In het onderzochte gebied werd in eerder RIVM-onderzoek, naar de emissie van diergeneesmiddelen en natuurlijke hormonen vanuit de intensieve veehouderij naar oppervlaktewater, met behulp van moleculaire methoden de aanwezigheid van antibioticaresistentiegenen aangetoond (Montforts et al., 2007). De monsters werden op vier verschillende locaties in het gebied tijdens het mestuitrijseizoen in 2006 genomen. De bemonsteringslocaties waren de rivieren de Lage Raam, de Hooge Raam (ook slibmonsters), en de Nieuwe Raammond vlak voordat deze de Maas in stroomt. Ook werd een beek bemonsterd die door een recreatieterrein stroomt dat zich aansluitend aan het gebied met veehouderijen bevindt, en die naar verwachting niet onder invloed staat van lozingen of afspoeling van mest van de veehouderijen. Alle monsters werden onderzocht op de aanwezigheid van de animale en humane commensalen en opportunisten *Escherichia coli*, intestinale enterococci en staphylococci, de animale en humane pathogenen *Salmonella* en *Campylobacter*, en de pathogene milieubacteriën *Clostridium*, *Aeromonas* en *Pseudomonas aeruginosa*. Van de geïsoleerde stammen werd een antibioticaresistentieprofiel bepaald om vast te stellen tegen welke antibiotica bij deze uit het milieu geïsoleerde bacteriën resistenties bestaan. De antibioticaresistentieprofielen werden bepaald met behulp van antibioticumpanelen die werden samengesteld op basis van de beschikbare gegevens over resistenties tegen en gevoeligheden voor diverse antibiotica bij bacteriën uit de verschillende onderzochte groepen.

2 Materiaal en methoden

2.1 Monsterneming

Monsters werden genomen in Noordoost-Brabant, uit de riviertjes Lage Raam, Hooge Raam, en de Nieuwe Raammond vlak voordat deze de Maas in stroomt, en een beek op recreatieterrein 'De Bergen' (Figuur 1). De locaties zijn bemonsterd op 8 februari 2006, en tussen 27 februari en 3 april 2006 één keer per week (27 feb, 6 mrt, 13 mrt, 20 mrt, 27 mar, 3 apr). Watermonsters (5 liter) werden genomen volgens NEN 6559 (Anonymous, 1992) en gekoeld getransporteerd naar het laboratorium. Analyse vond binnen 24 uur na monsterneming plaats. Voor bemonstering van slib uit de Hoge Raam werd gebruikgemaakt van een zuigstang. Per monsterneming werden meerdere monsters slib opgezogen die in een emmer werden samengevoegd en gemengd. Hiervan werd minimaal 100 gram in een glazen pot gebracht en gekoeld naar het laboratorium getransporteerd.



Figuur 1 Bemonsteringslocaties: 1) Lage Raam (51°40'53 N, 5°49'16 O), 2) Recreatieterrein De Bergen (51°38'29 N, 5°48'46 O), 3) Hooge Raam (51°43'31 N, 5°42'33 O), 4) Nieuwe Raammond (51°46'09 N, 5°43'50 O)

2.2 Analyses

2.2.1 Water en slib

Water- en slibmonsters werden onderzocht op de aanwezigheid van *Salmonella*, *Campylobacter*, *E. coli*, intestinale enterococconen, staphylococconen, *Aeromonas*, *Clostridium* en *P. aeruginosa*, volgens de in Bijlage 1 aangegeven NEN-normen en SOPs, waarbij gebruik werd gemaakt van de eveneens in deze tabel aangegeven kweekmedia. Voor de analyse van slib werd 25 g slib opgenomen in 225 ml Brain Heart Infusion broth (Oxoid CM0225) en 1 min gehomogeniseerd door te vortexen. Vervolgens werd 1 min bij 200-300g gecentrifugeerd en werd van het verkregen supernatant 1 en 10 ml afgepipetteerd voor de verschillende membraanfiltraties.

De aanwezigheid van *Clostridium* is slechts onderzocht in één van de monsters (3 april). De monsters van 8 februari zijn alleen onderzocht op de aanwezigheid van enterococconen, *Campylobacter*, *Aeromonas* en *Salmonella*; alleen de *Campylobacter*-isolaten uit dit monster zijn gebruikt voor verdere analyses.

2.2.2 Isolatie en typering van bacteriestammen

Per monsterneming werden per monster en per parameter maximaal tien karakteristieke kolonies geïsoleerd. Isolaten werden afgeënt op Tryptone Soy Slant agar (Oxoid TV5051i) en na incubatie bewaard in de koelkast bij 2-8 °C. Verdachte kolonies werden geïdentificeerd tot op species-niveau door middel van API 20E (*E. coli*), API Staph (staphylococconen), API 20Strep (enterococconen) en API 20A (*Clostridium*) identificatiestrips (BioMerieux, Boxtel). *Aeromonas*-stammen werden tot op genusniveau bevestigd door middel van API 20E strips, of tot op species-niveau geïdentificeerd door middel van aanvullende tests conform NEN 6263 (Anonymous, 1989). Identificatie van de *Campylobacter*-isolaten werd uitgevoerd door het Laboratorium voor Infectieziekten en Screening (LIS) van het RIVM. Voor enterococconen en staphylococconen zijn de resultaten met API-strips moleculair bevestigd met behulp van 16S rDNA sequentieanalyse door het LIS. Bij afwijkende resultaten tussen API-strips en moleculaire analyse zijn de resultaten van de moleculaire analyse als doorslaggevend beschouwd. Voor alle door middel van sequentieanalyse geïdentificeerde *Staphylococcus*-isolaten en voor 156 van de 164 *Enterococcus*-isolaten was er 100% sequentiehomologie met de betreffende soorten. In de overige 8 gevallen was er 99,6 of 99,8% homologie. Voor *E. coli*, *Aeromonas*, en *Clostridium* zijn voor antibioticumgevoeligheidsanalyses alleen de isolaten meegenomen waarvan de identificatiestrips een uitslag gaven met een waarschijnlijkheid $\geq 90\%$.

2.2.3 Antibioticumgevoeligheidsbepaling

De gevoeligheid van de geïsoleerde bacteriestammen voor verschillende antibiotica werd bepaald door middel van micro-bouillonverdunding met behulp van het Sensititre Sensitouch-systeem (TREK, MCS Diagnostics, Swalmen). Deze methode maakt gebruik van microtiterplaten die een aantal verschillende antibiotica bevatten in verschillende concentratiereeksen. In Bijlage 2 is het gevolgde protocol opgenomen. Voor Gram-negatieve bacteriën bevatten de Sensititre MIC-platen cefotaxime, trimethoprim, ciprofloxacine, tetracycline, sulfamethoxazole en ampicilline; voor Gram-positieve bacteriën erythromycine, vancomycine, sulfamethoxazole/trimethoprim, oxacilline en salinomycine (zie Bijlage 3). De antibioticumgevoeligheidsprofielen van de geïsoleerde *Campylobacter*-stammen zijn door het Centraal Veterinair Instituut van Wageningen UR in Lelystad bepaald, ook met behulp van het Sensititre Sensitouch-systeem. Het geteste panel van antibiotica bestond uit: erythromycine, gentamicine, streptomycine, neomycine, tetracycline, ciprofloxacine, nalidixinezuur, tulathromycine, ampicilline, clarythromycine, sulfamethoxazole en chloramphenicol.

Naast de antibiotica in de Sensititre MIC-platen werden voor sommige bacteriesoorten aanvullende gevoeligheidsbepalingen uitgevoerd met behulp van Etesten (Biomerieux, Boxtel), toegepast volgens de gebruiksaanwijzing van de fabrikant. Op deze manier werden *E. coli*-isolaten getest voor streptomycine en chloramphenicol, *P. aeruginosa*-isolaten voor meropenem en imipenem, staphylococcon voor ciprofloxacine en clindamycine, en enterococcon voor quinupristine/ dalfopristine. De concentratierange die met de verschillende Etesten onderzocht werd, is in Bijlage 3 weergegeven. Voor *E. coli*-isolaten is de gevoeligheid voor sulfamethoxazole bevestigd door middel van Etest, omdat het eindpunt in de Sensititre-platen soms lastig af te lezen was. Omdat na het uitvoeren van beide testen de resultaten verkregen met de Etest betrouwbaarder bleken, zijn deze gebruikt voor verdere analyse. Sommige isolaten waren afgestorven in het tijdsinterval tussen beide testen; isolaten die om deze reden niet door middel van Etest geanalyseerd konden worden, zijn van verdere analyse uitgesloten. Ook voor een selectie van de *Aeromonas*-isolaten is sulfamethoxazole-gevoeligheid bepaald door middel van sensititre en Etest. Voor *Aeromonas*-isolaten bleken geen discrepanties tussen beide methoden en zijn de resultaten verkregen met behulp van Sensititre gebruikt voor verdere analyse.

2.2.4 Minimal Inhibitory Concentration (MIC)

Voor elke isolaat-antibioticumcombinatie werd de ‘Minimal Inhibitory Concentration’ (MIC) vastgesteld. De MIC is gedefinieerd als de laagste concentratie van een antibioticum waarbij geen zichtbare groei meer optreed. In de microbouillon-verdunningsmethode wordt gebruikt gemaakt van tweevoudige verdunningen, terwijl bij Etests ook tussenliggende concentraties worden getest. Om resultaten die verkregen waren met de twee verschillende methoden te kunnen vergelijken werden de MIC-waarden die bepaald waren met Etests naar boven afgerond naar de dichtstbijgelegen tweevoudige verdunning. Per bacteriegenus of -species is voor elk antibioticum de MIC-verdeling bepaald, uitgedrukt in percentages isolaten per MIC-waarde.

2.2.5 Berekening percentage resistente stammen

Om te bepalen of isolaten resistent zijn tegen een antibioticum wordt gebruikgemaakt van zogenaamde MIC-breakpoints. Isolaten die groeien bij een hogere antibioticumconcentratie dan het breakpoint worden als resistent beschouwd. Isolaten met een MIC-waarde lager dan het breakpoint worden als gevoelig beschouwd. Voor het bepalen van resistentie kan gebruik worden gemaakt van de epidemiologische cut-offwaarden of van klinische break-points (Anonymous, 1989; Dalhoff et al., 2009; EUCAST, 2010). Een MIC-waarde boven de epidemiologische cut-offwaarde geeft aan dat een stam minder gevoelig is dan wildtype, of oorspronkelijke, stammen, wat betekent dat het mutaties heeft ontwikkeld en/of genen heeft verworven die (relatieve) resistentie tegen een antibioticum geven. Een MIC-waarde boven het klinische breakpoint geeft aan dat bij infectie met de betreffende stam de kans op succes van een behandeling zeer klein is. Een klinisch breakpoint is niet alleen gebaseerd op de relatieve gevoeligheid van een bacteriestam voor een bepaald antibioticum, maar ook de farmacokinetiek van het antibioticum en ervaringen voor wat betreft de uitkomst van behandeling. Een bacteriestam die resistent is ten opzichte van wild-type stammen, is niet noodzakelijkerwijs resistent vanuit klinisch oogpunt. Voor de huidige studie zijn, indien beschikbaar, epidemiologische cut-offwaarden gebruikt voor het berekenen van resistentie, omdat op deze manier inzicht verkregen wordt in het percentage bacteriën dat antibioticaresistentie mutaties en/of genen verworven heeft. Klinische breakpoints worden waar relevant (en beschikbaar) ter aanvulling vermeld. Voor beide typen breakpoints zijn zo veel mogelijk de waarden zoals beschreven door EUCAST gebruikt; andere bronnen voor klinische breakpoints waren het Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), of wetenschappelijke publicaties. Gebruikte breakpoints zijn voor elke bacteriesoort en antibioticumcombinatie met de bronvermelding weergegeven in Bijlage 4.

3 Resultaten

Op de vier locaties, Lage Raam, Hooge Raam, Nieuwe Raammond, en de beek op het recreatieterrein, werden bacteriën behorend tot alle onderzochte species of genera aangetroffen (Tabel 3), met uitzondering van *Salmonella*: bacteriën uit dit genus werden niet gevonden. Daarnaast werd in het slib uit de Hooge Raam geen *P. aeruginosa* en staphylococconen gevonden, hoewel deze wel in watermonsters van deze rivier werden aangetroffen. In totaal konden 692 isolaten op species of genus gebracht worden (Tabel 3). Van 614 (89%) van deze isolaten is een antibioticumprofiel verkregen. Van de overige isolaten kon óf geen antibioticaresistentieanalyse gedaan worden omdat isolaten waren afgestorven in het tijdsinterval tussen opslag en identificatie, of omdat er geen betrouwbare resultaten werden verkregen.

Tabel 3 Aantal geïsoleerde en geïdentificeerde stammen uit oppervlaktewater en slib

Bacterie genus/species	Aantal bevestigde isolaten (Geïdentificeerd tot op genus/species)				Aantal met antibioticumprofiel
	Rivieren	Beek	Slib	Totaal	Totaal
<i>Escherichia coli</i>	128	53	19	200	171*
<i>Aeromonas</i>	158	52	19	229	204
staphylococconen	24	2	0	26	16
enterococconen	129	27	15	171	164
<i>Pseudomonas</i>	17	12	0	29	22
<i>Clostridium</i>	7	1	5	13	8
<i>Campylobacter</i>	21	2	1	24	23
<i>Salmonella</i>	0	0	0	0	0
Totaal	469	149	57	692	614

*122 isolaten voor sulfamethoxazole

Van de meeste bacteriegenera of -species waren er uiteindelijk onvoldoende isolaten met een bruikbaar antibioticumprofiel om de drie rivieren Lage Raam, Hooge Raam en Nieuwe Raammond afzonderlijk te kunnen vergelijken. Voor de verdere gegevensverwerking werden deze rivieren dan ook als één locatie beschouwd, namelijk locatie 'rivieren'. Uitspraken over MIC-verdelingen en percentages resistente stammen voor het geanalyseerde oppervlaktewater zijn daardoor betrouwbaarder. De ligging van de afzonderlijke locaties rechtvaardigt het samenvoegen: de afzonderlijke locaties staan waarschijnlijk op een vergelijkbare wijze onder invloed van afvalwaterlozingen of afspoeling van mest van veehouderijen in het onderzochte gebied. Bovendien bleek dat voor de soorten waarvan de meeste isolaten waren geanalyseerd, namelijk *Aeromonas*, en *E. coli*, de percentages resistente stammen geïsoleerd uit Lage Raam, Hooge Raam en Nieuwe Raammond vergelijkbaar waren (resultaten niet getoond). Voor de bacteriesoorten waarvan lage aantallen isolaten waren verkregen (staphylococconen, *P. aeruginosa*, *Clostridium*, en *Campylobacter*), zijn voor resistentieanalyses isolaten uit alle monsters samengevoegd.

In het vervolg van dit hoofdstuk worden de gevonden MIC-verdelingen en percentages resistente stammen per bacteriegenus of -species besproken. Omdat de geïsoleerde stammen afkomstig zijn uit een gebied met intensieve veeteelt zijn de percentages resistente stammen vergeleken met de resistenties van bacteriestammen behorend tot overeenkomstige species of genera die in 2006 en 2007

geïsoleerd zijn uit de darmen van (slacht)varkens, vleeskalveren, vleeskuikens en melkvee in Nederland, voor zover deze data bekend zijn.

3.1 Commensalen en opportunistische bacteriën

3.1.1 *Escherichia coli*

Uit de verschillende oppervlaktewater- en slibmonsters waren 200 isolaten verkregen die door middel van API20E bevestigd waren als *E. coli*-stammen. Voor 177 van deze isolaten zijn antibioticum-resistentieprofielen verkregen. In Tabel 4 is voor deze isolaten per milieucompartiment de gevoeligheid voor elk getest antibioticum als MIC-verdelingen weergegeven. Een grafische weergave van deze MIC-verdelingen is te zien in Bijlage 5.

Tabel 4 MIC-verdelingen (in %) voor *E. coli*-isolaten uit rivieren, beek, en slib uit de Hooge Raam voor verschillende antibiotica (concentraties in mg/L), alsmede het percentage resistente isolaten (R%)

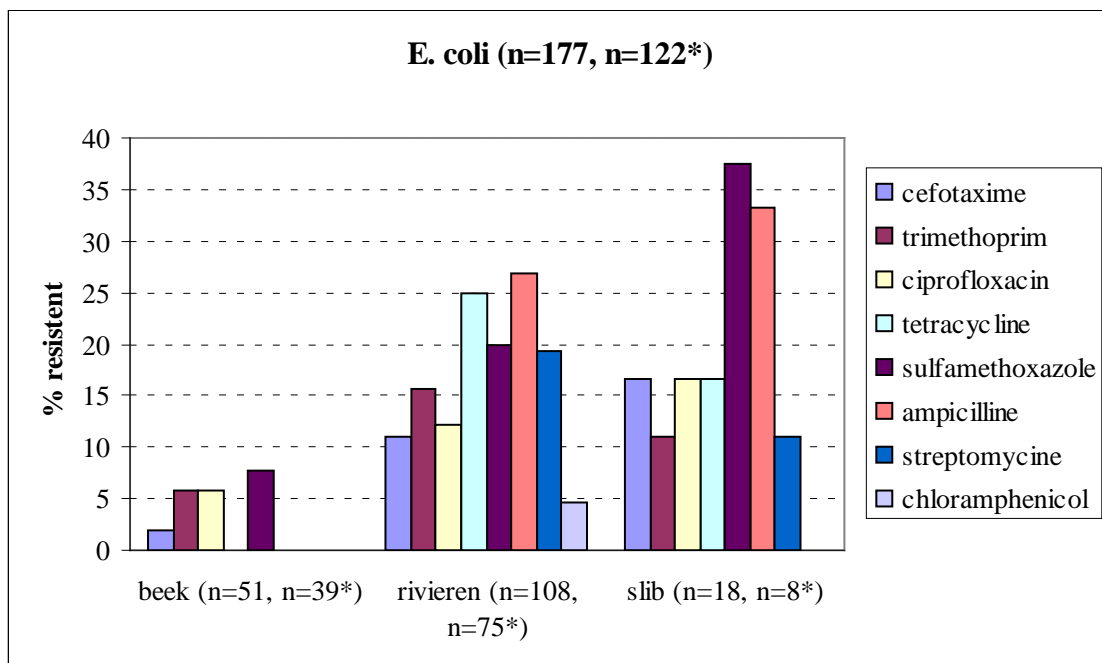
rivieren (n=108)	MIC (%) verdeling mg/L															R%	
	0,06	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024		2048
cefotaxime		81,5	7,4	6,5	0	0	2,8	0	0,9	0,9							11,1
trimethoprim				49,1	31,5	3,7	2,8	0,9	0	0	0	12,0					15,7
ciprofloxacine	87,0	3,7	5,6	0,9	0	0	0	1,9									12,1
tetracycline					22,2	36,1	14,8	1,9	0,9	0	1,9	17,6	4,6				25,0
sulfamethoxazole*								0,0	0,0	32,0	38,7	8,0	1,3	0,0	0,0	20,0	20,0
ampicilline				0	0,9	40,7	29,6	1,9	0,9	0,9	25,0						26,9
streptomycine	0	0	0	0	0	2,8	31,5	42,6	3,7	3,7	3,7	1,9	6,5	3,7	0		19,4
chloramphenicol	0	0	0	0	0	0,9	45,4	47,2	1,9	0	2,8	0	0	1,9			4,6
beek (n=51)	0,06	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	R%
cefotaxime		88,2	9,8	2,0	0	0	0	0	0								2,0
trimethoprim				62,7	27,5	3,9	3,9	0	0	2,0	0						5,9
ciprofloxacine	94,1	3,9	2,0	0	0	0	0	0									5,9
tetracycline					33,3	52,9	13,7	0	0	0	0	0					0
sulfamethoxazole*								0,0	0,0	30,8	56,4	5,1	0,0	0,0	0,0	7,7	7,7
ampicilline				0	0	68,6	29,4	2,0	0	0							0
streptomycine	0	0	0	0	0	19,6	58,8	21,6	0	0	0	0	0	0	0	0	0
chloramphenicol	0	0	0	0	0	52,9	45,1	2,0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
slib (n=18)	0,06	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	R%
cefotaxime		66,7	16,7	0	0	16,7	0	0	0								16,7
trimethoprim				33,3	33,3	22,2	0	11,1	0	0	0						11,1
ciprofloxacine	83,3	16,7	0	0	0	0	0	0									16,7
tetracycline					33,3	44,4	5,6	0	0	0	0	11,1	5,6				16,7
sulfamethoxazole*								0,0	0,0	12,5	37,5	12,5	0,0	0,0	0,0	37,5	37,5
ampicilline				0	16,7	22,2	16,7	11,1	22,2	0	11,1						33,3
streptomycine	0	0	0	0	0	0	33,3	33,3	22,2	0	11,1	0	0	0	0	0	11,1
chloramphenicol	0	0	0	0	22,2	0	38,9	33,3	5,6	0	0	0	0				0

De witte gebieden geven de verdunningsreeks aan die voor elk antibioticum getest is. Waarden boven deze range geven een MIC-waarde hoger dan de hoogste geteste concentratie aan. Waarden bij de laagst geteste concentratie geven aan dat de MIC-waarde kleiner is dan of gelijk is aan de laagste geteste concentratie. Verticale lijnen geven de epidemiologische cut-offwaarden weer. Onderbroken verticale lijnen geven klinische breakpoints weer. Bij afwezigheid van een onderbroken verticale lijn is het klinische breakpoint gelijk aan de epidemiologische cut-off (tetracycline, ampicilline) of niet bekend (streptomycine, chloramphenicol). Voor sulfamethoxazole is geen epidemiologische cut-off bekend. Zie voor de gebruikte bronnen voor breakpoints Bijlage 4.

* voor sulfamethoxazole bedroeg het aantal geteste isolaten: riviertjes n=75, beek n=39, slib n=8.

De percentages resistente *E. coli*-stammen geïsoleerd uit de verschillende milieucompartimenten zijn ook weergegeven in Figuur 2. Percentages resistentie werden gebaseerd op de epidemiologische cut-

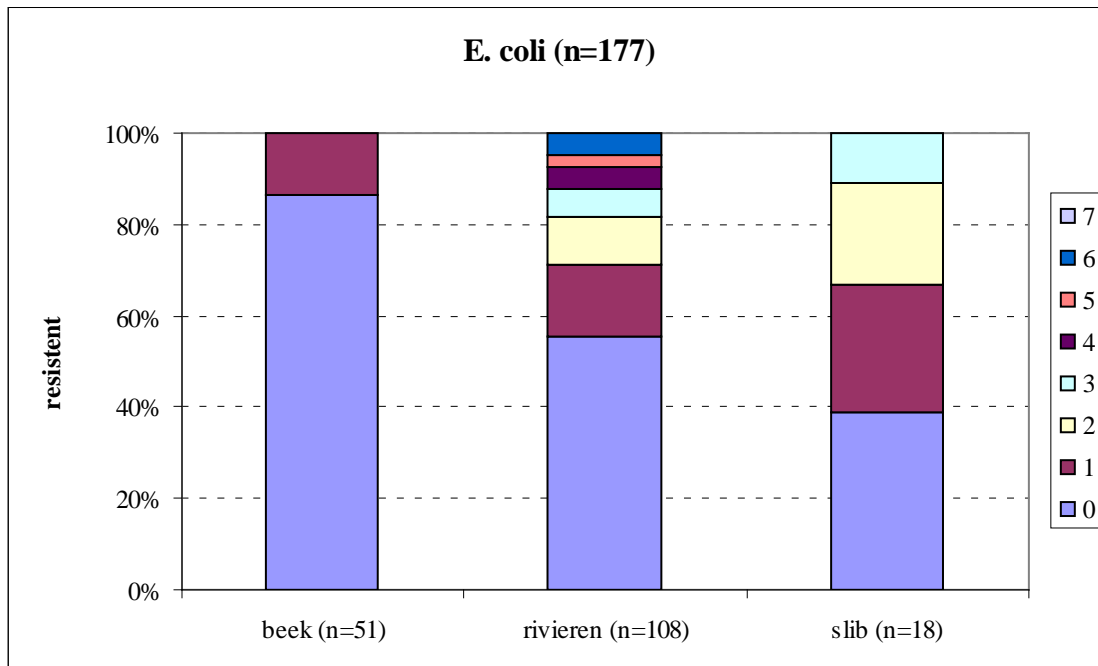
offwaarden (zie Bijlage 4). Bij de isolaten uit de rivieren (water en slib) werden resistenties tegen alle onderzochte antibiotica waargenomen. De meest voorkomende waren resistenties tegen ampicilline, tetracycline, sulfamethoxazole en streptomycine. Ook werden cefotaxime-resistente *E. coli*-stammen aangetroffen, wat er op kan wijzen dat deze stammen 'extended-spectrum beta-lactamases' (ESBLs) produceren (CDC, 2009). In het slib werd vooral sulfamethoxazole- en ampicillineresistentie gevonden, maar geen resistentie tegen chloramphenicol, en vergeleken met de rivieren weinig resistentie tegen streptomycine. In de beek op het recreatieterrein werden in het algemeen lagere percentages resistente stammen gevonden dan in de rivieren en het slib. Hier werd geen resistentie gevonden tegen tetracycline, ampicilline, streptomycine en chloramphenicol.



Figuur 2 Percentages resistente *E. coli*-stammen uit oppervlaktewater (rivieren, beek) en slib in Noordoost-Brabant

*aantal getest voor sulfamethoxazole.

De percentages gevoelige, mono-resistente en multi-resistente *E. coli*-stammen zijn weergegeven in Figuur 3. In deze analyse is resistentie tegen sulfamethoxazole buiten beschouwing gelaten omdat er niet voor alle isolaten gegevens beschikbaar waren. Van alle onderzochte *E. coli*-stammen was 44% van alle isolaten uit de rivieren en 61% van alle isolaten uit het slib resistent tegen één of meerdere van de zeven geteste antibiotica. Multi-resistentie werd waargenomen bij 29% en 33% van alle stammen uit respectievelijk rivieren en slib. In de beek op het recreatieterrein werden aanzienlijk minder resistente stammen aangetroffen, namelijk 14%, en geen multi-resistente stammen. In de rivieren werden *E. coli*-stammen (4,6%) gevonden die minstens 6 verschillende resistenties hadden. Eén van deze isolaten kon ook getest worden voor sulfamethoxazole en bleek ook hiertegen resistent. Stammen die uit het slib waren geïsoleerd hadden maximaal drie resistenties.



Figuur 3 Percentages gevoelige, mono-resistente en multi-resistente *E. coli*-isolaten gevonden in oppervlaktewater (rivieren, beek) en slib in Noordoost-Brabant

Resistentie tegen sulfamethoxazole is buiten beschouwing gelaten omdat hierover niet voor alle isolaten informatie beschikbaar was.

3.1.2 Enterococcen

Uit de verschillende monsters zijn in totaal 171 enterococcestammen bevestigd en op soort gebracht door middel van API 20Strep en 16S rDNA-sequentieanalyse. Bij de identificatie op soortniveau bestonden soms discrepanties tussen beide methoden (resultaten niet getoond). In die gevallen werden de resultaten van de 16S analyse als doorslaggevend beschouwd. Uit de onderzochte monsters zijn zowel *E. faecium*, *E. faecalis* als enkele andere *Enterococcus* species geïsoleerd (Tabel 5). Voor 164 van de 171 *Enterococcus* isolaten werd een bruikbaar antibioticumprofiel verkregen.

Voor *E. faecium* en *E. faecalis* zijn de beschikbare gegevens voor wat betreft antibioticagevoeligheid van wildtype stammen en breakpoints zeer uitgebreid (EFSA, 2008; EUCAST, 2010). Voor de overige gevonden soorten zijn geen of nauwelijks gegevens beschikbaar. In paragraaf 3.1.2.1 zijn de resultaten met betrekking tot antibioticumgevoeligheid van de *E. faecium*- en *E. faecalis*-stammen uit het milieu beschreven. Resistenties werden gebaseerd op de epidemiologische cut-offwaarden (Bijlage 4). Voor oxacilline is (nog) geen epidemiologische cut-offwaarde beschikbaar en dit antibioticum is voor geen van de *Enterococcus*-soorten meegenomen in resistentieanalyses. Voor *E. faecalis* is er (nog) geen epidemiologische cut-offwaarde beschikbaar voor sulfamethoxazole/ trimethoprim en quinupristin/ dalfopristin. In de berekening van het percentage resistente stammen is voor quinupristine/dalfopristine de voorlopige cut-offwaarde van 32 mg/L gebruikt zoals geadviseerd door EFSA (EFSA 2008). Voor sulfamethoxazole/trimethoprim is de cut-offwaarde van *E. faecium* gebruikt.

Paragraaf 3.1.2.2 beschrijft de resultaten voor *E. durans*, *E. hirae*, en de overige gevonden soorten. De overige *Enterococcus*-soorten zijn gezamenlijk geanalyseerd. Voor het bepalen van percentages resistentie zijn de epidemiologische cut-offwaarden van *E. faecium* en *E. faecalis* gebruikt.

Tabel 5 *Enterococcus*-soorten met antibioticumprofiel geïsoleerd uit de onderzochte rivieren, beek en monsters slib in Noordoost-Brabant

Enterococcus species	Aantal geïsoleerd uit (%)			
	Rivieren	Beek	Slib	Totaal
<i>E. caccae/moraviensis/silesiacus*</i>	1 (0,8)	0 (0)	0 (0)	1 (0,6)
<i>E. casseliflavus (=E. flavescens)</i>	7 (5,6)	1 (3,7)	1 (7,7)	9 (5,5)
<i>E. durans</i>	21 (17)	7 (26)	1 (7,7)	29 (18)
<i>E. faecalis</i>	18 (15)	13 (48)	1 (7,7)	32 (20)
<i>E. faecium</i>	52 (42)	5 (19)	7 (54)	64 (39)
<i>E. gilvus</i>	1 (0,8)	0 (0)	0 (0)	1 (0,6)
<i>E. hirae</i>	16 (13)	0 (0)	3 (23)	19 (12)
<i>E. mundtii</i>	8 (6,5)	1 (3,7)	0 (0)	9 (5,5)
Totaal	124 (100)	27 (100)	13 (100)	164 (100)

*Gebaseerd op 16S-sequentie kon geen onderscheid gemaakt worden tussen *E. caccae*, *E. moraviensis* of *E. silesiacus*.

3.1.2.1 *Enterococcus faecium* en *Enterococcus faecalis*

De gevoeligheid van de *E. faecium*- en *E. faecalis*-isolaten uit oppervlaktewater en slib voor de verschillende antibiotica zijn weergegeven in MIC-verdelingen in Tabellen 6 en 7. Een grafische weergave van deze MIC-verdelingen is te zien in Bijlagen 6 en 7. Om de resultaten te kunnen vergelijken met soorten waarvan minder isolaten beschikbaar waren, zijn voor *E. faecium* en *E. faecalis* ook de MIC-verdelingen voor het totale aantal uit water- en slibmonsters geïsoleerde stammen weergegeven. De percentages resistente *E. faecium*- en *E. faecalis*-stammen die gevonden werden in de verschillende milieucompartimenten zijn weergegeven in Figuur 4.

Ongeveer twee derde van alle gevonden *E. faecium*-stammen was resistent tegen quinupristine/dalfopristine, en ongeveer de helft was resistent tegen tetracycline. Daarnaast was een aanzienlijk deel resistent tegen erythromycine en sulfamethoxazole/trimethoprim. Er was geen duidelijk verschil in de waargenomen resistenties tussen de rivieren en de beek op het recreatieterrein, met uitzondering van salinomycine resistentie, wat wel in de rivieren en niet in de beek werd waargenomen. In het slib werden tegen minder van de geteste antibiotica resistenties gevonden dan in de rivieren en de beek. Resistentie tegen tetracycline, erythromycine en sulfamethoxazole/trimethoprim kwam frequent voor onder de *E. faecalis*-stammen uit de rivieren en de beek. In tegenstelling tot *E. faecium* werden er geen *E. faecalis*-stammen gevonden die resistent waren tegen quinupristine/dalfopristine of salinomycine. Er waren geen duidelijke verschillen tussen percentages resistente *E. faecalis*-stammen uit de rivieren en de beek.

Tabel 6 MIC-verdelingen (in %) voor *E. faecium*-isolaten uit rivieren, beek, en slib voor verschillende antibiotica (concentraties in mg/L), alsmede het percentage resistente isolaten (R%)

totaal (n=64)	MIC (%) verdeling mg/L															% R	
	0,06	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024		2048
erythromycine			6,3	10,9	21,9	32,8	1,6	0	0	0	26,6						26,6
vancomycine				15,6	62,5	10,9	10,9	0	0	0	0	0					0,0
tetracycline		0	29,7	20,3	0	0	0	0	0	50,0							50,0
salinomycine				3,1	71,9	3,1	17,2	4,7	0	0	0	0					4,7
quinu/dalfopristin			1,6	12,5	23,4	26,6	28,1	6,3	0	0	1,6						62,5
sulfa/trimeth*			68,8	10,9	1,6	0	0	0	1,6	17,2							18,8
oxacilline			1,6	0	6,3	1,6	9,4	12,5	21,9	18,8	28,1						
rivieren (n=52)	0,06	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	% R
erythromycine			5,8	9,6	17,3	36,5	1,9	0,0	0,0	0,0	28,8						28,8
vancomycine				15,4	63,5	9,6	11,5	0,0	0,0	0,0	0,0						0,0
tetracycline		0,0	26,9	23,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	50,0							50,0
salinomycine				1,9	67,3	3,8	21,2	5,8	0,0	0,0	0,0						5,8
quinu/dalfopristin			1,9	15,4	23,1	25,0	25,0	7,7	0,0	0,0	1,9						59,6
sulfa/trimeth*			65,4	11,5	1,9	0,0	0,0	0,0	1,9	19,2							21,2
oxacilline			1,9	0,0	1,9	1,9	5,8	13,5	26,9	21,2	26,9						
beek (n=5)	0,06	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	% R
erythromycine			0	40,0	20,0	20,0	0	0	0	0	20,0						20
vancomycine				20,0	80,0	0	0	0	0	0	0						0
tetracycline		0	60,0	0	0	0	0	0	0	40,0							40
salinomycine				0	100	0	0	0	0	0	0						0,0
quinu/dalfopristin			0	0	20,0	60,0	20,0	0	0	0	0						80
sulfa/trimeth*			80,0	0	0	0	0	0	0	20,0							20
oxacilline			0	0	60,0	0	0	0	0	0	40,0						
slib (n=7)	0,06	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	% R
erythromycine			14,3	0	57,1	14,3	0	0	0	0	14,3						14,3
vancomycine				14,3	42,9	28,6	14,3	0	0	0	0						0,0
tetracycline		0	28,6	14,3	0	0	0	0	0	57,1							57,1
salinomycine				14,3	85,7	0	0	0	0	0	0						0,0
quinu/dalfopristin			0	14,3	28,6	57,1	0	0	0	0	0						57,1
sulfa/trimeth*			85,7	14,3	0	0	0	0	0	0	0						0,0
oxacilline			0	0	0	0	42,9	14,3	0	14,3	28,6						

De witte gebieden geven de verdunningsreeks aan die voor elk antibioticum getest is. Waarden boven deze range geven een MIC-waarde hoger dan de hoogste geteste concentratie aan. Waarden bij de laagst geteste concentratie geven aan dat de MIC-waarde kleiner is dan of gelijk is aan de laagste geteste concentratie. Verticale lijnen geven de epidemiologische cut-offwaarden weer. Onderbroken horizontale lijnen geven klinische breakpoints weer. Bij afwezigheid van een onderbroken verticale lijn is het klinische breakpoint gelijk aan de epidemiologische cut-off (erythromycine), niet bekend (sulfamethoxazole/trimethoprim), of niet van toepassing (salinomycine). Zie voor de gebruikte bronnen voor breakpoints Bijlage 4.

* sulfamethoxazole/trimethoprim

Tabel 7 MIC-verdelingen (in %) voor *E. faecalis*-isolaten uit rivieren, beek en slib voor verschillende antibiotica (concentraties in mg/L), alsmede het percentage resistente isolaten (R%)

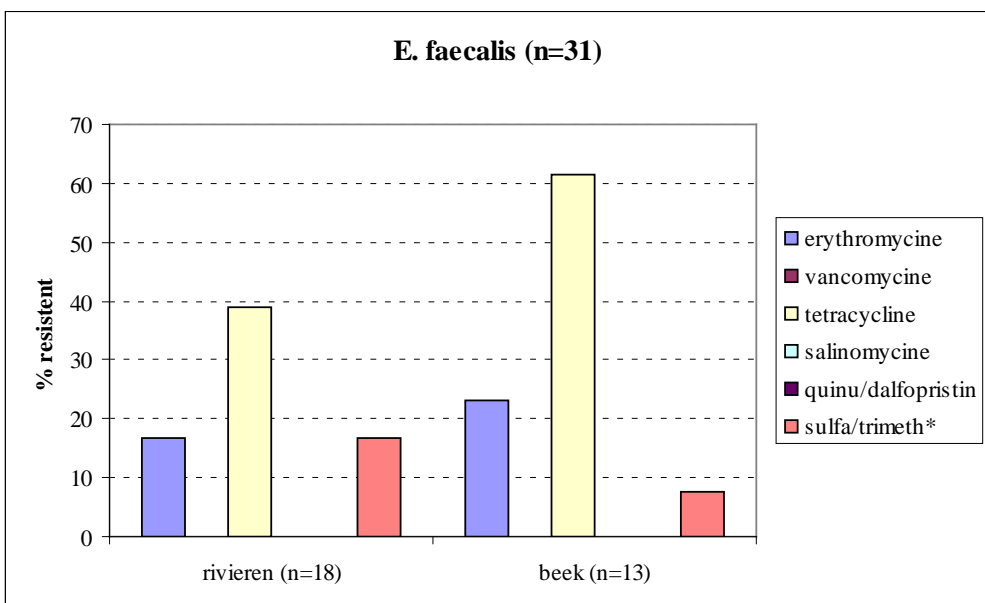
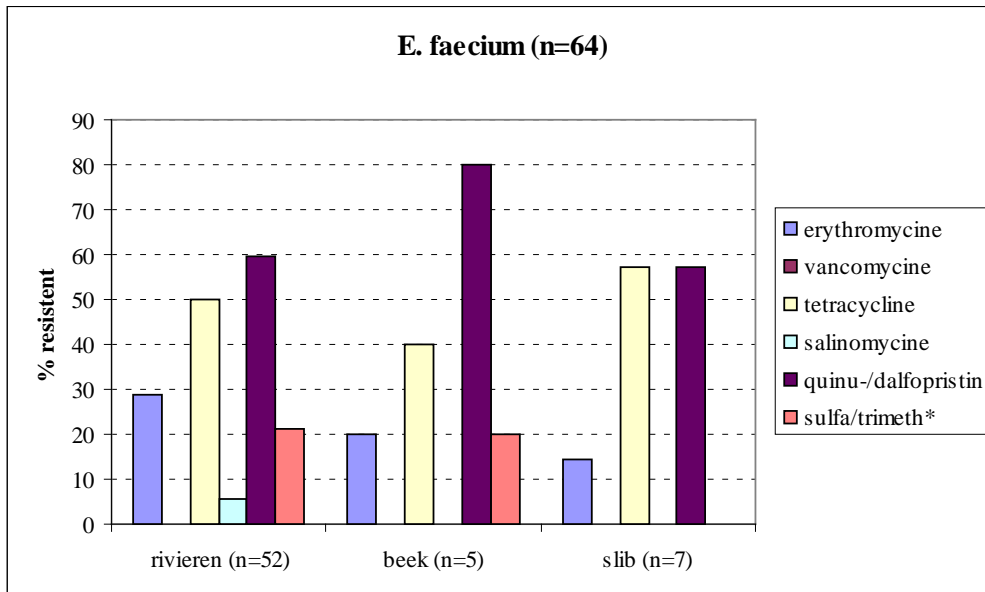
totaal (n=32)	MIC (%) verdeling mg/L															% R	
	0,06	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024		2048
erythromycine			28,1	12,5	9,4	31,3	0	0	0	0	18,8						18,8
vancomycine				0	25,0	59,4	15,6	0	0	0	0	0					0
tetracycline		0	9,4	34,4	9,4	0	0	0	0	46,9							46,9
salinomycine				25	71,9	3,1	0	0	0	0	0	0					0
quinu/dalfopristin			100	0	0	0	0	0	0	0	0						0
sulfa/trimeth*			87,5	0	0	0	0	3,1	0	9,4							12,5
oxacilline			0	0	0	0	0	3,1	62,5	28,1	6,3						

rivieren (n=18)	0,06	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	% R
erythromycine			16,7	22,2	11,1	33,3	0	0	0	0	16,7						16,7
vancomycine				0	16,7	61,1	22,2	0	0	0	0						0
tetracycline		0	5,6	44,4	11,1	0	0	0	0	38,9							38,9
salinomycine				27,8	66,7	5,6	0	0	0	0	0						0
quinu/dalfopristin			100	0	0	0	0	0	0	0	0						0
sulfa/trimeth*			83,3	0	0	0	0	0	0	16,7							16,7
oxacilline			0	0	0	0	0	5,6	77,8	16,7	0						

beek (n=13)	0,06	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	% R
erythromycine			38,5	0	7,7	30,8	0	0	0	0	23,1						23,1
vancomycine				0	38,5	61,5	0	0	0	0	0						0
tetracycline		0	15,4	23,1	0	0	0	0	0	61,5							61,5
salinomycine				23,1	76,9	0	0	0	0	0	0						0
quinu/dalfopristin			100	0	0	0	0	0	0	0	0						0
sulfa/trimeth*			92,3	0	0	0	0	7,7	0								7,7
oxacilline			0	0	0	0	0	0	46,2	38,5	15,4						

Omdat slechts één stam uit slib werd verkregen toont de tabel alleen de afzonderlijke resultaten voor de isolaten uit de rivieren en de beek. Het isolaat uit slib is geïncorporeerd in de verdeling met de totale isolaten. De witte gebieden geven de verdunningsreeks aan die voor elk antibioticum getest is. Waarden boven deze range geven een MIC-waarde hoger dan de hoogste geteste concentratie aan. Waarden bij de laagst geteste concentratie geven aan dat de MIC-waarde kleiner is dan of gelijk is aan de laagste geteste concentratie. Verticale lijnen geven de epidemiologische cut-offwaarden weer. Onderbroken verticale lijnen geven klinische breakpoints weer. Bij afwezigheid van een onderbroken verticale lijn is het klinische breakpoint gelijk aan de epidemiologische cut-off (erythromycine), niet bekend (sulfamethoxazole/trimethoprim), of niet van toepassing (salinomycine). Zie voor de gebruikte bronnen voor breakpoints Bijlage 4.

*sulfamethoxazole/trimethoprim.

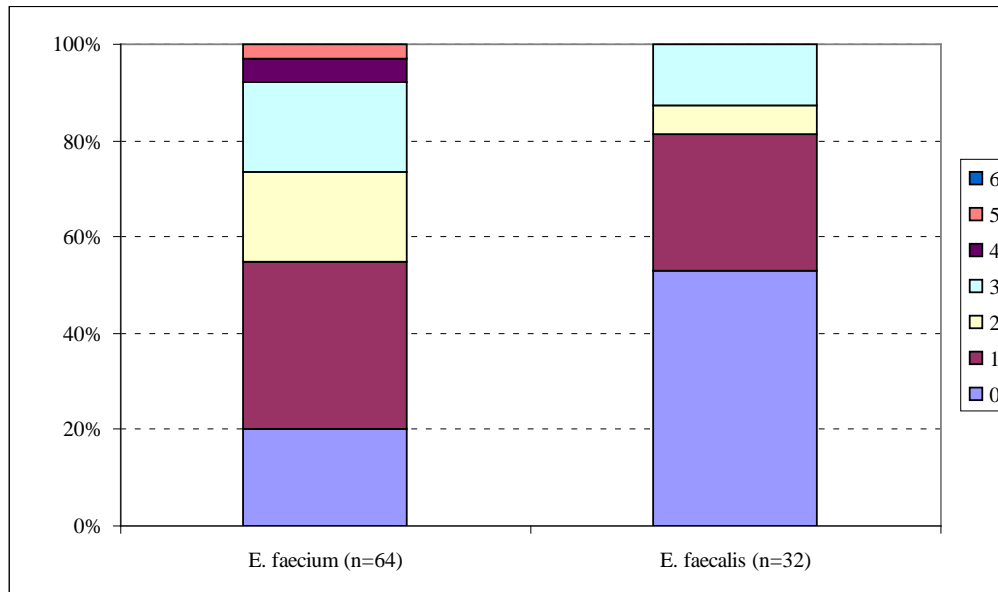


Figuur 4 Percentages resistente *E. faecium*- (boven) en *E. faecalis*- isolaten (onder) uit oppervlaktewater (rivieren, beek) en slib in Noordoost-Brabant

Voor *E. faecalis* is slib niet weergegeven, omdat er maar één isolaat beschikbaar was.

* sulfamethoxazole/trimethoprim.

De percentages gevoelige, mono-resistente en multi-resistente stammen zijn weergegeven in Figuur 5. Van alle *E. faecium*- en *E. faecalis* isolaten uit oppervlaktewater en slib was respectievelijk 80% en 47% resistent tegen één of meerdere van de 6 geteste antibiotica, en respectievelijk 45% en 19% waren multi-resistent. Sommige van de *E. faecium*-stammen (7,8%) hadden 4 of 5 verschillende resistenties, voor *E. faecalis* was het maximale aantal resistenties dat per isolaat werd aangetroffen 3.



Figuur 5 Percentages gevoelige, mono-resistente en multi-resistente *E. faecium*- en *E. faecalis*-isolaten uit oppervlaktewater en slib in Noordoost-Brabant

Resultaten voor isolaten uit rivieren, beek en slib zijn samengevoegd weergegeven.

3.1.2.2 *E. durans*, *E. hirae*, en de overige *Enterococcus*-species

De gevoeligheid van de *E. durans*- en *E. hirae*-isolaten uit de oppervlaktewateren en slib voor de geteste antibiotica zijn weergegeven als MIC-verdelingen in Tabel 8. Vanwege het relatief lage aantal *E. durans*- en *E. hirae*-isolaten zijn voor de gegevensverwerking alle isolaten uit water en slib samengevoegd. De resultaten van de *E. mundtii*- (n=9), *E. casseliflavus*- (n=9), *E. gilvus*- (n=1) en *E. caccae/moraviensis/silesiacus*- (n=1) isolaten zijn gezamenlijk verwerkt in één MIC-verdeling. Deze MIC-verdeling is ook weergegeven in Tabel 8. De percentages resistentie zijn gebaseerd op de breakpoints van *E. faecium* en *E. faecalis*. De breakpoints van quinupristine/dalfopristine wijken voor *E. faecium* en *E. faecalis* sterk van elkaar af (EFSA 2008). Bij gebruik van het *E. faecium* breakpoint (1 mg/L) was een groot deel van de *E. durans*, *E. hirae*, en de overige *Enterococcus* spp. resistent voor deze antibioticumcombinatie. Bij gebruik van het breakpoint voor *E. faecalis* (32 mg/L) was echter geen van de isolaten resistent. Verder werd in alle drie de groepen resistentie waargenomen tegen tetracycline en erythromycine. Bij de overige *Enterococcus*-soorten kwam resistentie alleen voor bij *E. casseliflavus* en *E. mundtii* (Tabel 9). Salinomycineresistentie werd alleen aangetroffen bij *E. durans* en *E. hirae*. Sulfamethoxazole/trimethoprimresistentie werd alleen aangetroffen bij *E. hirae* en van de overige soorten bij *E. casseliflavus*. Vancomycineresistentie (MIC van 8 mg/L) werd alleen bij *E. casseliflavus* aangetroffen, bij 2 van de 9 isolaten. De andere 7 *E. casseliflavus* isolaten waren niet vancomycine-resistent, maar hadden wel relatief hoge MIC-waarden van 4 mg/L. Relatieve ongevoeligheid voor vancomycine is een intrinsieke eigenschap van *E. casseliflavus* en wordt veroorzaakt door de aanwezigheid van *VanC*-genen (Vincent et al., 1991; Clark et al., 1998).

De percentages gevoelige, mono-resistente en multi-resistente stammen voor *E. durans*, *E. hirae*, en de overige *Enterococcus*-soorten zijn weergegeven in Figuur 6. Respectievelijk 86%, 53% en 75% van de stammen had ten minste één resistentie, en 14%, 42%, en 25% waren multi-resistent. Bij de ‘overige *Enterococcus*-soorten’ waren alle resistente stammen *E. mundtii* of *E. casseliflavus*; multi-resistentie werd bij deze soorten aangetroffen bij respectievelijk één en vier van de negen isolaten.

Tabel 8 MIC-verdelingen (in %) voor *E. durans* en *E. hirae* uit oppervlaktewater en slib voor verschillende antibiotica (concentraties in mg/L), alsmede het percentage resistente isolaten (R%)

<i>E. durans</i>		MIC (%) verdeling mg/L															% R
totaal (n=29)	0,06	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	
erythromycine			55,2	3,4	3,4	3,4	31,0	3,4	0	0	0						3,4
vancomycine				51,7	44,8	3,4	0	0	0	0	0	0					0
tetracycline		0	24,1	62,1	0	0	0	0	0	13,8							13,8
salinomycine				0	79,3	17,2	0	3,4	0	0	0	0					3,4
quinu/dalfopristin			17,2	0	0	13,8	58,6	10,3	0	0	0						82,8 / 0*
sulfa/trimeth*			96,6	3,4	0	0	0	0	0	0							0
oxacilline			0	0	6,9	3,4	13,8	6,9	10,3	24,1	34,5						

<i>E. hirae</i>		MIC (%) verdeling mg/L															% R
totaal (n=19)	0,06	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	
erythromycine			89,5	0	0	0	0	5,3	0	0	5,3						10,6
vancomycine				10,5	89,5	0	0	0	0	0	0	0					0
tetracycline		0	36,8	15,8	0	0	0	0	10,5	36,8							47,3
salinomycine				10,5	47,4	21,1	0	21,1	0	0	0	0					21,1
quinu/dalfopristin			57,9	0	5,3	10,5	26,3	0	0	0	0						36,8 / 0*
sulfa/trimeth*			78,9	0	0	0	0	0	15,8	5,3							21,1
oxacilline			21,1	5,3	15,8	10,5	26,3	5,3	10,5	5,3	0						

Overige <i>Ent spp.</i>		MIC (%) verdeling mg/L															% R
totaal (n=20)	0,06	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	
erythromycine			55,0	10	5	10	5	0	0	0	15,0						15
vancomycine				25,0	30,0	0	35	10	0	0	0	0					10
tetracycline		5	5,0	30,0	35	10	0	0	0	15,0							15
salinomycine				10,0	60,0	20,0	10	0,0	0	0	0	0					0
quinu/dalfopristin			10,0	0	15,0	0	65,0	5	5	0	0						75,0 / 0*
sulfa/trimeth*			95,0	0	0	0	0	0	0	0	5,0						5,0
oxacilline			5,0	0,0	0,0	0,0	30,0	30,0	20,0	10,0	5						

De witte gebieden geven de verdunningsreeks aan die voor elk antibioticum getest is. Waarden boven deze range geven een MIC-waarde hoger dan de hoogste geteste concentratie aan. Waarden bij de laagst geteste concentratie geven aan dat de MIC-waarde kleiner is dan of gelijk is aan de laagste geteste concentratie. Verticale lijnen geven de epidemiologische cut-offwaarden van *E. faecium* en *E. faecalis* weer. Bij quinupristine/dalfopristine geeft de enkele lijn de epidemiologische cut-offwaarde van *E. faecium*, de dubbele lijn de epidemiologische cut-offwaarde van *E. faecalis* weer.

*Percentages resistente isolaten bepaald aan de hand van de respectievelijke breakpoints van *E. faecium* en *E. faecalis*.

Tabel 9 Voorkomende resistenties bij de verschillende *Enterococcus*-soorten

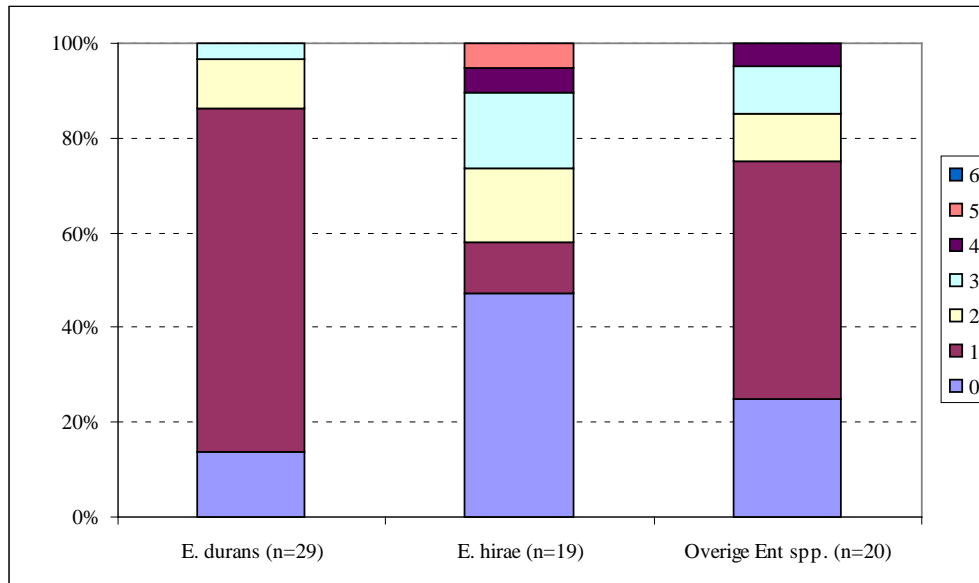
	<i>E. durans</i> (n=29)	<i>E. hirae</i> (n=19)	<i>E. mundtii</i> (n=9)	<i>E. casseliflavus</i> (n=9)	<i>E. gilvus</i> (n=1)	<i>E. cacaecae</i> [†] (n=1)	<i>E. faecium</i> (n=64)	<i>E. faecalis</i> (n=32)
erythromycine	+ (1)	+ (2)	+ (1)	+ (2)	-	-	+ (17)	+ (6)
vancomycine	-	-	-	+ (2)	-	-	-	-
tetracycline	+ (4)	+ (9)	+ (1)	+ (2)	-	-	+ (32)	+ (15)
salinomycine	+ (1)	+ (4)	-	-	-	-	+ (3)	-
quinu-/dalfopristine	+ (24) [*]	+ (7) [*]	+ (6) [*]	+ (9) [*]	-	-	+ (40)	-
sulfa/trimethoprim [§]	-	+ (4)	-	+ (1)	-	-	+ (12)	+ (4)

Weergegeven is of resistentie tegen de verschillende antibiotica wel (+) of niet (-) is aangetroffen, met daarachter tussen haakjes het aantal isolaten met de betreffende resistentie. In grijs zijn de 'overige' *Enterococcus*-soorten weergegeven.

*Bij gebruik van breakpoint van *E. faecium*.

[†]*E. cacaecae*/ *E. moraviensis*/ *E. silesiacus*.

[§]Sulfamethoxazole/trimethoprim.



Figuur 6 Percentages gevoelige, mono-resistente en multi-resistente *E. durans*, *E. hirae* en overige *Enterococcus* spp.-isolaten uit oppervlaktewater en slib in Noordoost-Brabant

Resultaten voor isolaten uit rivieren, beek en slib zijn samengevoegd weergegeven. Voor de berekening van quinupristine/dalfopristine-resistentie is uitgegaan van het breakpoint van *E. faecium*.

3.1.3 Staphylococcen

Uit de verschillende monsters werden in totaal 26 *Staphylococcus*-stammen geïsoleerd die door middel van API20staph en 16S rDNA-sequentieanalyse bevestigd en op soort gebracht konden worden. Hiervan waren 24 afkomstig uit de rivieren en 2 uit de beek. Er werden geen monsters uit slib verkregen. Vijf van de *Staphylococcus*-isolaten (21%) werden geïdentificeerd als *S. aureus*, waarvan 2 uit de beek en 3 uit de rivieren afkomstig waren. De overige stammen waren coagulase-negatieve staphylococci (CNS). Van 16 van de *Staphylococcus*-isolaten werd een antibioticumgevoeligheidsprofiel verkregen, het betrof 3 *S. aureus* en 13 CNS (zie Tabel 10). Vanwege dit geringe aantal is voor de data-analyse geen uitsplitsing naar locatie van herkomst gemaakt en zijn alle isolaten uit water (rivieren en beek) samengevoegd. De MIC-verdelingen in Tabel 11 geven de resultaten weer voor alle gevonden *Staphylococcus*-soorten. Voor de berekening van de percentages resistente *Staphylococcus* spp. is rekening gehouden met de verschillende epidemiologische cut-offwaarden van *S. aureus* en CNS voor oxacilline en vancomycine (Tabel 11, Bijlage 4). Een grafische weergave van de MIC-verdelingen is te zien in Bijlage 8.

Tabel 10 *Staphylococcus*-soorten met antibioticumprofiel geïsoleerd uit de rivieren en beek in Noordoost-Brabant

<i>Staphylococcus</i> -species	Aantal	Locatie
<i>S. aureus</i>	3	Beek (2), Rivieren (1)
<i>S. cohnii</i> ssp. <i>urealyticum</i>	4	Rivieren
<i>S. condimentii</i>	2	Rivieren
<i>S. epidermidis</i>	1	Rivieren
<i>S. lentus</i>	3	Rivieren
<i>S. pulvereri</i> (= <i>S. vitulinus</i>)	2	Rivieren
<i>S. simulans</i>	1	Rivieren

Tabel 11 MIC-verdelingen (in %) voor staphylococceen uit oppervlaktewater voor verschillende antibiotica (concentraties in mg/L), alsmede het percentage resistente isolaten (R%)

<i>Staph.spp.</i> (n=16)	MIC (%) verdeling mg/L														%R	
	0,06	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512		1024
erythromycine			31,3	0	0	6,3	6,3	12,5	0	0	43,8					68,8
vancomycine				6,3	50,0	18,8	0	0	0	0	25,0					25,0
sulfa/trimeth*			43,8	18,8	6,3	12,5	6,3	12,5	0	0						37,5
tetracycline		6,3	18,8	6,3	12,5	6,3	0	6,3	0	43,8						56,3
oxacilline			25,0	12,5	25,0	0	6,3	0	18,8	0	12,5					37,5
salinomycine				6,3	12,5	25,0	31,3	0	0	0	0	25,0				25,0
ciprofloxacine	12,5	25,0	43,8	12,5	0	0	0	0	0	0	6,3					6,25
clindamycine	0	13,3	26,7	0	6,7	0	20,0	0	0	0	0	0	0	33,3		60,0

De witte gebieden geven de verdunningsreeks aan die voor elk antibioticum getest is. Waarden boven deze range geven een MIC-waarde hoger dan de hoogste geteste concentratie aan. Waarden bij de laagst geteste concentratie geven aan dat de MIC-waarde kleiner is dan of gelijk aan de laagste geteste concentratie. Doorgetrokken verticale lijnen geven de breakpoints van CNS weer, dubbele verticale lijnen de breakpoints van *S. aureus*. Onderbroken lijnen geven de klinische breakpoints voor *S. aureus* en CNS weer. Voor de gebruikte bronnen voor de breakpoints, zie Bijlage 4. Bij afwezigheid van onderbroken lijnen is er of geen klinisch breakpoint bekend (salinomycine), of is het klinisch breakpoint gelijk aan de epidemiologische cut-off (ciprofloxacine). In de berekening van de percentages resistente stammen is rekening gehouden met de verschillende breakpoints voor *S. aureus* en CNS.

*sulfamethoxazole/trimethoprim.

Voor alle geteste antibiotica werden resistente *Staphylococcus*-stammen gevonden. Resistentie tegen erythromycine, clindamycine en tetracycline kwam bij meer dan de helft van alle stammen voor. Daarnaast was een relatief hoog percentage oxacilline-resistent (37,5%). Oxacillineresistentie werd aangetroffen bij *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. cohnii* spp. *urealyticum* en *S. lentus* (Tabel 12). Met uitzondering van resistentie tegen ciprofloxacine, dat alleen bij *S. cohnii* werd gevonden, kwamen alle resistenties zowel bij CNS als bij de *S. aureus*-stammen voor (Tabel 12). Bij de drie *S. simulans*- en *S. pulvereri*-isolaten werden geen resistenties aangetroffen.

Tabel 12 Voorkomende resistenties bij de verschillende *Staphylococcus*-soorten

	<i>S. aureus</i> (n=3)	<i>S. cohnii</i> spp <i>urealyticum</i> (n=4)	<i>S. condimentii</i> (n=2)	<i>S. lentus</i> (n=3)	<i>S. pulvereri</i> (n=2)	<i>S. simulans</i> (n=1)	<i>S. epidermidis</i> (n=1)
erythromycine	+ (3)	+ (3)	+ (1)	+ (3)	-	-	+
vancomycine	+ (3)	-	-	-	-	-	+
sulfa/trimeth*	+ (1)	+ (3)	+ (1)	+ (1)	-	-	-
tetracycline	+ (1)	+ (3)	+ (1)	+ (3)	-	-	+
oxacilline	+ (3)	+ (1)	-	+ (1)	-	-	+
salinomycine	+ (3)	-	-	-	-	-	+
ciprofloxacine	-	+ (1)	-	-	-	-	-
clindamycine	+ (3)	+ (1)	+ (1)	+ (3)	-	-	+

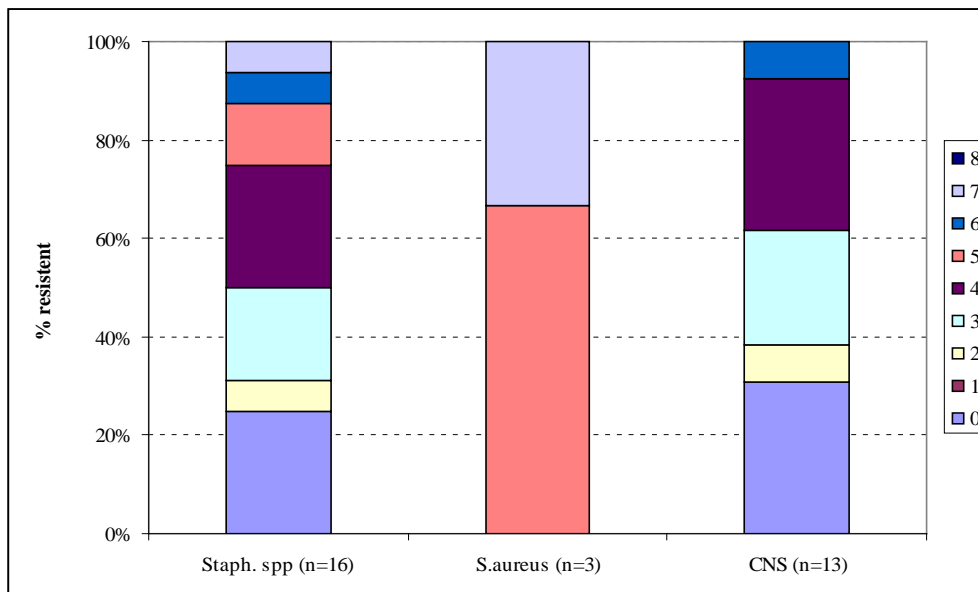
Weergegeven is of resistentie tegen de verschillende antibiotica wel (+) of niet (-) is aangetroffen, met daarachter tussen haakjes het aantal isolaten met de betreffende resistentie.

*Sulfamethoxazole/trimethoprim

Alle oxacillineresistente *Staphylococcus*-stammen waren multiresistent, en de *S. aureus*- en *S. epidermidis*-stammen bleken tevens resistent te zijn voor vancomycine. Dit laatste is opmerkelijk,

omdat deze resistentie zeer zeldzaam is bij staphylococcen, en niet eerder in Nederland is aangetroffen. Omdat deze bevinding niet bevestigd kon worden (vanwege het verloren gaan van de isolaten) kan hier echter niet de definitieve uitspraak worden gedaan dat vancomycine-resistente staphylococcen in het water zijn gevonden.

De percentages gevoelige, mono-resistente, en multi-resistente stammen zijn in Figuur 7 weergegeven voor alle *Staphylococcus*-isolaten en voor *S. aureus* en CNS afzonderlijk. De percentages multi-resistente stammen waren erg hoog: 75% van alle geïsoleerde *Staphylococcus*-stammen was multi-resistent. Alle drie de *S. aureus*-stammen waren multi-resistent, van de CNS-stammen was 69% resistent.



Figuur 7 Percentages gevoelige, mono-resistente en multi-resistente staphylococcen, *S. aureus* en CNS uit oppervlaktewater en slib in Noordoost-Brabant

Resultaten voor isolaten uit rivieren, beek en slib zijn samengevoegd weergegeven.

3.2 Pathogenen

3.2.1 *Campylobacter*

In totaal zijn uit alle monsters 24 *Campylobacter*-isolaten verkregen, waarvan er 17 als *C. coli* (71%), 5 als *C. jejuni* subspecies *jejuni* (21%) en 2 als *C. lari* (8,3%) werden geïdentificeerd. Eenentwintig isolaten waren afkomstig uit de rivieren, twee uit de beek op het recreatieterrein (1 *C. coli* en 1 *C. jejuni*) en één (*C. coli*) uit een monster slib. Van 23 van de 24 *Campylobacter*-isolaten werd een antibioticumprofiel verkregen. De gevoeligheid van de *Campylobacter*-stammen voor de geteste antibiotica is als MIC-verdeling weergegeven in Tabel 13. Een grafische weergave van deze MIC-verdelingen is te zien in Bijlage 9. Vanwege het geringe aantal *C. jejuni*- en *C. lari*-stammen, en het geringe aantal stammen uit de beek en het slib, is hierbij geen uitsplitsing naar species en herkomst gemaakt. Voor de berekening van de percentages resistente *Campylobacter* spp. is rekening gehouden met de verschillende breakpoints voor *C. coli*- en *C. jejuni*-stammen (Tabel 13, Bijlage 4). Voor *C. lari*

zijn geen breakpoints bekend en zijn voor de berekening van percentages resistente stammen de breakpoints van *C. coli* gebruikt.

Tabel 13 MIC-verdelingen (in %) voor *Campylobacter*-isolaten uit oppervlaktewater en slib (concentraties in mg/L) alsmede het percentage resistente stammen (%R)

<i>C.spp</i> totaal (n=23)	MIC (%) verdeling mg/L																%R
	0,06	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	
erythromycine				52,2	17,4	13,0	17,4	0	0	0	0	0					0,0
gentamicine			21,7	56,5	13,0	0	0	0	0	0	8,7						8,7
streptomycine					39,1	30,4	8,7	4,3	4,3	4,3	8,7	0	0,0				21,7
neomycine				34,8	43,5	8,7	8,7	0	0	0	4,3	0					13,0
tetracycline				65,2	0	8,7	0	4,3	0	0	0	21,7					26,1
ciprofloxacine		73,9	4,3	0	4,3	0	0	4,3	13,0	0							17,4
nalidixinezuur					0	4,3	47,8	21,7	8,7	0	0	0	17,4				17,4
tulathromycine				87,0	13,0	0	0	0	0	0	0	0					0,0
ampicilline			0	0	4,3	0	34,8	30,4	17,4	8,7	4,3						13,0
clarithromycine				52,2	8,7	17,4	13,0	8,7	0	0	0	0,0					0,0
sulfamethoxazole								0	13,0	30,4	21,7	4,3	0	4,3	13,0	13,0	30,4
chloramphenicol						8,7	56,5	17,4	8,7	8,7	0	0	0	0			8,7

De witte gebieden geven de verdunningsreeks aan die voor elk antibioticum getest is. Waarden boven deze range geven een MIC-waarde hoger dan de hoogste geteste concentratie aan. Waarden bij de laagst geteste concentratie geven aan dat de MIC-waarde kleiner is dan of gelijk aan de laagste geteste concentratie. Doorgetrokken verticale lijnen geven de breakpoints van *C. coli* weer, dubbele verticale lijnen de breakpoints van *C. jejuni*. Bij afwezigheid van dubbele verticale lijn is het breakpoint van *C. coli* en *C. jejuni* gelijk. De gebruikte breakpoints zijn epidemiologische cut-offwaarden (zie Bijlage 4). Voor de *C. lari*-isolaten is het breakpoint van *C. coli* gebruikt.

Resistenties werden gevonden tegen 9 van de 12 geteste antibiotica. De meest frequent voorkomende resistenties (>15% van de stammen) waren tegen sulfamethoxazole, tetracycline, streptomycine, ciprofloxacine, en nalidixinezuur, gevolgd door ampicilline, neomycine, gentamicine en chloramphenicol. Ampicilline- en chloramphenicolresistentie werd niet gevonden bij *C. coli* stammen. Chloramphenicolresistentie werd alleen gevonden bij *C. lari* (Tabel 14).

Tabel 14 Voorkomende resistenties bij de verschillende *Campylobacter*-soorten

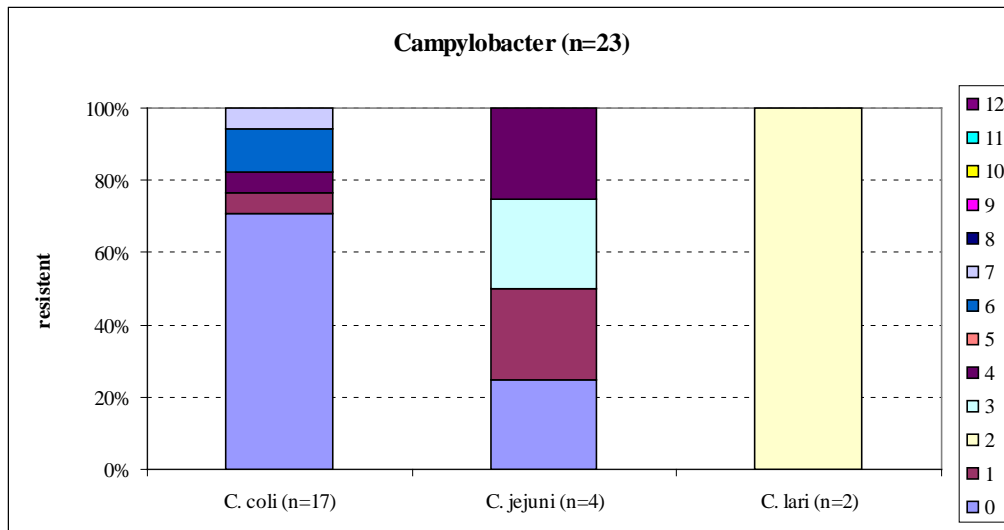
	<i>C. coli</i> (n=17)	<i>C. jejuni</i> (n=4)	<i>C. lari</i> (n=2)
erythromycine	-	-	-
gentamicine	+ (2)	-	-
streptomycine	+ (4)	+ (1)	-
neomycine	+ (2)	-	-
tetracycline	+ (4)	+ (2)	-
ciprofloxacine	+ (4)	-	-
nalidixinezuur	+ (4)	-	-
tulathromycine	-	-	-
ampicilline	-	+ (2)	+ (2)*
clarithromycine	-	-	-
sulfamethoxazole	+ (4)	+ (3)	-
chloramphenicol	-	-	+ (2)*

Weergegeven is of resistentie tegen de verschillende antibiotica wel (+) of niet (-) is aangetroffen, met daarachter tussen haakjes het aantal isolaten met de betreffende resistentie.

*Breakpoints gebruikt van *C. coli* en *C. jejuni*.

De percentages gevoelige, mono-resistente, en multi-resistente *Campylobacter*-stammen zijn in Figuur 8 weergegeven. Van de *C. coli*- en *C. jejuni*-stammen hadden respectievelijk 29% en 75% tenminste één

resistentie en waren 24% en 50% multiresistent. Er werden 3 (18%) *C. coli* stammen gevonden met 6 of 7 resistenties. Deze *C. coli*-isolaten waren alle drie afkomstig uit dezelfde rivier (Hooge Raam), twee uit watermonsters, één uit slib. Het enige *C. jejuni*-isolaat dat resistentie vertoonde tegen vier antibiotica was eveneens afkomstig uit de Hooge Raam. Beide uit water geïsoleerde *C. lari*-stammen hadden twee resistenties, tegen ampicilline en chloramphenicol, en waren eveneens afkomstig uit water van de Hooge Raam.



Figuur 8 Percentages gevoelige, monoresistente en multiresistente *Campylobacter*-isolaten uit oppervlaktewater en slib in Noordoost-Brabant

Resultaten voor isolaten uit rivieren, beek en slib zijn samengevoegd weergegeven.

3.3 Milieubacteriën

3.3.1 *Aeromonas*

Uit de verschillende oppervlaktewater- en slibmonsters zijn in totaal 229 *Aeromonas*-stammen geïsoleerd, waarvan voor 204 een antibioticumgevoeligheidsprofiel is verkregen. De antibioticumgevoeligheid van de *Aeromonas* spp.-isolaten uit rivieren, beek en slib zijn in Tabel 15 weergegeven in de vorm van MIC-verdelingen. Een grafische weergave van deze MIC-verdelingen is te zien in Bijlage 10. Voor *Aeromonas* zijn geen epidemiologische cut-offwaarden bekend, de percentages resistente stammen zijn daarom gebaseerd op klinische breakpoints van het CLSI (zie Bijlage 4).

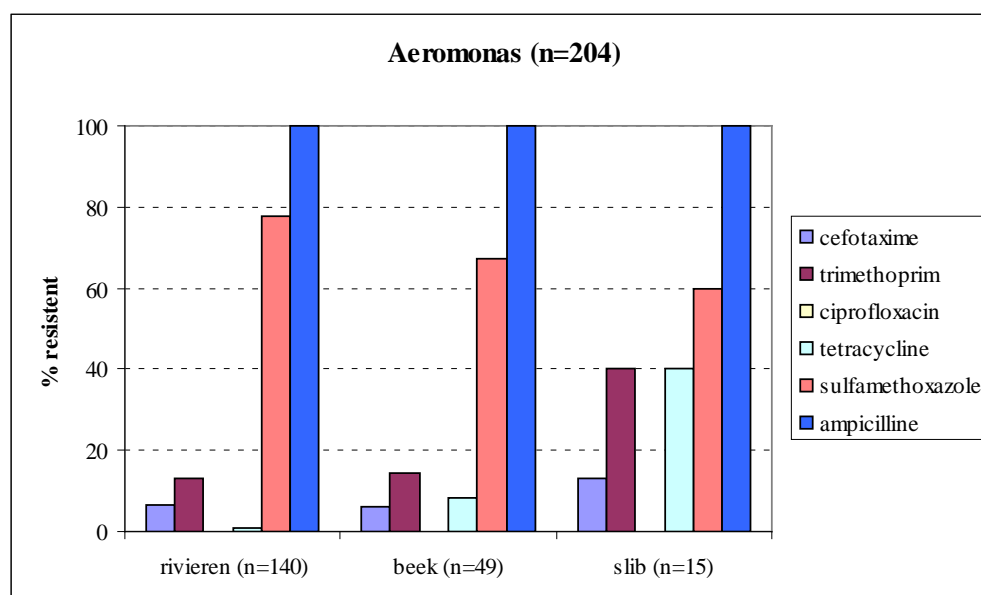
De percentages resistente *Aeromonas*-stammen zijn per milieucompartiment weergegeven in Figuur 9. Alle *Aeromonas*-isolaten waren resistent tegen ampicilline, wat in overeenstemming is met de beschreven intrinsieke resistentie van *Aeromonas*-soorten voor dit antibioticum (Morita et al., 1994; Vila et al., 2002; Castro-Escarpulli et al., 2003). De meerderheid (60-78%) van de isolaten was resistent tegen sulfamethoxazole. Daarnaast werd in alle milieucompartimenten resistentie tegen trimethoprim en tetracycline aangetroffen, maar met een hogere frequentie bij *Aeromonas*-isolaten uit slib dan uit oppervlaktewater. Voor cefotaxime kan geen uitspraak gedaan worden over het percentage resistente *Aeromonas*-stammen. Gebaseerd op het klinische break-point zijn resistente stammen stammen met een MIC-waarde > 32 mg/L, terwijl de hoogste geteste concentratie 16 mg/L was. Van

alle *Aeromonas*-stammen had 6,8% een MIC-waarde hoger dan 16 mg/L: deze zijn in de twee uiterste gevallen allemaal resistent of allemaal gevoelig. Er kan dus slechts geconcludeerd worden dat tussen de 0 en 6,8% van de stammen resistent was tegen cefotaxime.

Tabel 15 MIC-verdelingen (in %) voor *Aeromonas*-isolaten uit riviertjes, een beek en slib uit een van de riviertjes voor verschillende antibiotica (concentraties in mg/L), alsmede het percentage resistente isolaten (R%)

	MIC (%) verdeling mg/L																%R
	0,06	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	
rivieren (n=140)																	
cefotaxime		84,3	2,1	2,1	0,7	0,7	0,7	0	2,9	6,4							
trimethoprim				2,9	46,4	31,4	5,7	0,7	2,1	0,7	9,3						12,9
ciprofloxacine	97,1	2,9	0	0	0	0	0	0	0	0							0
tetracycline					90,7	5,7	2,1	0	0	0,7	0	0	0,7				0,7
sulfamethoxazole								0	0,7	2,1	2,9	5,0	10,7	31,4	22,9	24,3	77,9
ampicilline				0	0	0	0	0	0	0	100						100
beek (n=49)																	
cefotaxime		69,4	2,0	2,0	6,1	2,0	4,1	4,1	4,1	6,1							
trimethoprim				6,1	18,4	51,0	10,2	0	2,0	0	4,1	8,2					14,3
ciprofloxacine	95,9	4,1	0	0	0	0	0	0	0	0							0
tetracycline					83,7	8,2	0,0	0	6,1	2,0	0	0	0				8,2
sulfamethoxazole								0	0	0	4,1	12,2	16,3	24,5	22,4	20,4	67,3
ampicilline				0	0	0	0	0	0	0	100						100
slib (n=15)																	
cefotaxime		53,3	13,3	0	0	0	0	0	20,0	13,3							
trimethoprim				0,0	6,7	26,7	20,0	6,7	0	0	0	40,0					40,0
ciprofloxacine	80,0	6,7	6,7	0	6,7	0	0	0	0,0								0
tetracycline					46,7	6,7	6,7	0	33,3	0	6,7	0	0				40
sulfamethoxazole								0	0	26,7	6,7	6,7	0	20,0	6,7	33,3	60,0
ampicilline				0	0	0	0	0	0	0	100						100

De witte gebieden geven de verdunningsreeks aan die voor elk antibioticum getest is. Waarden boven deze range geven een MIC-waarde hoger dan de hoogste geteste concentratie aan. Waarden bij de laagst geteste concentratie geven aan dat de MIC-waarde kleiner is dan of gelijk aan de laagste geteste concentratie. Doorgetrokken verticale lijnen geven de klinische breakpoints weer. Voor gebruikte bronnen voor breakpoints, zie Bijlage 4.



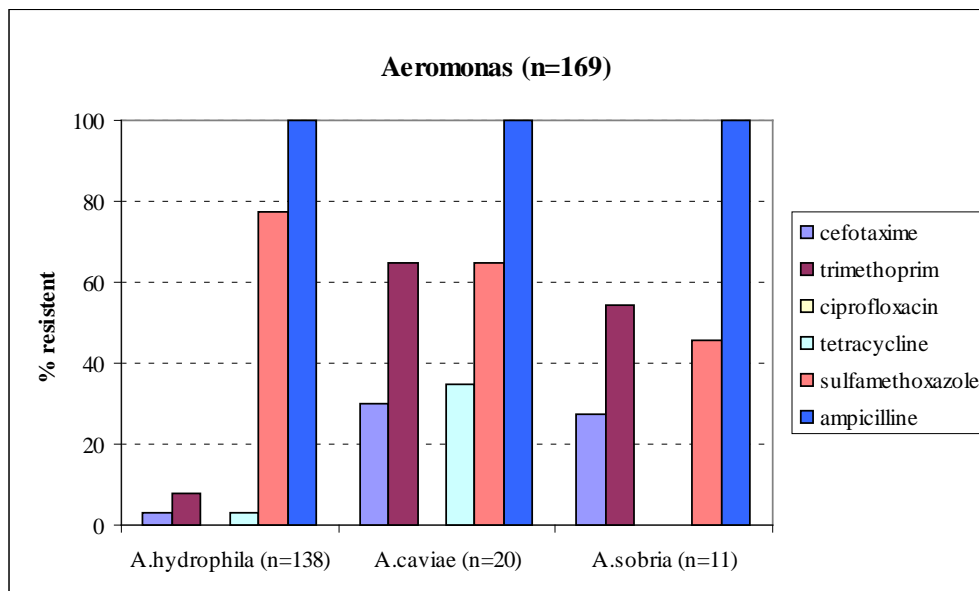
Figuur 9 Percentage resistente *Aeromonas*-isolaten afkomstig uit oppervlaktewater (rivieren, beek) en slib in Noordoost-Brabant

Voor cefotaxime geven de balken het percentage stammen weer met MIC-waarde >16 mg/L.

Van de 204 stammen met een antibioticumgevoeligheidsprofiel werden 169 op soort gebracht door middel van glucosevergisting en escaline-hydrolyse (Anonymous 1989). Op deze manier werden 138 (68%) isolaten geïdentificeerd als *A. hydrophila*, 20 (9,8%) als *A. caviae*, en 11 (5,4%) als *A. sobria*. Alle drie de geïdentificeerde soorten werden aangetroffen op alle locaties (Tabel 16). De percentages resistente stammen per species zijn weergegeven in Figuur 10. Sulfamethoxazoleresistentie werd het meest aangetroffen bij *A. hydrophila* (78%), gevolgd door *A. caviae* (65%) en *A. sobria* (45%). Voor trimethoprim en tetracycline waren er grote verschillen in resistentie-prevalentie tussen de drie soorten. Ook wat betreft het percentage stammen met een MIC > 16mg/L voor cefotaxime waren er verschillen tussen de drie soorten. Resistentie tegen trimethoprim en MIC >16 mg/L voor cefotaxime kwam in hogere frequentie voor bij *A. caviae* (65% en 30%) en *A. sobria* (55% en 27%), maar weinig bij *A. hydrophila* (8% en 3%). Tetracyclineresistentie kwam vooral voor bij *A. caviae* (35%), en niet of nauwelijks bij *A. sobria* (0%) en *A. hydrophila* (3%).

Tabel 16 Op soort gebrachte *Aeromonas*-soorten met antibioticumgevoeligheidsprofiel uit de onderzochte rivieren, beek en monsters slib in Noordoost-Brabant

<i>Aeromonas</i> -species	Aantal geïsoleerd uit			Totaal (%)
	Rivieren	Beek	Slib	
<i>A. hydrophila</i>	95	34	9	138 (81,7)
<i>A. caviae</i>	10	6	4	20 (11,8)
<i>A. sobria</i>	10	0	1	11 (6,5)
Totaal	115	40	14	169 (100)

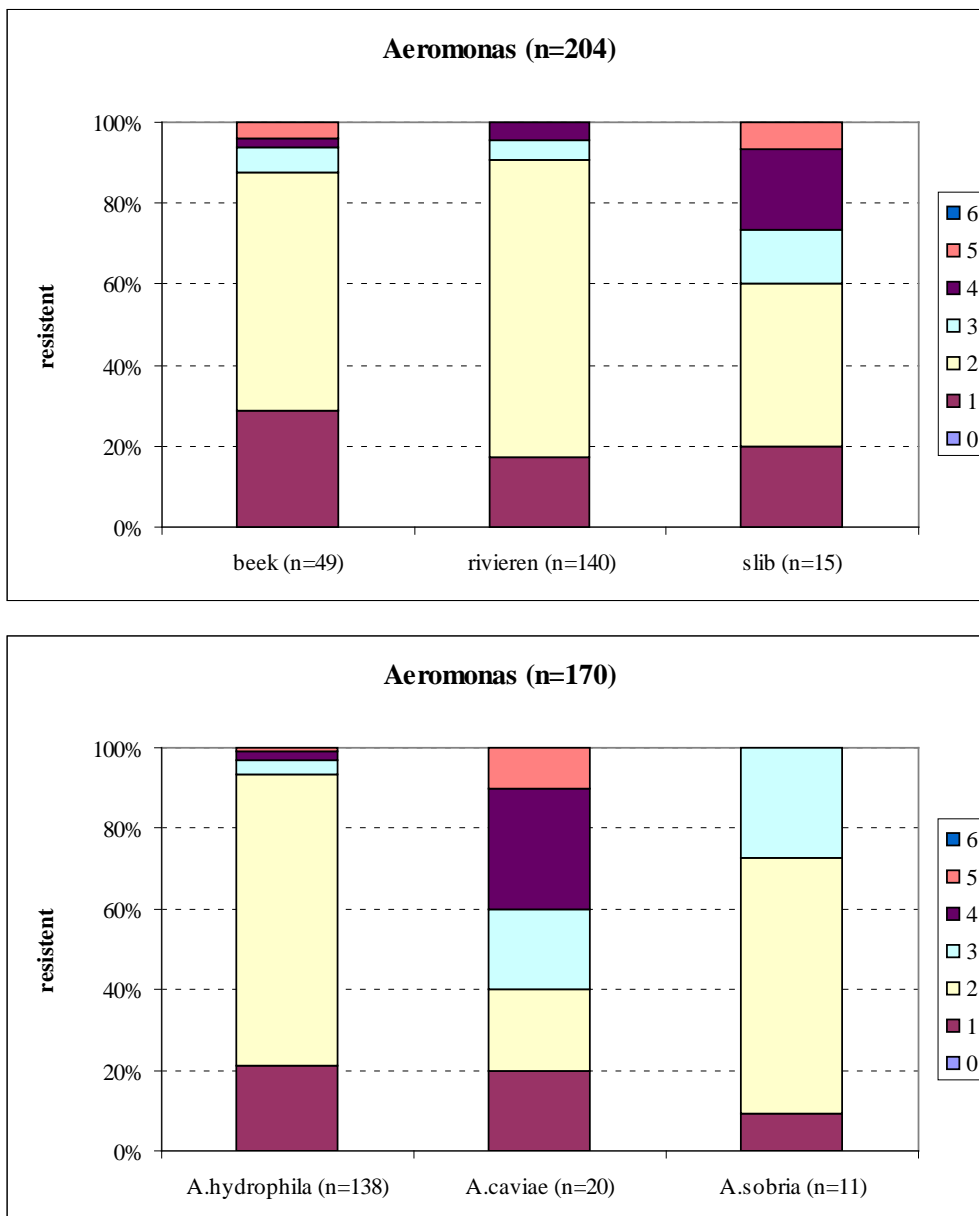


Figuur 10 Percentage resistente *A. hydrophila*, *A. caviae*, en *A. sobria* afkomstig uit het milieu (rivieren, beek en slib) in Noordoost-Brabant

Voor cefotaxime geven de balken het percentage stammen weer met MIC-waarde >16 mg/L.

In Figuur 11 zijn de percentages gevoelige, mono-resistente en multi-resistente stammen weergegeven, uitgesplitst naar locatie en naar soort. Vanwege de intrinsieke resistentie tegen ampicilline waren alle

stammen resistent tegen ten minste één antibioticum. De percentages *Aeromonas*-stammen met daarnaast minstens één verworven resistentie waren hoog en vergelijkbaar voor isolaten uit de rivieren (83%), beek (71%) en slib (80%). Verworven resistentie kwam iets meer voor bij *A. sobria* (91%) dan bij *A. hydrophila* (79%) en *A. caviae* (80%). Isolaten met meer dan één verworven resistentie (dat wil zeggen naast ampicilline nog minstens twee resistenties) werden vaker in slib (40%) dan in rivieren (9%) en beek (12%) gevonden, en waren vaker *A. caviae* (60%), dan *A. sobria* (27%) of *A. hydrophila* (7%). Het maximale aantal verworven resistenties was 4, wat werd gevonden bij *A. caviae*- (10%) en *A. hydrophila*-isolaten (0,7%).



Figuur 11 Percentages gevoelige, mono-resistente en multi-resistente *Aeromonas*-isolaten uitgesplitst naar afkomst uit rivieren, beek en slib in Noordoost-Brabant (boven) en naar soort (onder)

In de analyse is een MIC > 16mg/L voor cefotaxime als resistent beschouwd.

3.3.2 *Pseudomonas aeruginosa*

Uit de verschillende oppervlaktewatermonsters zijn in totaal 29 *P. aeruginosa*-stammen geïsoleerd. Er werden geen *P. aeruginosa*-isolaten uit de slibmonsters verkregen. Van 22 van deze stammen is een antibioticumgevoeligheidsprofiel bepaald, waarvan 11 isolaten uit de rivieren afkomstig waren en 11 uit de beek. De antibioticumgevoeligheidsprofielen voor de *P. aeruginosa*-stammen uit oppervlaktewater zijn weergegeven als MIC-verdelingen in Tabel 17. Een grafische weergave van de MIC-verdelingen is te zien in Bijlage 11.

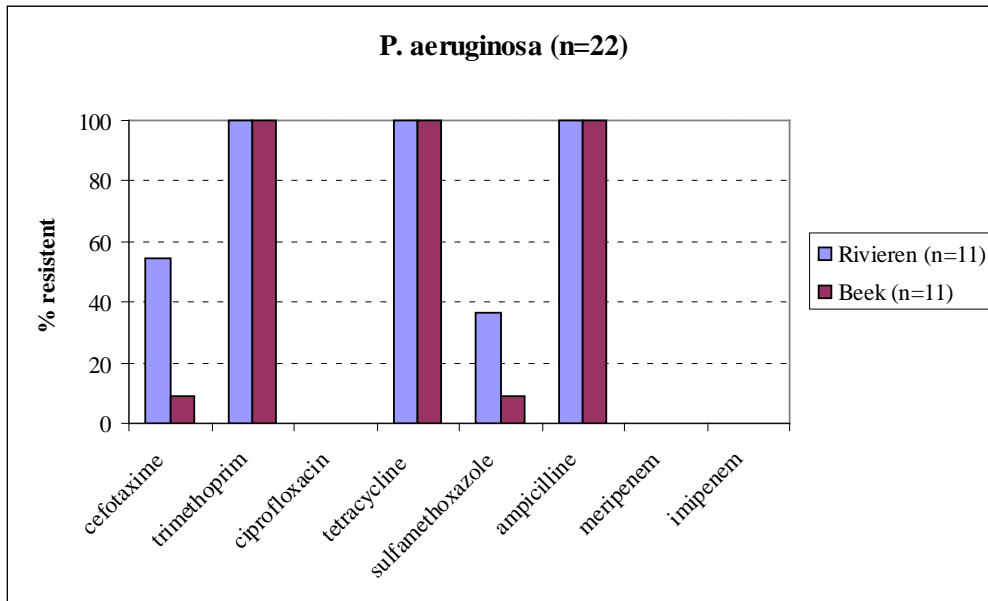
Tabel 17 MIC-verdelingen (in %) voor *P. aeruginosa*-isolaten uit oppervlaktewater (concentraties in mg/L), alsmede het percentage resistente isolaten (R%)

oppervlaktewater (n=22)	MIC (%) verdeling mg/L															% R	
	0,06	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024		2048
cefotaxime		0	0	0	0	0	0	18,2	50,0	31,8							
trimethoprim				0	0	0	0	0	0	0	0	100					100
ciprofloxacin	0	13,6	86,4	0	0	0	0	0	0	0							0
tetracycline					0	0	0	0	22,7	72,7	4,5	0					100
sulfamethoxazole								0	0	0	4,5	9,1	63,6	13,6	9,1	0	22,7
ampicilline				0	0	0	0	0	0	0	100						100
meripenem	27,3	0	9,1	0	63,6	0	0	0	0	0	0						0
imipenem	0	0	0	0	81,8	9,1	9,1	0	0	0	0						0

De witte gebieden geven de verdunningsreeks aan die voor elk antibioticum getest is. Waarden boven deze range geven een MIC-waarde hoger dan de hoogste geteste concentratie aan. Waarden bij de laagst geteste concentratie geven aan dat de MIC-waarde kleiner is dan of gelijk aan de laagste geteste concentratie. De verticale lijnen geven de klinische breakpoints weer, de onderbroken lijnen de epidemiologische cut-offwaarden (zie Bijlage 4). Voor cefotaxime was de epidemiologische cut-offwaarde gelijk aan het klinische breakpoint.

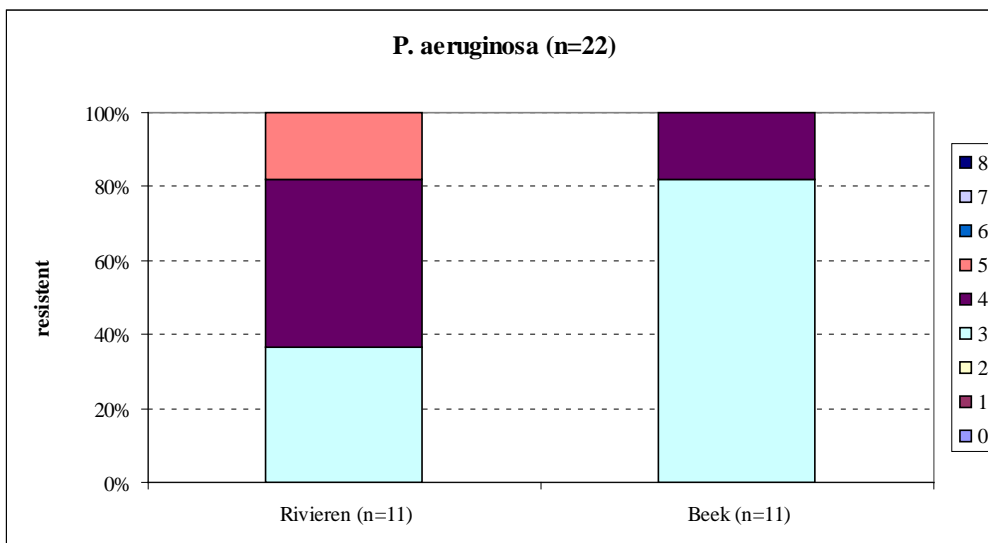
Voor slechts vier van de geteste antibiotica (cefotaxime, ciprofloxacin, meropenem, imipenem) zijn epidemiologische cut-offwaarden van *P. aeruginosa* beschikbaar (EUCAST, 2010). Voor alle onderzochte antibiotica zijn wel klinische breakpoints beschikbaar, zij het uit diverse bronnen (zie Bijlage 4). Deze zijn daarom gebruikt voor de berekening van de percentages resistente stammen. Voor cefotaxime kan geen uitspraak gedaan worden over het percentage resistente *P. aeruginosa*-stammen uit oppervlaktewater. Resistente stammen zijn – bij gebruik van beide breakpoints – stammen met een MIC-waarde >32 mg/L, terwijl de hoogste geteste concentratie 16 mg/L was. Van de stammen had 32% een MIC hoger dan 16mg/L, met andere woorden: tussen de 0 en 32% van de stammen was resistent tegen cefotaxime. Drieëntwintig procent van de stammen was resistent tegen sulfamethoxazole. MIC-waarden > 16mg/L voor cefotaxime en resistentie tegen sulfamethoxazole werden vaker bij de *P. aeruginosa*-stammen uit de rivieren dan bij stammen uit de beek gevonden (Figuur 12).

Alle stammen waren resistent voor trimethoprim, tetracycline en ampicilline, wat verklaard wordt door intrinsieke resistentie (Livermore, 2002; Mesaros et al., 2007; Strateva en Yordanov, 2009). Geen van de isolaten was resistent tegen ciprofloxacin, meripenem, en imipenem. Als de MIC-waarde >16 mg/L voor cefotaxime als resistent werd beschouwd, had 64% van de stammen uit de rivieren meer dan drie resistenties, en dus minstens één verworven resistentie, vergeleken met 18% van de stammen uit de beek (Figuur 13). Isolaten met vijf resistenties (dat wil zeggen met sulfamethoxazole- én cefotaximeresistentie) werden alleen in de rivieren gevonden.



Figuur 12 Percentage resistente *P. aeruginosa*-stammen afkomstig uit het milieu (rivieren, beek en slib) in Noordoost-Brabant

Voor cefotaxime geven de balken geven het percentage stammen weer met MIC-waarde >16 mg/L.



Figuur 13 Percentages multiresistente *P. aeruginosa*-isolaten afkomstig uit rivieren en een beek in Noordoost-Brabant

In de analyse is een MIC > 16mg/L voor cefotaxime als resistent beschouwd.

3.3.3 *Clostridium*

De water- en slibmonsters zijn op een van de monsternamedagen onderzocht op de aanwezigheid van *Clostridium*. Er werden in totaal 13 bevestigde *Clostridium*-stammen gevonden, waarvan twaalf werden geïdentificeerd als *C. beijerincki/butyricum* en één als *C. bifermentans*. Van zeven van de *C. beijerincki/butyricum*-stammen en van de *C. bifermentans* konden antibioticumgevoeligheds-

profielen worden bepaald. Van deze isolaten kwamen drie *C. beijerinckii/butyricum*-stammen uit de rivieren, één uit de beek en drie uit het slib. De *C. bifermentans* kwam uit een van de rivieren. De antibioticumgevoeligheid van deze stammen zijn als MIC-verdelingen weergegeven in Tabel 18. Gezien het geringe aantal stammen is voor de analyses geen uitsplitsing naar herkomst gemaakt. Voor de gevonden *Clostridium*-soorten zijn geen epidemiologische gegevens of klinische breakpoints bekend. Voor een aantal van de geteste antibiotica, namelijk erythromycine, vancomycine, en tetracycline, zijn wel de klinische breakpoints van *C. difficile* bekend (zie Bijlage 4). Gezien de MIC-verdelingen van de milieu-stammen lijkt het gebruik van de *C. difficile* breakpoints acceptabel. Gebaseerd op deze breakpoints was 38% en 25% van de *Clostridium*-stammen uit het milieu resistent voor respectievelijk erythromycine en vancomycine en was geen van de stammen resistent voor tetracycline. Daarnaast was 25% van de stammen relatief ongevoelig voor oxacilline en salinomycine. Ook voor deze antibiotica doen de MIC-verdelingen vermoeden dat bij deze 25% van de stammen sprake is van resistentie. Alle resistenties werden gevonden in de *C. beijerinckii/butyricum*-stammen. Twee van de *C. beijerinckii/butyricum*-stammen, één uit de beek en één uit één van de rivieren, waren resistent tegen vier antibiotica. Een van de *C. beijerinckii/butyricum* stammen had één resistentie, tegen erythromycine.

Tabel 18 MIC-verdelingen (in %) voor *Clostridium*-isolaten uit oppervlaktewater (concentraties in mg/L)

oppervlaktewater (n=8)	MIC (%) verdeling mg/L															%R
	0,06	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	
erythromycine			50,0	12,5	0	0	0	0	12,5	0	25,0					38
vancomycine				62,5	12,5	0	0	0	0	0	0	25,0				25
sulfa/trimeth*			100	0	0	0	0	0	0	0	0					0
tetracycline		25,0	25,0	12,5	12,5	12,5	12,5	0	0	0						0
oxacilline			37,5	25,0	0	12,5	0	0	0	25,0	0					25
salinomycine				62,5	12,5	0	0	0	0	0	0	25,0				25

De witte gebieden geven de verdunningsreeks aan die voor elk antibioticum getest is. Waarden boven deze range geven een MIC-waarde hoger dan de hoogste geteste concentratie aan. Waarden bij de laagst geteste concentratie geven aan dat de MIC-waarde kleiner is dan of gelijk aan de laagste geteste concentratie. De verticale lijnen geven klinische breakpoints van *C. difficile* weer. Gestippelde lijnen geven handmatige breakpoints weer gebaseerd op de binomiale verdeling (zie Bijlage 4).

3.4 Resultaten op een rij

Voor elke onderzochte bacteriesoort zijn in de verschillende milieumonsters hoge percentages resistente stammen teruggevonden. De in de vorige paragrafen per soort beschreven resultaten zijn in Tabel 19 op een rij gezet voor de bacteriesoorten met de meeste isolaten en/of waarvan de meest volledige breakpointgegevens beschikbaar waren. Bij *E. coli* en de staphylococceen werden resistenties tegen alle onderzochte resistentie aangetroffen. Bij de commensalen en (opportunistische) pathogenen was 29 tot 80% van de gevonden stammen resistent tegen één of meerdere van de geteste antibiotica. Bij de milieubacteriën waren alle stammen resistent, vanwege intrinsieke resistentie tegen ampicilline (*Aeromonas*), of ampicilline, tetracycline en trimethoprim (*P. aeruginosa*). Naast intrinsieke resistentie werd bij respectievelijk 80 en 41% van de *Aeromonas*- en *P. aeruginosa*-stammen ook minstens één verworven resistentie aangetroffen.

Voor alle bacteriesoorten werden aanzienlijke populaties van multiresistente stammen gevonden, variërend van 9-12% voor de milieubacteriën en 19 tot 75% voor de overige isolaten. In sommige gevallen waren stammen resistent tegen zeven van de geteste antibiotica.

Tabel 19 Percentages resistente bacterie-isolaten uit alle milieumonsters

	Aantal antibiotica getest	Aantal antibiotica waartegen resistentie is gevonden	Percentage resistente stammen	Percentage multiresistente stammen	Hoogste aantal resistenties aangetroffen per stam
<i>E. coli</i>	8	8	36 [§]	19 ³	7
<i>E. faecium</i>	6*	5	80	45	5
<i>E. faecalis</i>	6*	3	47	19	3
<i>S. aureus</i> / CNS	8	8	75	75	7
<i>C. jejuni</i>	12	4	75	50	4
<i>C. coli</i>	12	7	29	24	7
<i>Aeromonas spp.</i>	6	5 [‡]	100 (80) [°]	80 (12) [•]	5
<i>P. aeruginosa</i>	8	5 [‡]	100 (41) [°]	100 (9) [•]	5

*Oxacilline is hier niet meegerekend omdat dit antibioticum niet is meegenomen in de data-analyse.

[‡] MIC >16 mg/L voor cefotaxime is als resistent beschouwd.

[§] Sulfamethoxazole resistentie is buiten beschouwing gelaten omdat gegevens niet voor elk isolaat beschikbaar waren.

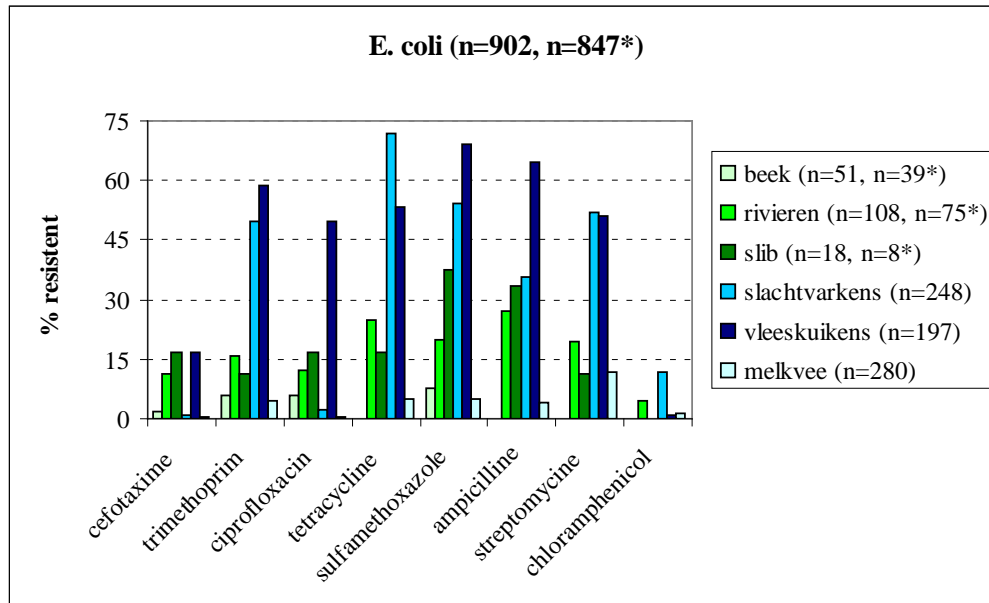
[°]• Tussen haakjes staan de percentages resistente stammen als intrinsieke resistentie buiten beschouwing wordt gelaten, dat wil zeggen: [°] voor *Aeromonas*-isolaten met >1 resistentie, voor *P. aeruginosa*-isolaten met > 3 resistenties; [•] voor *Aeromonas*-isolaten met >2 resistenties, voor *P. aeruginosa*-isolaten met > 4 resistenties.

3.5 Vergelijking met resistentie bij landbouwhuisdieren

Voor *E. coli*, *E. faecium*, *E. faecalis*, staphylococconen, *C. coli* en *C. jejuni* zijn de percentages resistente stammen bij landbouwhuisdieren in Nederland in 2006 en 2007 beschreven (MARAN, 2007). Voor deze bacteriën werden de resistenties die gevonden werden bij stammen uit oppervlaktewateren en slib vergeleken met stammen uit slachtvarkens, vleeskuikens, melkvee, en indien beschikbaar uit vleeskalveren (Figuren 14 tot en met 17).

E. coli

Alle resistenties die werden aangetroffen bij *E. coli*-stammen uit oppervlaktewater en slib werden eerder ook aangetroffen bij landbouwhuisdieren (Figuur 14). Vooral bij slachtvarkens en vleeskuikens waren de percentages resistente stammen voor de meeste (respectievelijk vijf en zes) van de acht antibiotica erg hoog. Bij melkvee was dit aanzienlijk lager. De mate van resistentie bij de isolaten uit de rivieren was – met uitzondering van cefotaxime – voor alle antibiotica intermediair ten opzichte van slachtvarkens/vleeskuikens en melkvee. Cefotaximeresistentie kwam bij de milieumonsters even vaak voor als in vleeskuikens, en nauwelijks bij slachtvarkens en melkvee. Chloramphenicolresistentie kwam relatief weinig voor bij zowel de landbouwhuisdieren als de milieumonsters.

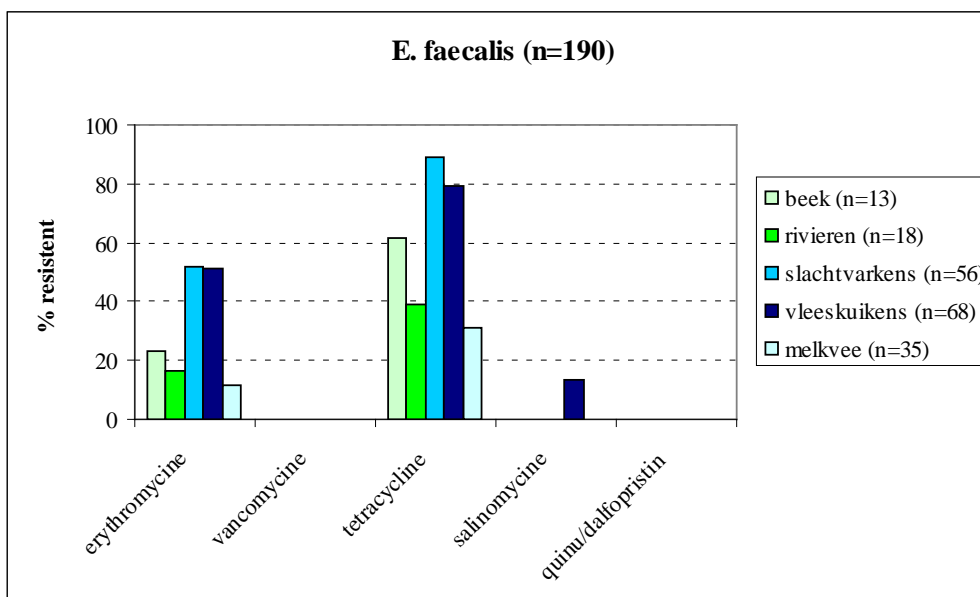
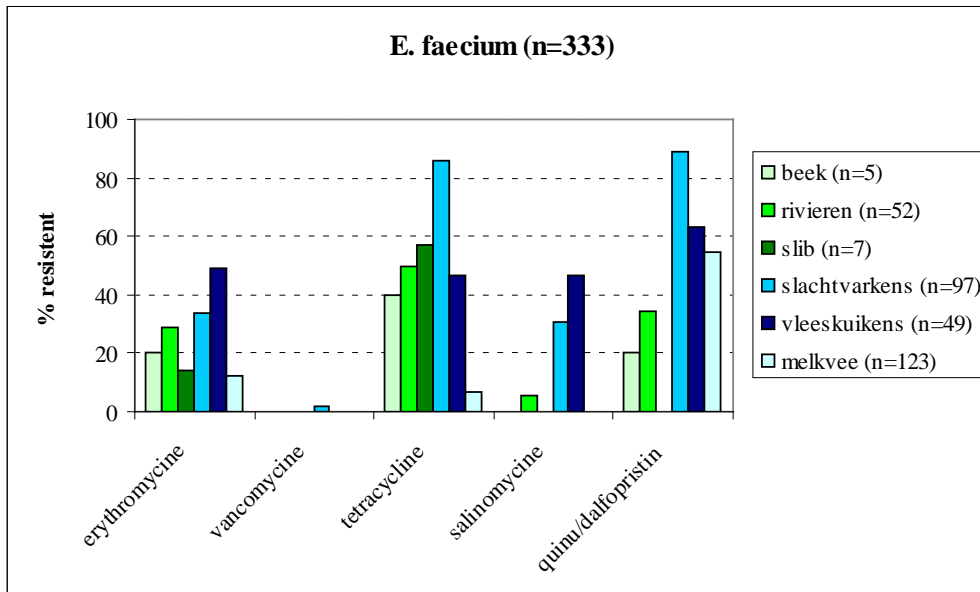


Figuur 14 Percentage resistente *E. coli*-isolaten uit rivieren, beek en slibmonsters in Noordoost-Brabant vergeleken met isolaten afkomstig uit slachtvarkens, vleeskuikens en melkvee (MARAN, 2007)

* aantal getest voor sulfamethoxazole.

Enterococcen

De resistenties die gevonden werden bij *E. faecium*- en *E. faecalis*-stammen uit slib en/of oppervlaktewater kwamen ook voor bij landbouwhuisdieren (Figuur 15). De prevalentie van erythromycine- en tetracyclineresistentie was bij *E. faecium*-isolaten uit rivieren vergelijkbaar met stammen uit vleeskuikens en/of in slachtvarkens. Salinomycineresistentie kwam echter vijf tot acht keer minder vaak voor in de *E. faecium*-stammen uit de rivieren, en quinupristine-/dalfopristine-resistentie twee tot drie keer minder vaak. Vancomycineresistentie, wat bij 2% van de stammen uit slachtvarkens werd gevonden, werd bij geen van de 64 *E. faecium*-isolaten uit het milieu aangetroffen. De resistenties die het meest frequent werden aangetroffen bij *E. faecalis*-stammen uit oppervlaktewater, tetracycline- en erythromycineresistentie, komen ook frequent voor bij stammen uit feces van landbouwhuisdieren. De prevalentie van resistente isolaten uit oppervlaktewater was voor beide antibiotica twee tot drie keer lager dan de prevalentie van resistentie *E. faecalis*-stammen uit feces van mestkuikens en slachtvarkens.

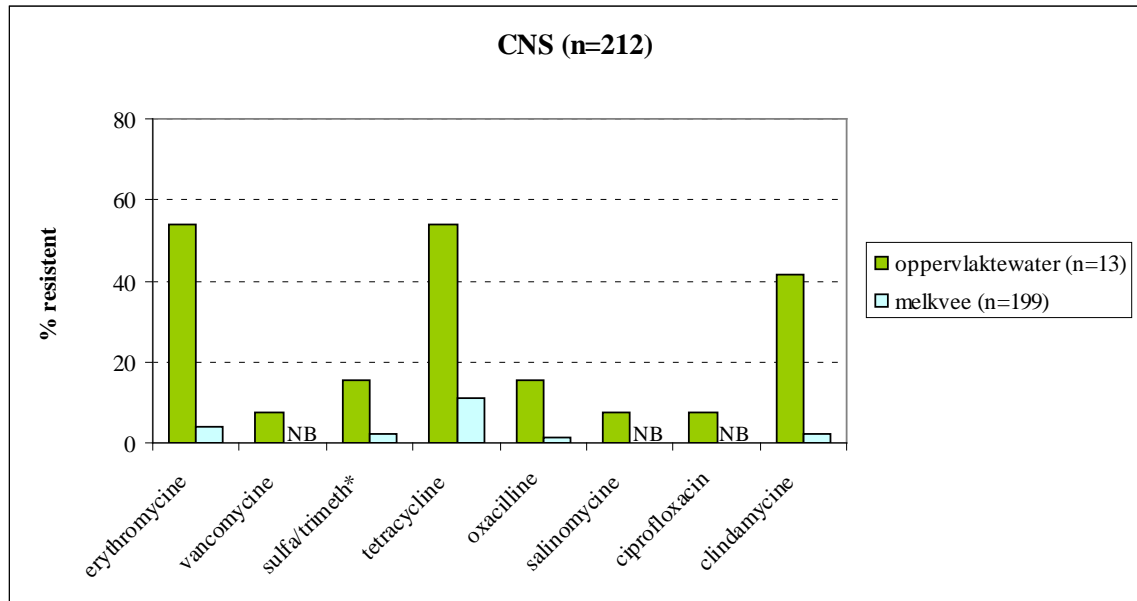


Figuur 15 Percentage resistente *E. faecium*- (boven) en *E. faecalis*-isolaten (onder) uit rivieren, beek en slib in Noordoost-Brabant, vergeleken met isolaten afkomstig uit slachtvarkens, vleeskuikens en melkvee (MARAN, 2007)

Niet weergegeven zijn de antibiotica oxacilline en sulfamethoxazole/trimethoprim, omdat geen gegevens voor landbouwhuisdieren in Nederland bekend zijn.

Staphylococcen

Voor staphylococcen zijn in Maran (MARAN, 2007) alleen gegevens over antibioticaresistentie beschikbaar voor isolaten uit melk van koeien met mastitis. In Figuur 16 zijn deze gegevens vergeleken met de CNS-stammen uit de watermonsters. De percentages antibioticaresistente CNS-stammen die werden gevonden in oppervlaktewater waren hoger dan in melk van koeien met mastitis.

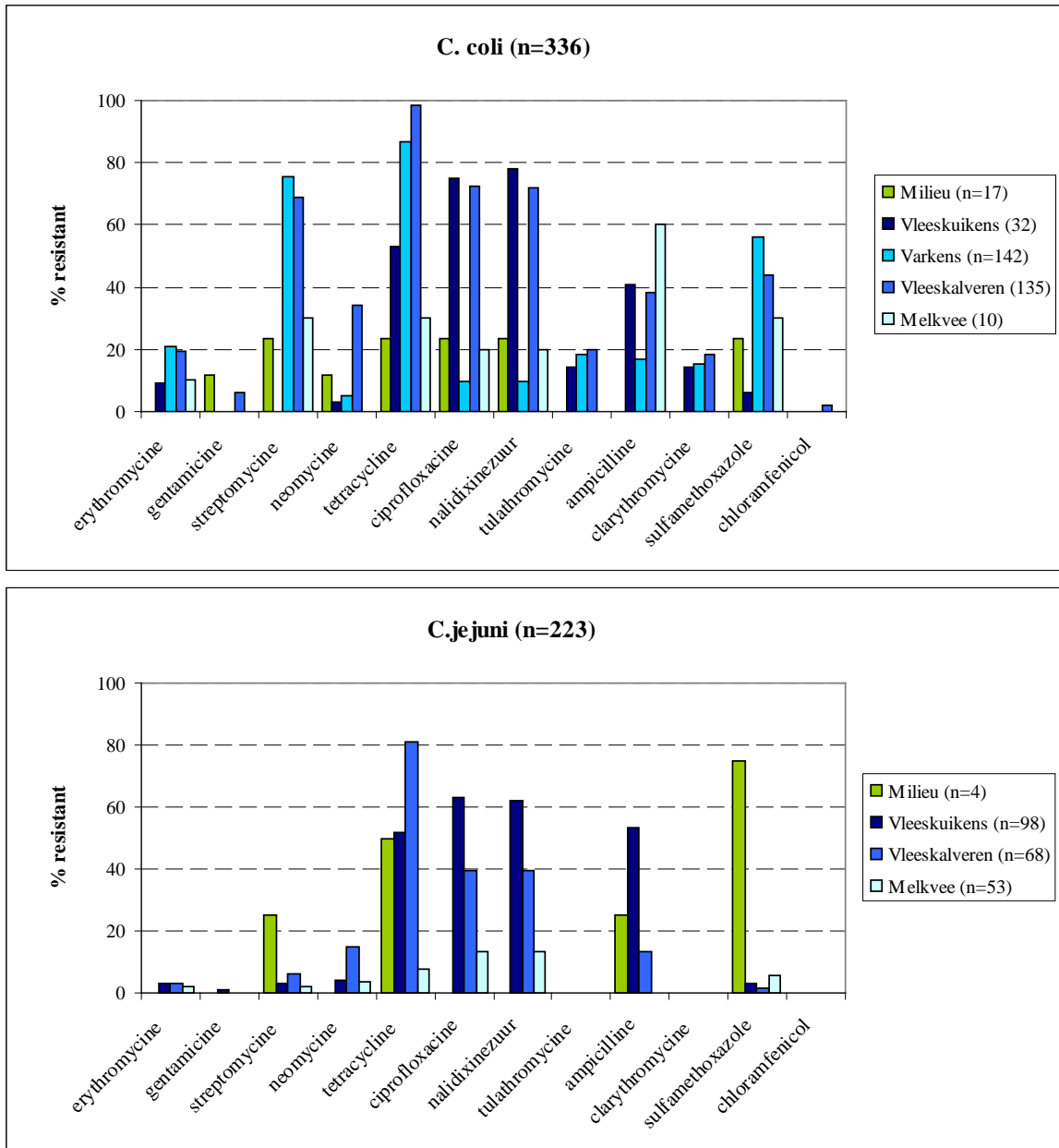


Figuur 16 Percentages resistente CNS uit oppervlaktewater in Noordoost-Brabant vergeleken met CNS-isolaten afkomstig uit melkkoeien met mastitis (MARAN, 2007)

NB = niet bekend.

Campylobacter

Alle resistenties die bij *C. coli* en *C. jejuni* uit oppervlaktewater en slib zijn gevonden werden ook bij vee gevonden (Figuur 17). In het milieu werden bij *C. coli* vooral de resistenties teruggevonden die in 2006/2007 bij mestkalveren, mestkuikens en/of varkens met de hoogste frequentie werden gevonden, namelijk resistenties tegen streptomycine, tetracycline, ciprofloxacine, nalidixinezuur en sulfamethoxazole. Een uitzondering hierop waren de bij *C. coli*-isolaten uit het milieu aangetroffen resistenties tegen gentamicine en neomycine, relatief weinig bij dieren werden aangetroffen. Voor *C. jejuni*-isolaten uit het milieu leek er geen correlatie te zijn met wat er bij de dieren gevonden werd. In de meeste gevallen waren de percentages resistentie hoger bij de dier-isolaten, in sommige gevallen kwamen resistenties echter vaker voor bij de milieu-isolaten (*C. coli*: gentamicine; *C. jejuni*: streptomycine en sulfamethoxazole).



Figuur 17 Resistente *C. coli* (boven) en *C. jejuni*-stammen (onder) afkomstig uit onderzochte milieumonsters (oppervlaktewater en slib) in Noordoost-Brabant, per antibioticum vergeleken met *C. coli*- en *C. jejuni*-stammen uit vee (MARAN, 2007)

4 Discussie

De onderzochte microbiële populatie in oppervlaktewater en slib in een gebied met een hoge concentratie aan veehouderijen in het noordoostelijke deel van de provincie Noord-Brabant bevat hoge percentages antibioticaresistente en multiresistente bacteriën. Bij commensale bacteriën en (opportunistische) pathogenen, *E. coli*, enterococcen, staphylococcen en *Campylobacter*, varieerden de percentages resistente stammen van 29 tot 80%. Bij dezelfde bacteriën was 19 tot 75% resistent tegen twee of meer antibiotica. Omdat de milieubacteriën *Aeromonas* en *P. aeruginosa* intrinsiek resistent zijn tegen één (*Aeromonas*) of drie (*P. aeruginosa*) van de geteste antibiotica, waren alle geïsoleerde stammen antibioticumresistent. Echter, respectievelijk 80 en 41% van de isolaten had ook resistentie tegen één of meer andere antibiotica verworven. Hieronder volgen discussies met betrekking tot de verschillende bacteriesoorten en de gevonden antibioticaresistenties in relatie tot locatie, mogelijke bronnen en volksgezondheid.

4.1 *Enterococcus*-, *Staphylococcus*-, en *Campylobacter*-soorten in het milieu

De enterococcen-soorten die in de milieumonsters werden aangetroffen waren voornamelijk *E. faecium*, *E. faecalis*, *E. durans*, en *E. hirae*. Daarnaast werden *E. mundtii*, *E. casseliflavus*, en *E. gilvus* geïsoleerd, en één isolaat dat – gebaseerd op de 16S-sequentie – geïdentificeerd werd als *E. caccae*, *E. moraviensis* of *E. silesiacus*. Bij mensen wordt 80 tot 90% van alle enterococcen-infecties veroorzaakt door *E. faecalis*, de rest is grotendeels geassocieerd met *E. faecium*. Hoewel alle overige gevonden soorten ook infecties bij mensen kunnen veroorzaken, gebeurt dit minder frequent (Ruoff et al., 1990; Kaufhold en Ferrieri, 1991; Jett et al., 1994; Tyrell et al., 2002; Carvalho et al., 2006).

Van de 26 *Staphylococcus*-stammen die uit de milieumonsters geïsoleerd werden, waren er 5 *S. aureus* (coagulase-positief), maar de meerderheid was coagulase-negatief. De gevonden coagulase-negatieve *Staphylococcus* (CNS)-soorten waren *S. cohnii ssp. urealyticum*, *S. condimentii*, *S. epidermidis*, *S. lentus*, *S. pulvereri*, en *S. simulans*. Net als *S. aureus* zijn CNS zeer belangrijke veroorzakers van ziekenhuisinfecties (Jarvis en Martone, 1992; Kloos en Bannerman, 1994; Huebner en Goldmann, 1999; NNIS, 1999). Ze veroorzaken met name ‘vreemdlichaam’ infecties zoals infecties van katheters (lijnsepsis). *S. epidermidis* is de belangrijkste veroorzaker van dit soort infecties (Kloos en Bannerman, 1994; Huebner en Goldmann, 1999; Uçkay et al., 2009). Hoewel dit niet vaak beschreven is kunnen ook *S. lentus*, *S. pulvereri*, *S. cohnii* en *S. simulans* infecties bij mensen veroorzaken (Zakrewska-Czerwińska et al., 1995; Basaglia et al., 2003; Stepanović et al., 2003; Stepanović et al., 2005; Arciola et al., 2006). *S. condimentii* is geassocieerd met gefermenteerd voedsel (Probst et al., 1998; Zell et al., 2008), infecties van mensen zijn niet beschreven. Hoewel de meeste uit milieu-monsters geïsoleerde *Staphylococcus*-soorten en een groot aantal van de *Enterococcus*-soorten klinisch van gering belang blijken, zijn het wel soorten die mensen kunnen koloniseren en daarmee antibioticaresistentie naar mensen overbrengen.

Het merendeel van de geïsoleerde *Campylobacter*-stammen uit het milieu waren *C. coli*. Daarnaast werden *C. jejuni* en *C. lari* aangetroffen. Van deze 3 humane pathogenen is *C. jejuni* verantwoordelijk voor meer dan 90% van alle humane infecties, gevolgd door *C. coli* (ongeveer 10%) en *C. lari* (<1%) (Healing et al., 1992; Gillespie et al., 2002).

4.2 Resistentie bij milieubacteriën

Bij de milieubacteriën *Aeromonas* en *P. aeruginosa*, die in staat zijn zich onder gunstige condities in oppervlaktewater te vermenigvuldigen, werden resistenties tegen meerdere van de onderzochte antibiotica waargenomen. Voor het bepalen van resistentie werd voor de milieubacteriën gebruikgemaakt van klinische breakpoints, omdat er geen epidemiologische cut-offwaarden bekend zijn. Hierdoor kon niet worden vastgesteld of de onderzochte bacteriën een hogere mate van resistentie hebben dan 'normaal', dat wil zeggen, ten opzichte van wildtype isolaten die niet onder invloed staan van selectiedruk. Om te beoordelen of de gevonden resistenties bijzonder zijn of niet, moeten de bevindingen vergeleken worden met resistenties beschreven voor andere isolaten van dezelfde soort.

Behalve intrinsieke resistentie tegen ampicilline werd bij *Aeromonas*-isolaten ook verworven resistentie waargenomen. Er was hierbij geen verschil in percentages resistentie tussen isolaten uit de beek en isolaten uit de rivieren. Echter, in het slib afkomstig uit de rivier de Hooge Raam kwam resistentie tegen trimethoprim en tetracycline vaker voor dan in de watermonsters. Resistentie tegen deze twee antibiotica werd ook vaker aangetroffen bij *A. caviae* en *A. sobria* dan bij *A. hydrophila*. De meerderheid van de isolaten uit slib waren *A. hydrophila* (64%), en de hogere frequentie van resistentie tegen deze antibiotica in slibmonsters kan daarom niet verklaard worden door een oververtegenwoordiging van *A. sobria* en *A. caviae* in slib. Huddleston *et al.* (2006) onderzochten de resistentie tegen verschillende antibiotica voor 104 isolaten uit water en slib uit rivieren en meren in New Mexico (Huddleston *et al.*, 2006). Zij vonden dat geen van hun isolaten resistent was tegen sulfamethoxazole en tetracycline, terwijl 26% resistent was tegen trimethoprim. Van de niet-klinische isolaten onderzocht door Kämpfer *et al.* (1999) was 10% resistent tegen tetracycline en 29% tegen sulfamethoxazole, terwijl geen van de isolaten resistent was tegen trimethoprim (Kämpfer *et al.*, 1999). In dezelfde studie werden vergelijkbare percentages gevonden bij klinische isolaten. Zowel Kämpfer *et al.* als Huddleston *et al.* gingen voor deze antibiotica uit van dezelfde breakpoints die ook in de hier gerapporteerde studie werden gebruikt. In de huidige studie was 60-78% van de isolaten resistent tegen sulfamethoxazole, 1-40% tegen tetracycline en was 13-40% van de stammen uit water en slib resistent tegen trimethoprim. Zeven procent van de *Aeromonas*-stammen had voor cefotaxime een MIC-waarde hoger dan 16 mg/L. Een onbekend gedeelte van deze stammen heeft mogelijk een MIC-waarde hoger dan 32 mg/L, wat betekent dat $\leq 7\%$ van de stammen resistent zijn gebaseerd op het CLSI-breakpoint. Hoewel de epidemiologische cut-offwaarde voor cefotaxime voor *Aeromonas* (nog) niet bekend is, is het gezien de MIC-distributie van de *Aeromonas*-stammen uit oppervlaktewater aannemelijk dat deze aanzienlijk lager is dan het klinische break-point. Het overgrote merendeel van de isolaten had een MIC van $\leq 0,125$ mg/L, wat vergelijkbaar is met andere gram-negatieve bacteriën zoals *E. coli* en *Klebsiella spp.*, waarvan de cut-offwaarden respectievelijk 0,25 en 0,125 mg/L zijn (EUCAST, 2010). Het is daarom waarschijnlijk dat het percentage *Aeromonas*-stammen met verworven resistentie voor cefotaxime in werkelijkheid hoger is dan de maximaal 7% gebaseerd op het CLSI-breakpoint.

De geïsoleerde *P. aeruginosa*-stammen waren 100% resistent tegen trimethoprim, tetracycline en ampicilline. *P. aeruginosa* staat bekend om een hoge mate van intrinsieke resistentie tegen verschillende klassen van antibiotica, zoals beta-lactamen, tetracycline, trimethoprim en chloramphenicol (Livermore, 2002; Mesaros *et al.*, 2007; Strateva en Yordanov, 2009). Daarnaast is *P. aeruginosa* in staat om zeer snel resistenties te verwerven. Hoewel quinolone- en carbapenemresistentie bij *P. aeruginosa* vaak beschreven is (Livermore, 2002; Strateva en Yordanov, 2009), was in de huidige studie geen van de gevonden milieu-isolaten resistent tegen ciprofloxacine, meropenem of imipenem. Wel was 23% van de isolaten resistent tegen sulfamethoxazole, en was mogelijk een gedeelte van de isolaten resistent tegen cefotaxime (isolaten met MIC >16 mg/L).

Sulfamethoxazoleresistentie en MIC-waarden >16 mg/L voor cefotaxime kwamen vaker voor bij isolaten uit de rivieren dan uit de beek.

De bevindingen uit de huidige studie en vorige studies laten zien dat het percentage resistente *Aeromonas*-stammen dat in het milieu gevonden wordt variabel is, waarschijnlijk als gevolg van een verschillende mate van belasting van de omgeving met antibiotica of bacteriën met antibioticaresistentie. In hoeverre er hierbij in de rivieren en de beek op het recreatieterrein een rol is voor verschillende dierlijke en humane bronnen, is niet te achterhalen. Er zijn geen resistentiegegevens bekend van *Aeromonas*- en *P. aeruginosa*-isolaten bij landbouwhuisdieren in Nederland, en de antibiotica waartegen resistenties bij deze isolaten zijn waargenomen worden zowel in de humane als de diergezondheidszorg gebruikt. Hoewel het aannemelijk is dat ten minste een deel van de resistente *Aeromonas* en *P. aeruginosa*-isolaten in de water- en slibmonsters afkomstig is uit humane of dierlijke bronnen, is het niet uit te sluiten dat een deel van de isolaten resistenties heeft verworven via 'horizontal gene transfer', waarbij resistentiegenen van resistente bacteriën uit humane of dierlijke bronnen worden overgedragen naar bacteriën uit het milieu.

4.3 Resistentie in relatie tot fecale bronnen

Het huidige onderzoek werd in agrarisch gebied uitgevoerd, om de rol van landbouwhuisdieren in de verspreiding van resistentie naar het milieu te onderzoeken. In agrarisch gebied is te verwachten dat de bijdrage van dierlijke bronnen aan fecale contaminatie groter is dan de bijdrage van humane bronnen. Daarnaast werd verwacht dat de bijdrage van landbouwhuisdieren aan de verspreiding van resistentie naar het milieu relatief groot is, vanwege het vele malen hogere antibioticumgebruik in de veeteelt vergeleken met het gebruik in de humane gezondheidszorg in Nederland (Geijlswijk et al., 2009).

Antibiotica die op veehouderijen veel worden gebruikt zijn tetracyclines, sulfonamiden/ trimethoprim, penicillines, macroliden en, bij vleeskuikenhouderijen, ook (fluoro)quinolonen en aminoglycosiden. Bij *E. coli*-, *Campylobacter*- en *Enterococcus*-stammen die geïsoleerd worden uit slachtvarkens, vleeskuikens en vleeskalveren worden resistenties tegen antibiotica uit deze groepen in zeer hoge frequenties aangetroffen (MARAN, 2007). Bij gram-negatieve bacteriën zijn dit vooral resistenties tegen tetracycline, sulfamethoxazole en/of trimethoprim, ciprofloxacin/nalidixinezuur, streptomycine en ampicilline, bij gram-positieve bacteriën vooral resistenties tegen tetracycline, erythromycine, streptomycine, en bij *E. faecium*, ook tegen quinupristine/dalfopristine. Bij de *E. coli*-, *Campylobacter*- en *Enterococcus*-stammen uit oppervlaktewater en slib werden resistenties tegen dezelfde antibiotica aangetroffen, zij het in het algemeen met een lagere frequentie dan bij de landbouwhuisdieren. De gevonden resistenties bij commensalen en pathogenen kunnen erop duiden dat een deel van de stammen die geïsoleerd zijn uit water en slib in het milieu terecht zijn gekomen door afspoeling van mest van slachtvarkens en/of vleeskuikens. De lagere frequenties in het milieu kunnen verklaard worden door verdunning in het milieu. Verdunning in het milieu kan ook verklaren dat resistenties die slechts met een lage frequentie in slachtvee voorkomen, zoals vancomycine- en salinomycineresistentie bij enterococci, niet in de milieumonsters werden aangetroffen.

Er waren ook discrepanties tussen milieu- en dier-isolaten. Zo werd ampicillineresistentie bij *C. coli* in hoge frequentie aangetroffen bij zowel slachtvarkens, slachtkippen, vleeskalveren, en melkvee, maar niet in oppervlaktewater en slib. Daarnaast werden sommige antibioticaresistenties vaker of met vergelijkbare frequentie aangetroffen in het milieu vergeleken met slachtvee. Er van uitgaande dat er in het milieu verdunning plaatsvindt van resistente bacteriën zou een even hoge of zelfs hogere frequentie in het milieu de aanwezigheid van additionele bronnen kunnen betekenen. Een alternatieve verklaring is dat de gegevens van landbouwhuisdieren uit MARAN (2007) landelijke gegevens zijn, en er

mogelijk regionale verschillen zijn. Een voorbeeld van relatief hoge prevalentie in het onderzochte gebied vergeleken met Nederlandse landbouwhuisdieren was gentamicineresistentie bij *C. coli*. Deze resistentie werd bij landbouwhuisdieren alleen bij isolaten uit vleeskalveren gevonden, en bij deze dieren met een lagere frequentie dan in het oppervlaktewater en slib. Een ander voorbeeld is cefotaximeresistentie bij *E.coli*-isolaten, waarvan de prevalentie in de rivieren vergelijkbaar was met de prevalentie bij vleeskuikens, maar die nauwelijks bij andere landbouwhuisdieren wordt aangetroffen.

Antibioticaresistenties van staphylococconen zijn bij Nederlandse landbouwhuisdieren alleen beschreven voor isolaten uit melkvee (MARAN, 2007). Antibioticaresistentie komt bij deze isolaten vergeleken met *Campylobacter*, enterococconen en *E. coli* uit slachtvee relatief weinig voor (MARAN, 2007). Bij de staphylococconen uit oppervlaktewater en slib werden hoge percentages tetracycline-, erythromycine- en clindamycineresistentie waargenomen. De vier isolaten met de hoogste klinische relevantie, de drie *S. aureus*-isolaten en één *S. epidermidis*-isolaat, waren zelfs resistent tegen vijf tot zeven van de acht geteste antibiotica. Alle drie de geïsoleerde *S. aureus*-stammen waren resistent tegen oxacilline met hoge MIC-waarden (16 mg/L of >32mg/L). Deze hoge oxacilline MIC-waarden duiden op de aanwezigheid van het *MecA*-gen (Sakoulas et al., 2001; Lee et al., 2004), en suggereren dat deze drie stammen methicilline-resistente *S. aureus*, of MRSA zijn (Goettsch et al., 2000; CLSI, 2009). Twee resistenties die met een hoge frequentie voorkomen bij MRSA-stammen uit vleeskalveren en varkens, clindamycine en erythromycine (MARAN, 2007), kwamen ook bij de drie MRSA stammen uit oppervlaktewater voor. Echter, tetracyclineresistentie dat bij bijna alle in 2006/2007 geteste MRSA-stammen uit vleeskalveren en varkens in Nederland voorkomt, kwam slechts bij 1 van de 3 isolaten uit oppervlaktewater voor. Ook het *S. epidermidis*-isolaat was resistent tegen oxacilline, clindamycine, erythromycine, en tetracycline. De *S. aureus*- en *S. epidermidis*-stammen bleken daarnaast resistent tegen vancomycine. Vancomycine-resistente staphylococconen komen, voor zover bekend, sporadisch voor bij mens en dier, en zijn nog niet eerder in Nederland aangetoond. Omdat de stammen waren afgestorven konden de resultaten niet worden bevestigd. Lysaten van deze stammen (gemaakt en opgeslagen in 2006), zijn recent op het CVI in Lelystad getest op de aanwezigheid van het *VanA*- en *MecA*-gen. In geen van de lysaten konden deze genen worden aangetoond met behulp van moleculaire technieken (K. Veldman, persoonlijke communicatie, juli 2010). Het is echter niet uit te sluiten dat dit resultaat verklaard wordt door een slechte kwaliteit van deze lysaten, veroorzaakt door 4 jaar opslag bij -20°C. Vanwege de klinische relevantie – infecties met deze stammen zijn niet of nauwelijks meer te behandelen – dient vervolgonderzoek uit te wijzen of vancomycine-resistente staphylococconen daadwerkelijk aangetoond kunnen worden in oppervlaktewater.

Het percentage resistente *E. coli*-, *Enterococcus*- en *Staphylococcus*-stammen bij melkvee was veel lager dan dat bij slachtvee. De in het algemeen relatief lage resistentiepercentages bij melkvee zijn gerelateerd aan het relatief lage antibioticumgebruik op melkveebedrijven in vergelijking tot slachtvarkens- en vleeskuikenbedrijven (MARAN, 2007). De percentages resistente stammen uit oppervlaktewater en slib waren in het algemeen intermediair aan wat gevonden werd bij slachtvarkens/vleeskuikens en melkvee. Een uitzondering hierop was resistentie tegen quinupristine/dalfopristine bij *E. faecium*. Op basis van deze resultaten is het waarschijnlijk dat melkvee weinig bijdraagt aan de populatie antibioticaresistente bacteriën van deze soorten in het milieu. Dit wordt ondersteund door het feit dat er in het onderzochte gebied veel meer vleeskuikens en slachtvarkens worden gehouden dan dat er melkvee gehouden wordt. Gezien de overeenkomsten in resistentiepatronen bij bacteriestammen uit slachtvee en stammen van dezelfde bacteriesoorten uit oppervlaktewater of slib is het wel aannemelijk dat de aangetroffen antibioticaresistente bacteriën minstens gedeeltelijk afkomstig zijn uit mest van slachtvee. De gevonden discrepanties tussen antibioticaresistentie bij stammen uit Nederlands slachtvee en stammen van dezelfde soort uit het milieu kunnen verklaard worden door regionale verschillen in resistentiepatronen bij slachtvee, of erop duiden dat er in het onderzochte gebied sprake is van meerdere contaminatiebronnen.

4.4 Resistentie in rivieren versus beek op recreatieterrein

Vóór aanvang van het onderzoek werd verondersteld dat de beek op het recreatieterrein aan minder fecale verontreinigingsbronnen blootstond dan de rivieren in het onderzochte gebied. Bovenal werd aangenomen dat de beek niet onder invloed zou staan van lozingen vanuit de veehouderijen in de omgeving. De verwachting was daarom dat een gering aantal bacteriën van fecale herkomst zou worden aangetroffen in de beek, en dat deze weinig resistentie tegen antibiotica zouden vertonen. Met uitzondering van *E. coli*, *E. faecium* en *Aeromonas* werd per bacterie-genus of -soort slechts een gering aantal isolaten verkregen, waardoor het in veel gevallen niet mogelijk was om verschillen in antibioticaresistentie per locatie van herkomst, verschillende rivieren, beek en slib, vast te stellen.

Voor *E. coli*, *E. faecium*, *E. faecalis*, *Aeromonas*, maar ook voor *P. aeruginosa* konden de isolaten uit de rivieren en de beek worden vergeleken. De bevindingen waren echter tegenstrijdig. Voor *E. coli* waren er duidelijk verschillen in antibioticaresistentie tussen de isolaten afkomstig van de verschillende locaties. Het totale percentage resistente *E. coli* in water uit de beek op het recreatieterrein was veel lager dan in het water uit de rivieren en uit het slib, en in het water uit de beek werden geen multiresistente *E. coli* aangetroffen, terwijl dat voor de rivieren wel het geval was. In de beek werd – in tegenstelling tot de rivieren – geen resistentie tegen streptomycine en chloramphenicol gevonden, twee antibiotica die met name in de veterinaire gezondheidszorg gebruikt worden. Deze bevindingen zijn in overeenstemming met de vooraf gemaakte aanname dat het water in de beek onder geringere invloed van lozingen uit de veeteeltbedrijven staat. Echter, bij *E. faecium* en *E. faecalis* waren de percentages resistente stammen en de gevonden resistenties vergelijkbaar voor isolaten uit de beek en de rivieren, wat juist suggereert dat de rivieren en de beek aan dezelfde bronnen blootstaan. Een indicatie dat er mogelijk toch sprake is van verschillende *Enterococcus*-bronnen, is de bevinding dat alleen bij *E. faecium* uit de rivieren resistentie tegen salinomycine werd gevonden, een antibioticum dat uitsluitend in de diergezondheidszorg gebruikt wordt. Salinomycineresistentie werd ook aangetroffen bij sommige *E. hirae*- en *E. durans*-isolaten, ook hier alleen bij isolaten uit de rivieren. *E. hirae* werd niet aangetroffen in de beek en de percentages salinomycine-resistente *E. faecium*-en *E. durans*-isolaten in de rivieren waren laag (6% en 3% respectievelijk), waardoor het niet kan worden uitgesloten dat de afwezigheid van resistentie tegen dit antibioticum in de beek te verklaren is door het lage aantal stammen dat uit de beek was geïsoleerd. Een tweede indicatie dat er sprake is van verschillende *Enterococcus*-bronnen is dat uit de beek ruim twee keer vaker *E. faecalis* (48%) dan *E. faecium* (19%) werd geïsoleerd, terwijl dit precies andersom was bij de rivieren, namelijk 14% en 49% respectievelijk. Gezien *E. faecalis* de meest voorkomende *Enterococcus*-soort is bij mensen suggereert deze bevinding dat de beek meer aan humane bronnen blootstaat dan aan dierlijke bronnen. Voor de milieubacterie *Aeromonas* werden geen duidelijke verschillen in percentages resistentie tussen de rivieren en de beek gevonden, terwijl voor *P. aeruginosa* de percentages resistentie voor twee van de geteste antibiotica lager waren in isolaten uit de beek.

In conclusie lijkt het erop dat voor de rivieren de veehouderijen een belangrijke bron van fecale contaminatie zijn, maar additionele bronnen kunnen niet uitgesloten worden. Voor de beek is er mogelijk sprake van andere bronnen van fecale verontreiniging dan voor de rivieren, zoals humane fecale verontreiniging of mogelijk ook inbreng van fecaal materiaal van in het gebied levende wilde dieren, waardoor voor sommige bacteriesoorten stammen met andere resistentiepatronen werden geïsoleerd.

4.5 Bijzonder-resistente micro-organismen (BRMO) in het milieu

Onder de gevonden antibioticaresistente bacteriën in het milieu kwam een aantal voor die aangemerkt kunnen worden als 'bijzonder-resistente micro-organismen' of BRMO (WIP, 2009). Dit zijn micro-organismen die ziekenhuisinfecties veroorzaken, en die resistent zijn tegen het antibioticum van eerste keus of tegen meerdere antibiotica, waardoor infecties moeilijk te behandelen zijn. MRSA is de meest bekende BRMO. Andere BRMO zijn bijvoorbeeld extended spectrum beta-lactamase (ESBL)-producerende *E. coli*, en vancomycine-resistente *E. faecalis* en *E. faecium* (VRE). In de milieumonsters werden behalve MRSA-stammen *E. coli*-stammen (4,5%) aangetroffen die resistent waren tegen cefotaxime met MIC-waarden ≥ 2 mg/L (variërend van 2 tot 32 mg/L). Deze hoge MIC-waarden duiden op de aanwezigheid van ESBLs (CDC, 2009). ESBL-producerende *E. coli*-stammen zijn resistent tegen alle cephalosporines en penicillines (Cantón et al., 2008; Coque et al., 2008), waardoor infecties moeilijker te behandelen zijn. Omdat de isolaten tijdens opslag afgestorven waren kon de productie van ESBLs echter niet meer bevestigd worden. De verdachte ESBL-producerende *E. coli*-stammen werden in alle drie de rivieren gevonden (in water en slib), maar niet in de beek op het recreatieterrein.

4.6 Antibioticaresistentie in milieu en volksgezondheid

De aanwezigheid van hoge percentages antibioticaresistente bacteriën: commensalen, pathogenen en opportunistische pathogenen, in oppervlaktewater en slib, bevestigen de rol van het milieu als verzamelvat van antibioticaresistentie afkomstig uit verschillende bronnen. Daarnaast speelt oppervlaktewater mogelijk een rol bij de verspreiding van resistentie, en kunnen er resistentiegenen tussen verschillende bacteriën uitgewisseld worden. Door de uitwisseling van genen tussen bacteriën van verschillende oorsprong zouden er nieuwe bacteriesoortresistentiecombinaties kunnen ontstaan. De resultaten uit deze studie geven geen uitsluitsel over de mogelijke volksgezondheidsrisico's die samenhangen met het voorkomen van antibioticaresistente bacteriën in oppervlaktewater, omdat blootstelling en overdracht niet werden onderzocht. Het is echter voorstelbaar dat mensen via water worden blootgesteld aan pathogenen die resistent zijn tegen een of meerdere antibiotica, met als gevolg een infectie die moeilijk te behandelen is. Een groter volksgezondheidsrisico is mogelijk de blootstelling aan en kolonisatie door antibioticaresistente commensalen. Deze kunnen resistentiegenen doorgegeven aan in de darmen aanwezige flora, met als gevolg dat mensen drager worden van resistente bacteriën. Deze bacteriën kunnen vervolgens overgedragen worden aan mensen met een verminderde weerstand, zoals ziekenhuispatiënten, danwel hun resistentie overdragen aan pathogenen. Ten behoeve van een toekomstige blootstellingsrisicoschatting is het van belang het aantal antibioticaresistente bacteriën in diverse bronnen te kwantificeren, en de bijdrage van verschillende typen bronnen aan emissie van resistentie naar het milieu in te schatten. Daarbij kan gedacht worden aan:

- afvalwater van instellingen waar veel antibiotica gebruikt worden, zoals zieken- en verpleegtehuizen;
- afvalwater van grote steden, om de bijdrage van antibioticagebruik buiten zorginstellingen te inventariseren;
- bronnen van resistentie van dierlijke oorsprong zoals mest en afvalwater van slachthuizen;
- bronnen van resistentie afkomstig uit het buitenland, zoals afvalwater van internationale luchthavens.

5 Conclusies

In oppervlaktewater en slib in het onderzochte gebied met intensieve veeteelt in Noordoost-Brabant komen hoge percentages antibioticaresistente bacteriën voor die mensen kunnen koloniseren of die pathogeen zijn.

De herkomst van de antibioticaresistente bacteriën in het oppervlaktewater en slib kan niet bevestigd worden, maar er zijn aanwijzingen dat een deel van de geïsoleerde bacteriën afkomstig is uit mest van nabijgelegen veeteeltbedrijven.

Er zijn verschillende resistentiepatronen waargenomen bij bacteriën die tot hetzelfde genus of dezelfde species behoren, maar die afkomstig zijn van een andere locatie in het onderzochte gebied. Dit kan duiden op beïnvloeding van het oppervlaktewater door verschillende bronnen.

Dankwoord

De auteurs zijn Dik Mevius en Kees Veldman van het Centraal Veterinair Instituut te Lelystad zeer erkentelijk voor hun bijdrage aan deze studie door inhoudelijke discussies en advies bij de praktische uitvoering van resistentiebepalingen. Daarnaast danken we alle leden van de begeleidingscommissie voor hun input tijdens projectbesprekingen.

Literatuur

Anderson KL, Whitlock JE en Harwood VJ (2005). Persistence and differential survival of fecal indicator bacteria in subtropical waters and sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 3041-3048.

Anonymous (1987). NEN 6573 Bacteriologisch onderzoek van water - Onderzoek met behulp van membraanfiltratie naar de aanwezigheid en het aantal kolonievormende eenheden (KVE) van *Pseudomonas Aeruginosa*. Nederlands Normalisatie Instituut, Delft.

Anonymous (1989). NEN 6263 Bacteriologische onderzoek in water; Onderzoek met behulp van membraanfiltratie naar de aanwezigheid en het aantal kolonievormende eenheden (KVE) van *Aeromonas*-bacteriën. Nederlands Normalisatie Instituut, Delft.

Anonymous (1992). NEN 6559 Bacteriologisch onderzoek van water – Monsterneming en conservering. Nederlands Normalisatie Instituut, Delft.

Anonymous (1996). NEN 6269 Bacteriologisch onderzoek van water. Onderzoek naar de aanwezigheid en/of het meest waarschijnlijke aantal van thermofiele *Campylobacter*-bacteriën. Nederlands Normalisatie Instituut, Delft.

Anonymous (1999). NEN-EN-ISO 6888-1 Microbiologie van voedingsmiddelen en diervoeders - Horizontale methode voor de bepaling van coagulase positieve staphylococci (*Staphylococcus aureus* en andere soorten) - Deel 1: Methode met behulp van het Baird-Parker medium. Nederlands Normalisatie Instituut, Delft.

Anonymous (2000a). NEN-EN-ISO 7899-2 Water quality - Detection and enumeration of intestinal enterococci - part 2: Membrane filtration method. Nederlands Normalisatie Instituut, Delft.

Anonymous (2000b). NEN-EN-ISO 9308-1 Water - Detectie en enumeratie van *Escherichia coli* en bacteriën van de coligroep - Deel 1: Methode met membraanfiltratie. Nederlands Normalisatie Instituut, Delft.

Anonymous (2003a). NEN-EN-ISO 19250 (Draft) Water quality - Detection of *Salmonella* species. Nederlands Normalisatie Instituut, Delft.

Anonymous (2003b). Verordening (EG) Nr. 1831/2003 van het Europees parlement en de raad.

Arana I, Justo JI, Muela A, Pocino M, Iriberry J en Barcina I (1997). Influence of a survival process in a freshwater system upon transfer between *Escherichia coli* strains. *Microbial Ecology* 33: 41-49.

Arciola CR, Campoccia D, An YH, Baldassarri L, Pirini V, Donati ME, Pegreff F en Montanaro L (2006). Prevalence of antibiotic resistance of 15 minor staphylococcal species colonizing implants. *Int. J. Artif. Organs* 29: 395-401.

Basaglia G, Moras L, Bearz A, Scalone S en De Paoli P (2003). *Staphylococcus cohnii* septicaemia in a patient with colon cancer. *J. Med. Microbiol.* 52: 101-102.

Blanch AR, Caplin JL, Iversen A, Kühn I, Manero A, Taylor HD en Vilanova X (2003). Comparison of enterococcal populations related to urban and hospital wastewater in various climatic and geographic European regions. *J. Appl. Microbiol.* 94: 994-1002.

- Cantón R, Novais A, Valverde A, Machado E, Peixe L, Baquero F en Coque TM (2008). Prevalence and spread of extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae in Europe. *Clin. Microbiol. Infect.* 14 (Suppl.1): 144-153.
- Caplin JL, Hanlon GW en Taylor HD (2008). Presence of vancomycine and ampicillin-resistant *Enterococcus faecium* of epidemic clonal complex-17 in wastewaters from the south coast of England. *Environ. Microbiol.* 10: 885-892.
- Carvalho MG, Shewmaker PL, Steigerwalt AG, Morey RE, Sampson AJ, Joyce K, Barret TJ, Teixeira LM en Facklam RR (2006). *Enterococcus caccae* sp. nov., isolated from human stools. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56 (Pt. 7): 1505-1508.
- Castro-Escarpulli G, Figueras MJ, Aguilera-Arreola G, Soler L, Fernández-Rendón E, Aparicio GO en Chacón MR (2003). Characterisation of *Aeromonas* spp. isolated from frozen fish intended for human consumption in Mexico. *Int. J. Food. Microbiol.* 84: 41-49.
- Cattoir V, Poirel L, Aubert C, Soussy C-J en Nordmann P (2008). Unexpected occurrence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants in environmental *Aeromonas* spp. *Emerg. Infect. Dis* 14: 231-237.
- CBS. (2010). www.statline.cbs.nl. Retrieved mei 2010.
- CDC (2009). Laboratory detection of extended-spectrum β -lactamses (ESBLs). Centers for Disease Control and Prevention.
- Clark NC, Teixeira LM, Facklam RR en Tenover FC (1998). Detection and differentiation of *vanC-1*, *vanC-2*, and *vanC-3* glycopeptide resistance genes in enterococci. *J. Clin. Microbiol.* 36: 2294-2297.
- CLSI (2009). M7-A8, Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Test for Bacteria that grow Aerobically, Third edition, Approved standard - Seventh addition. Clinical and Laboratory Standards Institute.
- CLSI (2010). M100-S20. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twentieth informational supplement. Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Coque TM, Baquero F en Cantón R (2008). Increasing prevalence of ESBL-producing Enterobacteriaceae in Europe. *Euro Surveill* 13(47).
- Coughter JP en Stewart GJ (1989). Genetic exchange in the environment. *Antonie van Leeuwenhoek* 55: 15-22.
- Craig DL, Fallowfield HJ en Cromar NJ (2004). Use of microcosms to determine persistence of *Escherichia coli* in recreational coastal water and sediment and validation with *in situ* experiments. *J. Appl. Microbiol.* 96: 922-930.
- Dalhoff A, Ambrose PG en Mouton JW (2009). A long journey from minimum inhibitory concentration testing to clinically predictive breakpoints: deterministic and probabilistic approaches in deriving breakpoints. *Infection* 37: 296-305.
- Davies CM en Evison LM (1991). Sunlight and the survival of enteric bacteria in natural waters. *J. Appl. Bacteriol.* 70: 265-274.

Davies CM, Long JAH, Donald M en Ashbolt NJ (1995). Survival of fecal microorganisms in marine and freshwater sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 1888-1896.

EARSS (2008). EARSS annual report 2008. On-going surveillance of *S. pneumoniae*, *S. aureus*, *E. coli*, *E. faecium*, *E. faecalis*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*. Ed. H. Grundmann. European Antimicrobial Resistance Surveillance System, Bilthoven.

EFSA (2008). Report from the task force on zoonoses data collection including guidance for harmonized monitoring and reporting of antimicrobial resistance in commensal *Escherichia coli* and *Enterococcus* spp. from food animals. *The EFSA Journal* 141: 1-44.

EUCAST. (2010). <http://www.eucast.org/>. Retrieved mei 2010.

Faria C, Vaz-Moreira I, Serapicos E, Nunes OC en Manaia CM (2009). Antibiotic resistance in coagulase negative staphylococci isolated from wastewater and drinking water. *Sci. Total Environ.* 407: 3876-3882.

Fish JT en Pettibone GW (1995). Influence of freshwater sediment on the survival of *Escherichia coli* and *Salmonella* sp. as measured by three methods of enumeration. *Lett. Appl. Microbiol.* 20: 277-281.

Flint KP (1987). The long-term survival of *Escherichia coli* in river water. *J. Appl. Bacteriol.* 63: 261-270.

Gallert C, Fund K en Winter J (2005). Antibiotic resistance of bacteria in raw and biologically treated sewage and in groundwater below leaking sewers. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 69: 106-112.

Geijlswijk IM, Mevius DJ en Puister-Jansen LF (2009). Kwantificeren van veterinaire antibioticagebruik. *Tijdschr. Diergeneeskd.* 134: 69-73.

Genthner FJ, Chatterjee P, Barkay T en Bourquin AW (1988). Capacity of aquatic bacteria to act as recipients of plasmid DNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 115-117.

Gillespie IA, O'Brien SJ, Frost JA, Adak GK, Horby P, Swan AV, Painter MJ, Neal KR en de Campylobacter Sentinel Surveillance Scheme Collaborators (2002). A case-case comparison of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* infection: a tool for generating hypothesis. *Emerg. Infect. Dis* 8: 937-942.

Goettsch W, Bronzwaer SLAM, de Neeling AJ, Wale MCJ, Aubry-Damon H, Olsson-Liljequist B, Sprenger MJW en Degener JE (2000). Standardization and quality assurance for antimicrobial resistance surveillance of *Streptococcus pneumoniae* and *Staphylococcus aureus* within the European Antimicrobial Resistance Surveillance System (EARSS). *Clin. Microbiol. Infect.* 6: 59-63.

Goñi-Urriza M, Capdepué M, Arpin C, Raymond N, Caumette P en Quentin C (2000). Impact of an urban effluent on antibiotic resistance of riverine *Enterobacteriaceae* and *Aeromonas* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 125-132.

Healing TD, Greenwood MH en Pearson AD (1992). *Campylobacters* and enteritis. *Rev. Med. Microbiol.* 3: 159-167.

Hong H, Chun J en Lee Y (2004). Detection of extended-spectrum β -lactamase-producing, multidrug-resistant environmental isolate of *Escherichia coli* that binds to human bladder cells. *Microb. Drug Resist.* 10: 184-189.

Huddleston JR, Zak JC en Jeter RM (2006). Antimicrobial susceptibilities of *Aeromonas spp.* isolated from environmental sources. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 7036-7042.

Huebner J en Goldmann DA (1999). Coagulase-negative staphylococci: role as pathogens. *Annu. Rev. Med.* 50: 223-236.

Iversen A, Kühn I, Franklin A en Mølby R (2002). High prevalence of vancomycin-resistant enterococci in Swedish sewage. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 2838-2842.

Jarvis WR en Martone WJ (1992). Predominant pathogens in hospital infections. *J. Antimicrob. Chemother.* 29 Suppl A: 19-24.

Jett BD, Huycke MM en Gilmore MS (1994). Virulence of enterococci. *Clin. Microbiol. Rev.* 7: 462-478.

Kämpfer P, Christmann C, Swinges J en Huys G (1999). *In vitro* susceptibilities of *Aeromonas* genomic species to 69 antimicrobial agents. *System. Appl. Microbiol.* 22: 662-669.

Kaufhold A en Ferrieri P (1991). Isolation of *Enterococcus mundtii* from normally sterile body sites in two patients. *J. Clin. Microbiol.* 29: 1075-1077.

Kelly BG, Vespermann A en Bolton DJ (2009). Gene transfer events and their occurrence in selected environments. *Food Chem. Toxicol.* 47: 978-983.

Kloos WE en Bannerman TL (1994). Update on clinical significance of coagulase-negative Staphylococci. *Clin. Microbiol. Rev.* 7: 117-140.

Korhonen LK en Martikainen PJ (1991). Survival of *Escherichia coli* and *Campylobacter jejuni* in untreated and filtered lake water. *J. Appl. Bacteriol.* 71: 379-382.

Lee JH, Jeong J-M, Park Y-H, Choi S-S, Kim Y-H, Chae J-S, Moon J-S, Park H, Kim S en Eo S-K (2004). Evaluation of the methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)-screen latex agglutination test for detection of MRSA of animal origin. *J. Clin. Microbiol.* 42: 2780-2782.

Li D, Yang M, Hu, J., Zhang J, Li R, Gu X, Zhang Y en Wang Z (2009). Antibiotic-resistance profile in environmental bacteria isolated from penicillin production wastewater treatment plant and the receiving river. *Environ. Microbiol.* 11: 1506-1517.

Livermore DM (2002). Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: Our worst nightmare? *Clin. Infect. Dis.* 34: 634-640.

MacGowan AP en Wise R (2001). Establishing MIC breakpoints and the interpretation of *in vitro* susceptibility tests. *J. Antimicrob. Chemother.* 48 Suppl. S1: 17-25.

MARAN (2007). Monitoring of antimicrobial resistance and antibiotic usage in animals in The Netherlands in 2006/2007 (MARAN). Eds. D. J. Mevius, B. Wit en W. van Pelt.

Mesaros N, Nordmann P, Plésiat P, Roussel-Delvallez M, Van Eldere J, Glupczynski Y, Van Laethem Y, Jacobs F, Lebecque P, Malfroot A, Tulkens PM en Van Bambeke F (2007). *Pseudomonas aeruginosa*: resistance and therapeutic options at the turn of the millennium. *Clin. Microbiol. Infect.* 13: 560-578.

Montforts MHMM, Rijs GBJ, Staeb JA en Schmitt H (2007). Diergeneesmiddelen en natuurlijke hormonen in oppervlaktewater van gebieden met intensieve veehouderij. RIVM rapport 601500004. Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu, Bilthoven.

- Morita K, Watanabe N, Kurata S en Kanamori M (1994). Beta-lactam resistance of motile *Aeromonas* isolates from clinical and environmental sources. *Antimicrob. Agents Chemother.* 38: 353-355.
- Muela A, Pocino M, Arana I, Justo JJ, Iriberry J en Barcina I (1994). Effect of growth phase and parental cell survival in river water on plasmid transfer between *Escherichia coli* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 4273-4278.
- Mutlu E, Wroe AJ, Sanchez-Hurtado K, Brazier JS en Poxton IR (2007). Molecular characterization and antimicrobial susceptibility patterns of *Clostridium difficile* strains isolated from hospitals in South-East Scotland. *J. Med. Microbiol.* 56: 921-929.
- Nethmap (2009). Consumption of antimicrobial agents and antimicrobial resistance among medically important bacteria in The Netherlands. Eds. J. E. Degener en M. N. Mulders.
- NNIS (1999). National nosocomial infection surveillance (NNIS) system report, data summary from Januari 1990-May 1999, issued June 1999. *Am. J. Infect. Control* 27: 520-532.
- Noble RT, Lee IM en Schiff KC (2004). Inactivation of indicator micro-organisms from various sources if faecal contamination in seawater and freshwater. *J. Appl. Microbiol.* 96: 464-472.
- Novais C, Coque TM, Ferreira H, Sousa JC en Peixe L (2005). Environmental contamination with vancomycin-resistant enterococci from hospital sewage in Portugal. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 3364-3368.
- Prado T, Pereira WC, Silva DM, Seki LM, Carvalho APDA en Asensi MD (2008). Detection of extended-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in effluents and sludge of a hospital sewage treatment plant. *Lett. Appl. Microbiol.* 46: 136-141.
- Probst AJ, Hertel C, Richter L, Wassill L, Ludwig W en Hammes WP (1998). *Staphylococcus condimenti* sp.nov., from soy sauce mash, and *Staphylococcus carnosus* (Schleifer en Fischer 1982) subsp. *utilis* subsp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48: 651-658.
- Rhodes MW en Kator H (1988). Survival of *Escherichia coli* and *Salmonella* spp. in estuarine environments. *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 2902-2907.
- Rooney PJ, O'Leary MC, Loughrey AC, McCalmont M, Smyth B, Donaghy P, Badri M, Woodford N, Karisik E en Livermore DM (2009). Nursing homes as a reservoir of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing ciprofloxacin-resistant *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother* 64(3): 635-41.
- Ruoff KL, de la Maza L, Murtagh MJ, Spargo JD en Ferraro MJ (1990). Species identities of Enterococci isolated from clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.* 28: 435-437.
- Sakoulas G, Gold HS, Venkataraman L, Degirolami PC, Eliopoulos GM en Qian Q (2001). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: Comparison of susceptibility testing methods and analysis of *MecA*-positive susceptible strains. *J. Clin. Microbiol.* 39: 3946-3951.
- Scheuerman PR, Schmidt JP en Alexander M (1988). Factors affecting the survival and growth of bacteria introduced into lake water. *Arch. Microbiol.* 150: 320-325.

Schlüter A, Szczepanowski R, Pühler A en Top EM (2007). Genomics of IncP-1 antibiotic resistance plasmids isolated from wastewater treatment plants provides evidence for a widely accessible drug resistance pool. *FEMS Microbiol. Rev.* 31: 449-477.

Schwartz T, Volkmann H, Kirchen S, Kohlen W, Schön-Hölz K, Jansen B en Obst U (2006). Real-time PCR detection of *Pseudomonas aeruginosa* in clinical and municipal wastewater and genotyping of the ciprofloxacin-resistant isolates. *FEMS Microbiol Ecol* 57: 158-167.

Servais P en Passerat J (2009). Antimicrobial resistance of fecal bacteria in waters of the Seine river watershed (France). *Sci. Total Environ.* 408: 365-372.

Sinton LW, Hall CH, Lynch PA en Davies-Colley RJ (2002). Sunlight inactivation of fecal indicator bacteria and bacteriophages from waste stabilization pond effluent in fresh and saline waters. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 1122-1131.

Soge OO, Meschke JS, No DB en Roberts MC (2009). Characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant coagulase-negative *Staphylococcus* spp. isolated from US West Coast public marine beaches. *J. Antimicrob. Chemother.* 64: 1148-1155.

Stepanović S, Dakić I, Morrison D, Hauschild T, Ježek P, Petráš P, Martel A, Vuković D, Shittu A en Devriese LA (2005). Identification and characterization of clinical isolates of members of the *Staphylococcus sciuri* group. *J. Clin. Microbiol.* 43: 956-958.

Stepanović S, Ježek P, Vuković D, Dakić I en Petráš P (2003). Isolation of members of the *Staphylococcus sciuri* group from urine and their relationship to urinary tract infections. *J. Clin. Microbiol.* 41: 5262-5264.

Strateva T en Yordanov D (2009). *Pseudomonas aeruginosa* - a phenomenon of bacterial resistance. *J. Med. Microbiol.* 58: 1133-1148.

Tolba O, Loughrey A, Goldsmith CE, Millar BC, Rooney PJ en Moore JE (2008). Survival of epidemic strains of healthcare (HA-MRSA) and community-associated (CA-MRSA) methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in river-, sea- and swimming pool water. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 211: 398-402.

Tyrell GJ, Turnbull L, Teixeira LM, Lefebvre J, Carvalho MG, Facklam RR en Lovgren M (2002). *Enterococcus gilvus* sp. nov. and *Enterococcus pallens* sp. nov. isolated from human clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.* 40: 1140-1145.

Uçkay I, Pittet D, Vaudaux P, Sax H, Lew D en Waldvogel F (2009). Foreign body infections due to *Staphylococcus epidermidis*. *Ann. Med.* 41: 109-119.

Van den Bogaard AE, Bruinsma N en Stobberingh EE (2000). The effect of banning avoparcin on VRE carriage in The Netherlands. *J. Antimicrob. Chemother.* 46: 145-153.

Van den Bogaard AE, Jensen LB en Stobberingh EE (1997). Vancomycin-resistant enterococci in turkeys and farmers. *New. Eng. J. Med.* 337: 1558-1559.

Van den Broek IVF, van Cleef BAGL, Haenen A, Broens EM, van der Wolf PJ, van den Broek MJM, Huijsdens XW, Kluytmans JAJW, van de Giessen AW en Tiemersma EW (2008). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in people living and working in pig farms. *Epidemiol. Infect.* 137: 700-708.

- Vila J, Marco F, Soler L, Chacon M en Figueras MJ (2002). In vitro antimicrobial susceptibility of clinical isolates of *Aeromonas caviae*, *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas veronii biotype sobria*. J. Antimicrob. Chemother. 49: 697-702.
- Vincent S, Knight RG, Green M, Sahm DF en Shlaes DM (1991). Vancomycin susceptibility and identification of motile enterococci. J. Clin. Microbiol. 29: 2335-2337.
- Voss A, Loeffen F, Bakker J, Klaassen C en Wulf M (2005). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in pig farming. Emerg. Infect. Dis 11: 1965-1966.
- Wertheim HFL, Vos MC, Boelens HAM, Voss A, Vandenbroucke-Grauls CMJE, Meester MHM, Kluytmans JAJW, van Keulen PHJ en Verbrugh HA (2004). Low prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) at hospital admission in the Netherlands: the value of search and destroy and restrictive antibiotic use. J. Hosp. Infect. 56: 321-325.
- Wiener J, Quinn JP, Bradford PA, Goering RV, Nathan C, Bush K en Weinstein RA (1999). Multiple antibiotic-resistant *Klebsiella* and *Escherichia coli* in nursing homes. Jama 281(6): 517-23.
- WIP (2009). Maatregelen tegen overdracht van bijzonder-resistente micro-organismen (BRMO); versie maart 2009. Werkgroep Infectie Preventie, www.wip.nl.
- Xu H, Davies J en Miao V (2007). Molecular characterization of class 3 integrons from *Delftia* spp. J. Bacteriol. 189: 6276-6283.
- Zakrewska-Czerwińska J, Gaszewska-Mastalarz A, Lis B, Gamian A en Mordarski M (1995). *Staphylococcus pulveri* sp. nov. isolated from human and animal specimens. Int. J. Syst. Bacteriol. 45: 169-172.
- Zell C, Resch M, Rosenstein R, Albrecht T, Hertel C en Götz F (2008). Characterization of toxin production of coagulase-negative staphylococci isolated from food and starter cultures. Int. J. Food. Microbiol. 127: 246-251.
- Zhang X-X, Zhang T en Fang HHP (2009). Antibiotic resistance genes in water environment. Appl. Microbiol. Biotechnol. 82: 397-414.

Bijlage 1. Analysemethoden, isolatiemediën en onderzochte volumes

micro-organisme	norm/ voorschrift	isolatiemedium (fabrikant, nr.)	onderzocht volume (ml)
<i>Aeromonas</i>	NEN 6263 (Anonymous, 1989)	Ampiciline Dextrine Agar (NVI E1100A) Ampiciline (Sigma A-5918) Natriumdesoxycholaat (Sigma D6750)	100-10-1
<i>Clostridium</i>	SOP LZO/M189	Clostridium Perfringens Agar + D-Cycloserine (Tritium Microbiology C452.02)	100-10-1
<i>Campylobacter</i>	NEN 6269 (Anonymous, 1996)	Preston Broth: Nutrient Broth no.2 (Oxoid CM0067B) Laked Horse Blood (Oxoid SR0048C) Campylobacter Growth Supplement (Oxoid SR0232E) Campylobacter Selective Supplement (Oxoid SR0117E) Karmali (Oxoid PO5041A)	200
<i>E. coli</i>	NEN-EN-ISO 9308-1, Rapid Test (Anonymous, 2000b)	Trypton Soya Agar (Oxoid PO5012A) Trypton Bile Agar (Oxoid PO5017A)	100-10-1
Intestinale enterococcen	NEN-EN-ISO 7899-2 (Anonymous, 2000a)	Slanetz and Bartley Agar (Oxoid PO5018A) Bile Esculine Azide Agar (Oxoid PO5062A)	100-10-1
<i>P. aeruginosa</i>	NEN 6573 (Anonymous, 1987)	mPA-D (Oxoid M515.02) Skim Milk (Oxoid S320.02)	100-10-1
<i>Salmonella</i>	NEN-EN-ISO 19250 (Anonymous, 2003a)	BPW (NVI E4900F) RVS (Oxoid CM0866) MSRV (Difco 218681) BGA (Oxoid PO5062A)	200
Staphylococcen	NEN-EN-ISO 6888-1 (Anonymous, 1999) SOP LZO/M127	Baird Parker (Oxoid CM0275B) RPF (Oxoid SR0122A)	100-10-1

Bijlage 2. Protocol voor het bepalen van antibioticumgevoeligheid

- Isolaat vanuit koelkast op TSA-plaat enten (LLK); incubatie overnacht 36 °C (voor *Aeromonas* 30 °C).
- Vanaf verse TSA- of bloedagar-plaat 3-5 LLK afpikken en in 5 ml steriel demiwater suspenderen tot een dichtheid van 0,5 MacFarland Standard.
- Vanuit deze suspensie 10 µl overbrengen in een buis met Mueller-Hinton broth (van tevoren op kamertemperatuur laten komen), zodat een inoculum van 1×10^5 cfu/ml ontstaat.
- Vanuit de Mueller-Hinton broth 50 µl per well overbrengen in een sensititreplaatje mbv multi channel pipet; 6 rijen per isolaat, 2 isolaten per plaat.
- Sensititreplaatje afdekken met plastic folie.
- Sensititreplaatje incuberen bij 36 °C (voor *Aeromonas* 30 °C), gedurende 18-24 uur.
- Platen aflezen mbv Sensitouch-systeem.
 - Hierbij wordt voor elk antibioticum de eerste well zonder zichtbare groei aangegeven. De concentratie in deze well is de MIC-waarde.
 - Als in alle wells groei is wordt dit aangegeven. De MIC-waarde is in dit geval hoger dan de hoogste concentratie.
 - Als in de well zonder antibiotica (positieve controle) geen duidelijk pellet is, zijn de testresultaten ongeldig.

Bijlage 3. Samenstelling Sensititre MIC-platen en concentratieranges Etesten

A. Sensititreplaten.

Platen voor gram-negatieve (NLV60), Gram-positieve (NLV61) micro-organismen, en *Campylobacter*-isolaten (NLV64):

Plate Code: **NLV60**

Date: **21st Dec 2006**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	AMP 0.5	FOT 0.12	TET 1	SMX 8	TMP 0.5	CIP 0.06	AMP 0.5	FOT 0.12	TET 1	SMX 8	TMP 0.5	CIP 0.06
B	AMP 1	FOT 0.25	TET 2	SMX 16	TMP 1	CIP 0.12	AMP 1	FOT 0.25	TET 2	SMX 16	TMP 1	CIP 0.12
C	AMP 2	FOT 0.5	TET 4	SMX 32	TMP 2	CIP 0.25	AMP 2	FOT 0.5	TET 4	SMX 32	TMP 2	CIP 0.25
D	AMP 4	FOT 1	TET 8	SMX 64	TMP 4	CIP 0.5	AMP 4	FOT 1	TET 8	SMX 64	TMP 4	CIP 0.5
E	AMP 8	FOT 2	TET 16	SMX 128	TMP 8	CIP 1	AMP 8	FOT 2	TET 16	SMX 128	TMP 8	CIP 1
F	AMP 16	FOT 4	TET 32	SMX 256	TMP 16	CIP 2	AMP 16	FOT 4	TET 32	SMX 256	TMP 16	CIP 2
G	AMP 32	FOT 8	TET 64	SMX 512	TMP 32	CIP 4	AMP 32	FOT 8	TET 64	SMX 512	TMP 32	CIP 4
H	POS CON	FOT 16	TET 128	SMX 1024	TMP 64	CIP 8	POS CON	FOT 16	TET 128	SMX 1024	TMP 64	CIP 8

ANTIMICROBICS

AMP	Ampicillin
FOT	Cefotaxime
TET	Tetracycline
SMX	Sulfamethoxazole
TMP	Trimethoprim
CIP	Ciprofloxacin
POS	Positive Control

Plate Code: **NLV61**

Date: **21st Dec 2006**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	OXA+ 0.25	TET 0.12	SAL 0.5	ERY 0.25	VAN 0.5	SXT 0.25/4.75	OXA+ 0.25	TET 0.12	SAL 0.5	ERY 0.25	VAN 0.5	SXT 0.25/4.75
B	OXA+ 0.5	TET 0.25	SAL 1	ERY 0.5	VAN 1	SXT 0.5/9.5	OXA+ 0.5	TET 0.25	SAL 1	ERY 0.5	VAN 1	SXT 0.5/9.5
C	OXA+ 1	TET 0.5	SAL 2	ERY 1	VAN 2	SXT 1/19	OXA+ 1	TET 0.5	SAL 2	ERY 1	VAN 2	SXT 1/19
D	OXA+ 2	TET 1	SAL 4	ERY 2	VAN 4	SXT 2/38	OXA+ 2	TET 1	SAL 4	ERY 2	VAN 4	SXT 2/38
E	OXA+ 4	TET 2	SAL 8	ERY 4	VAN 8	SXT 4/76	OXA+ 4	TET 2	SAL 8	ERY 4	VAN 8	SXT 4/76
F	OXA+ 8	TET 4	SAL 16	ERY 8	VAN 16	SXT 8/152	OXA+ 8	TET 4	SAL 16	ERY 8	VAN 16	SXT 8/152
G	OXA+ 16	TET 8	SAL 32	ERY 16	VAN 32	SXT 16/304	OXA+ 16	TET 8	SAL 32	ERY 16	VAN 32	SXT 16/304
H	OXA+ 32	TET 16	SAL 64	ERY 32	VAN 64	POS CON	OXA+ 32	TET 16	SAL 64	ERY 32	VAN 64	POS CON

ANTIMICROBICS

OXA+	Oxacillin+2%NaCl
TET	Tetracycline
SAL	Salinomycin
ERY	Erythromycin
VAN	Vancomycin
SXT	Trimethoprim / sulfamethoxazole
POS	Positive Control

Plate Code: **NLV64**Date: **6-feb-07**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	AMP 0.25	CLA 0.5	CIP 0.12	ERY 0.5	GEN 0.25	NAL 1	NEO 0.5	STR 1	SMX 8	TET 0.5	TUL 0.5	CHL 2
B	AMP 0.5	CLA 1	CIP 0.25	ERY 1	GEN 0.5	NAL 2	NEO 1	STR 2	SMX 16	TET 1	TUL 1	CHL 4
C	AMP 1	CLA 2	CIP 0.5	ERY 2	GEN 1	NAL 4	NEO 2	STR 4	SMX 32	TET 2	TUL 2	CHL 8
D	AMP 2	CLA 4	CIP 1	ERY 4	GEN 2	NAL 8	NEO 4	STR 8	SMX 64	TET 4	TUL 4	CHL 16
E	AMP 4	CLA 8	CIP 2	ERY 8	GEN 4	NAL 16	NEO 8	STR 16	SMX 128	TET 8	TUL 8	CHL 32
F	AMP 8	CLA 16	CIP 4	ERY 16	GEN 8	NAL 32	NEO 16	STR 32	SMX 256	TET 16	TUL 16	CHL 64
G	AMP 16	CLA 32	CIP 8	ERY 32	GEN 16	NAL 64	NEO 32	STR 64	SMX 512	TET 32	TUL 32	CHL 128
H	AMP 32	CLA 64	CIP 16	ERY 64	GEN 32	NAL 128	NEO 64	STR 128	SMX 1024	TET 64	TUL 64	POS CON

ANTIMICROBICS

AMP	Ampicillin
CLA	Clarithromycin
CIP	Ciprofloxacin
ERY	Erythromycin
GEN	Gentamicin
NAL	Nalidixic Acid
NEO	Neomycin
STR	Streptomycin
SMX	Sulfamethoxazole
TET	Tetracycline
TUL	Tulathromycin
CHL	Chloramphenicol
POS	Positive Control

B. Etesten.

antibioticum	geteste concentratierange (µg/ml)
chloramphenicol	0.016 - 256
ciprofloxacin	0.002 - 32
clindamycine	0.016 - 256
imipenem	0.002 - 32
meropenem	0.002 - 32
quinupristine/dalfopristine	0.002 - 32
streptomycine	0.064 - 1024
sulfamethoxazole	0.064 - 1024

Bijlage 4. Gebruikte breakpoints voor resistentiebepalingen

I. *Escherichia coli*

	Epi CO WT ≤ x mg/L	Bron	Klin BP R > y mg/L	Bron
Cefotaxime	0,25	EUCAST	2	EUCAST
Trimethoprim	2	EUCAST	4	EUCAST
Ciprofloxacine	0,06	MARAN	1	EUCAST
Tetracycline	8	EUCAST	8	CLSI
Sulfamethoxazole	-	-	256	CLSI
Ampicilline	8	EUCAST	8	EUCAST
Streptomycine	16	EUCAST	-	-
Chloramphenicol	16	EUCAST	-	-

Epi CO = epidemiologische cut-off: wildtype(WT)varianten hebben een MIC ≤ de aangegeven MIC. Klin BP = Klinisch breakpoint: resistente isolaten (R) hebben een MIC > de aangegeven MIC. - = geen gegevens beschikbaar. Bronnen: MARAN, 2007; EUCAST, 2009; CLSI, 2010.

II. Enterococcen

	<i>E. faecium</i>				<i>E. faecalis</i>			
	Epi CO WT ≤ x mg/L	Bron	Klin BP R > y mg/L	Bron	Epi CO WT ≤ x mg/L	Bron	Klin BP R > y mg/L	Bron
Erythromycine	4	EUCAST	4	CLSI	4	EUCAST	4	CLSI
Vancomycine	4	EUCAST	8	EUCAST	4	EUCAST	8	EUCAST
Sulfa/trim*	1/19	EUCAST	-	-	- ‡	-	-	-
Tetracycline	2	EUCAST	8	CLSI	2	EUCAST	8	CLSI
Oxacilline	-	-	-	-	-	-	-	-
Salinomycine	4	Maran	-	-	4	Maran	-	-
Quinu/Dalfopristin	1	EUCAST	4	EUCAST	-	-	32	EFSA, Maran

Epi CO = epidemiologische cut-off: wildtype(WT)varianten hebben een MIC ≤ de aangegeven MIC. Klin BP = Klinisch breakpoint: resistente isolaten (R) hebben een MIC > de aangegeven MIC. *sulfamethoxazole/trimethoprim. ‡Als breakpoint is epi. CO. van *E. faecium* gebruikt. - = geen gegevens beschikbaar. Bronnen: MARAN, 2007; EFSA, 2008; EUCAST, 2009; CLSI, 2010.

III. Staphylococcen

	<i>S. aureus</i>				CNS			
	Epi CO	Bron	Klin BP	Bron	Epi CO	Bron	Klin BP	Bron
	WT ≤ x mg/L		R > y mg/L		WT ≤ x mg/L		R > y mg/L	
Erythromycine	1	EUCAST	4	CLSI	1	EUCAST	4	CLSI
Vancomycine	2	EUCAST	2	EUCAST	4	EUCAST	2	EUCAST
Sulfa/trim*	0,5/9,5	EUCAST	2/38	CLSI	0,5/9,5	EUCAST	2/38	CLSI
Tetracycline	1	EUCAST	8	CLSI	1	EUCAST	8	CLSI
Oxacilline	2	EUCAST	2	CLSI	1	EUCAST	4	Maran [§]
Salinomycine [‡]	-	-	-	-	-	-	-	-
Ciprofloxacin	1	EUCAST	1	EUCAST	1	EUCAST	1	EUCAST
Clindamycine	0,25	EUCAST	2	CLSI	0,25	EUCAST	2	CLSI

Epi CO = epidemiologische cut-off; wildtype(WT)varianten hebben een MIC ≤ de aangegeven MIC. Klin BP = Klinisch breakpoint: resistente isolaten (R) hebben een MIC > de aangegeven MIC. CNS=coagulase-negatieve staphylococcen.

*sulfamethoxazole/trimethoprim. [‡]Break-points zijn niet beschreven, op basis van de binomiale verdeling van de MIC-waarden van de isolaten is gekozen voor >64 mg/L. [§]Om resultaten te kunnen vergelijken met resistenties gevonden bij melkkoeien is het breakpoint beschreven in MARAN (2007) gebruikt. - = geen gegevens beschikbaar. Bronnen: MARAN, 2007; CLSI, 2008; EUCAST, 2009; CLSI, 2010.

IV. *Campylobacter*

	<i>C. coli</i>		<i>C. jejuni</i>	
	Epi CO	Bron	Epi CO	Bron
	WT ≤ x mg/L		WT ≤ x mg/L	
Erythromycine	16	EUCAST	4	EUCAST
Gentamicine	2	EUCAST	1	EUCAST
Streptomycine	4	EUCAST	2	EUCAST
Neomycine	2	EUCAST	1	Maran
Tetracycline	2	EUCAST	2	EUCAST
Ciprofloxacin	1	EUCAST	1	EUCAST
Nalidixinezuur	32	EUCAST	16	EUCAST
Tulathromycine	16	Maran	16	Maran
Ampicilline	16	EUCAST	16	Maran
Clarithromycine	32	Maran	8	Maran
Sulfamethoxazole	256	Maran	256	Maran
Chloramphenicol	16	Maran	16	EUCAST

Epi CO = epidemiologische cut-off; wildtype(WT)varianten hebben een MIC ≤ de aangegeven MIC. Als er geen EPI CO beschikbaar waren in EUCAST, of als de breakpoint gebruikt in Maran (2007) afweek van EUCAST, zijn de breakpoints uit Maran (2007) gebruikt, om de percentages resistentie te kunnen vergelijken met wat gevonden wordt bij dieren. Bronnen: MARAN, 2007; EUCAST, 2009.

V. *Aeromonas*

	Klinisch BP R > y mg/L	Bron
Cefotaxime	32	CLSI
Trimethoprim	8	Kämpfer
Ciprofloxacin	2	CLSI
Tetracycline	8	CLSI
Sulfamethoxazole	256	CLSI
Ampicilline	16	Vila

Klinisch BP = Klinisch breakpoint. Resistente isolaten (R) hebben een MIC > de aangegeven MIC. Bronnen: Kämpfer et al., 1999; Vila et al., 2002; CLSI, 2010 .

VI. *Pseudomonas aeruginosa*

	Klinisch BP R > y mg/L	Bron
Cefotaxime	32	CLSI ^a
Trimethoprim	2	MacGowan
Ciprofloxacin	1	EUCAST
Tetracycline	8	CLSI ^b
Sulfamethoxazole	258	CLSI ^b
Ampicilline	8	MacGowan
Meropenem	8	EUCAST
Imipenem	8	EUCAST

Klin BP =Klinisch breakpoint. Resistente isolaten (R) hebben een MIC > de aangegeven MIC. CLSI^a: De gebruikte breakpoints gelden voor *P. aeruginosa*; CLSI^b: De gebruikte breakpoints gelden voor non-enterobacteriaceae. Bronnen: MacGowan en Wise, 2001; CLSI, 2010; EUCAST, 2010.

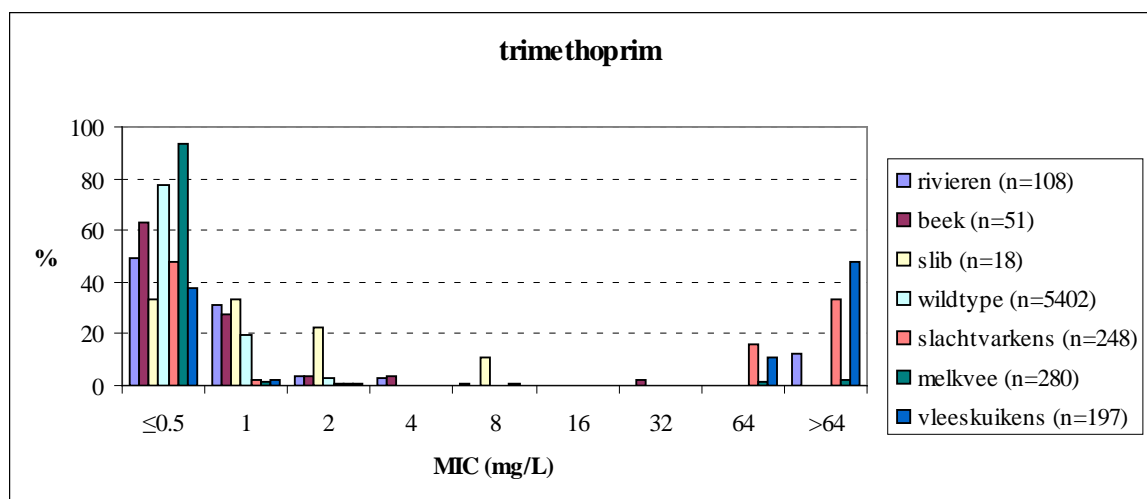
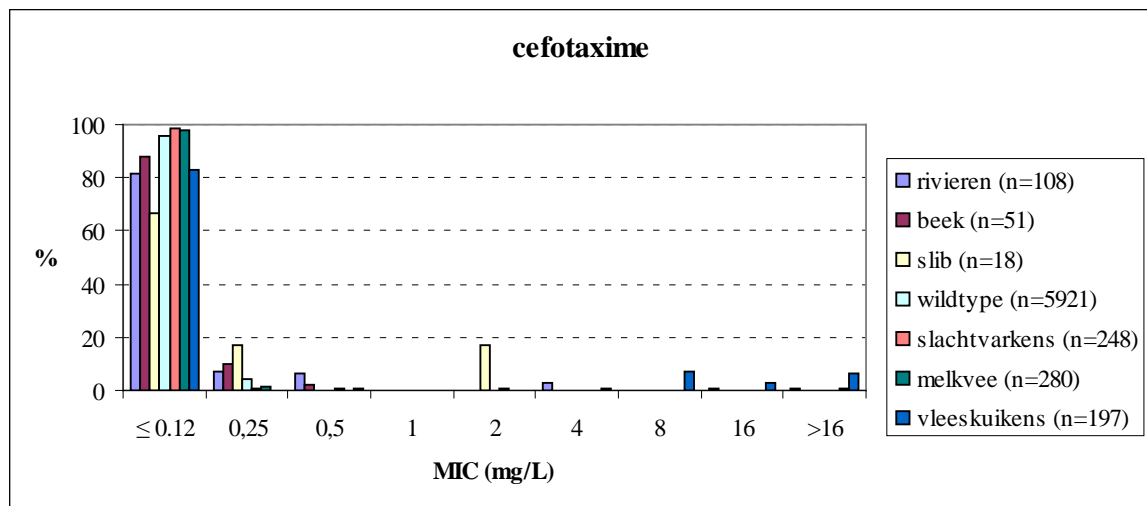
VII. *Clostridium*

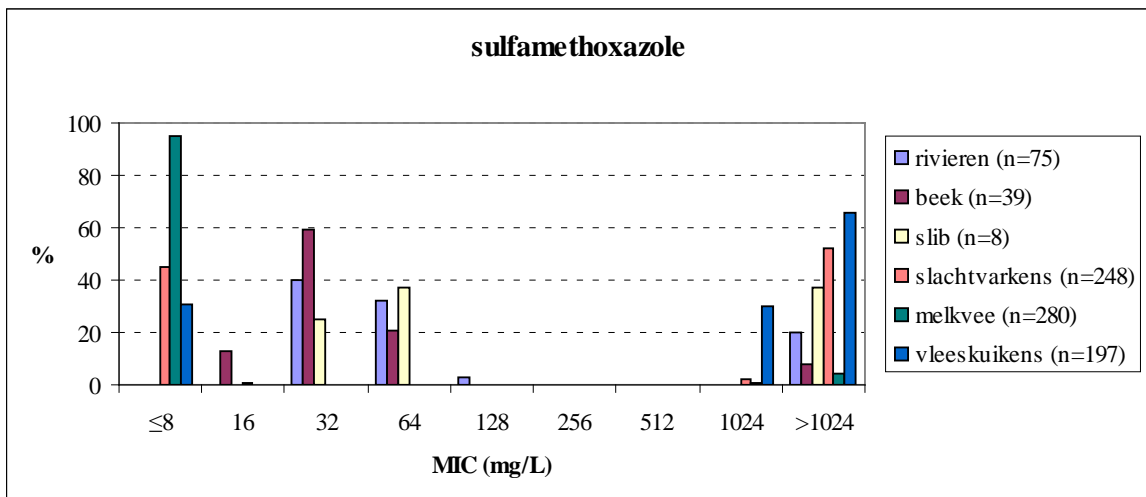
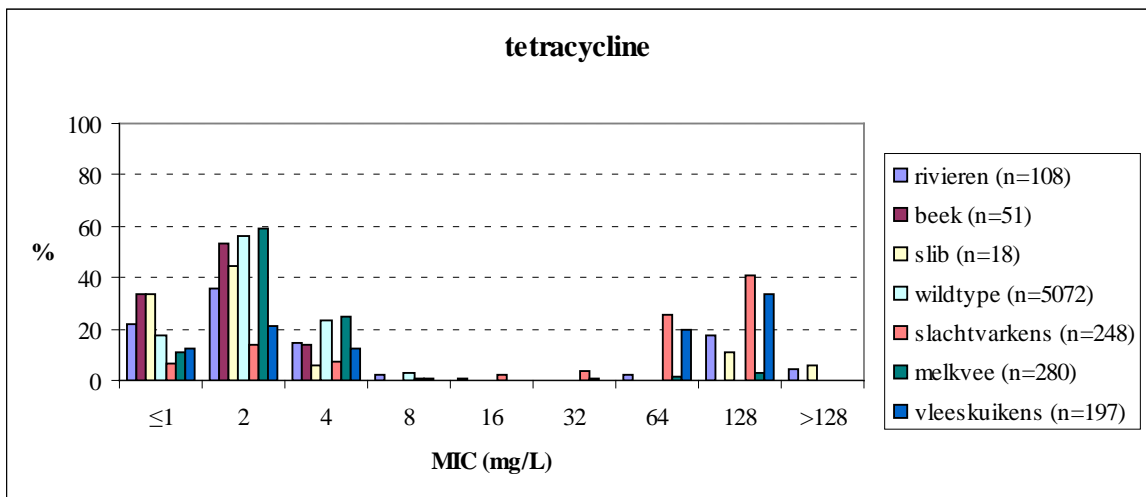
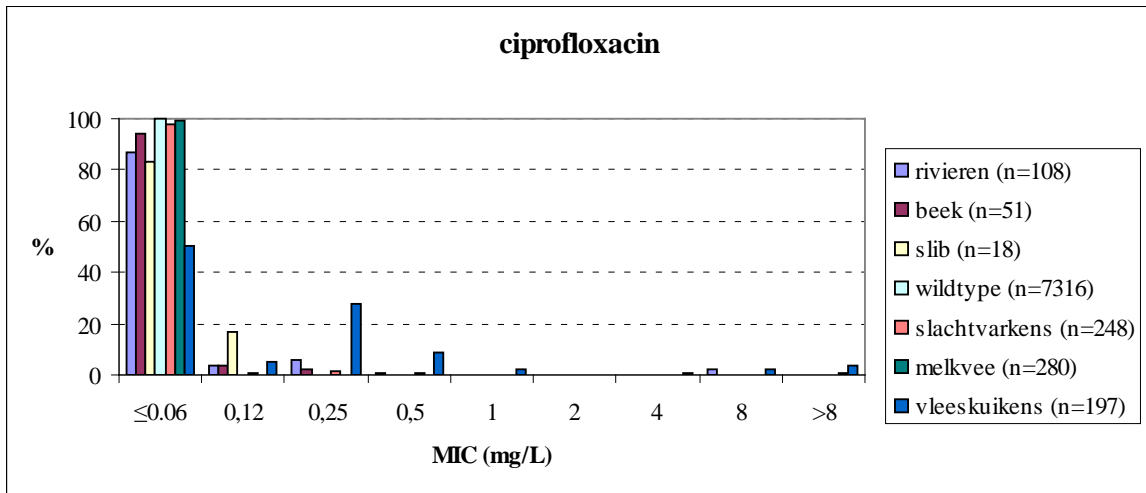
	Klinisch BP R > y mg/L	Bron
Erythromycine	4	CLSI
Vancomycine	4	CLSI
Sulfamethoxazole/trimethoprim	-	-
Tetracycline	8	CLSI
Oxacilline	-	-
Salinomycine	-	-

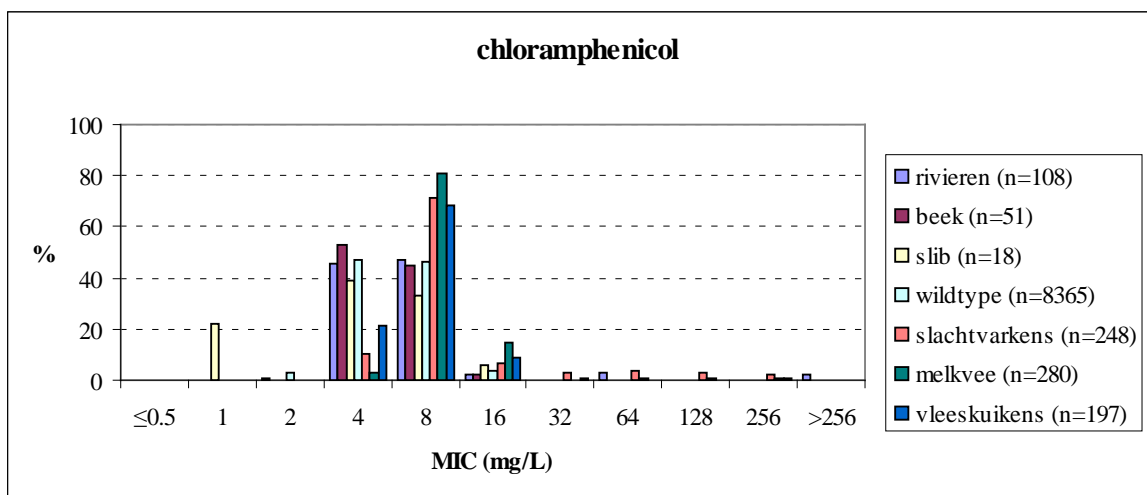
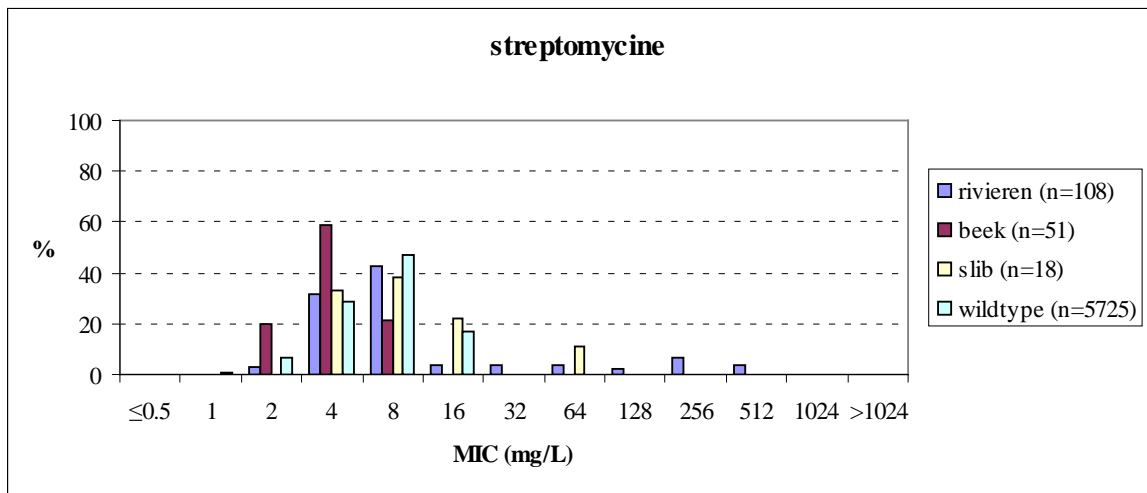
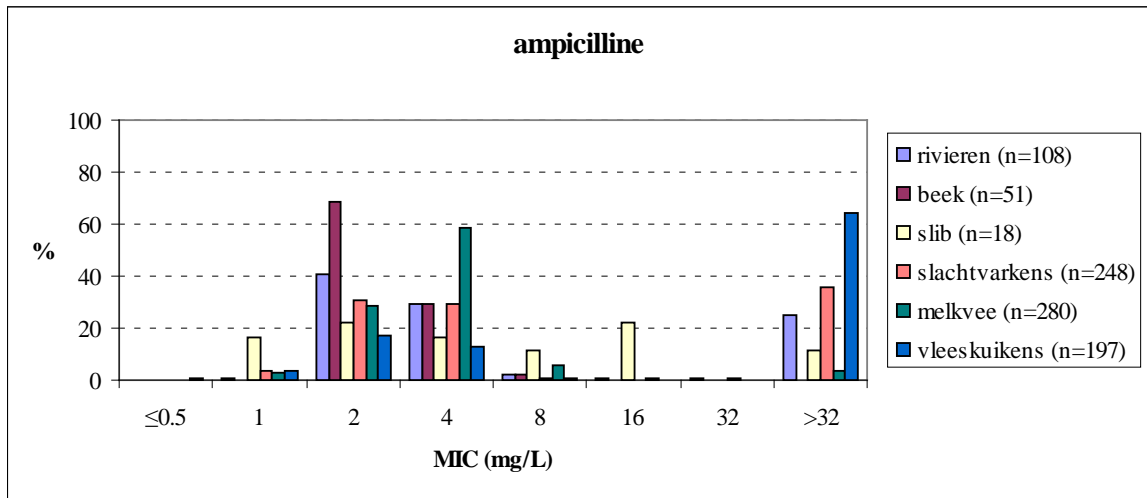
Klinisch BP = Klinisch breakpoint van *C. difficile*. Resistente isolaten (R) hebben een MIC > de aangegeven MIC. - = geen gegevens beschikbaar. Bronnen: Mutlu et al., 2007.

Bijlage 5. MIC-verdelingen voor *E. coli*-isolaten

De data voor slachtvarkens, melkvee en mestkuikens zijn afkomstig uit MARAN (2007), de wildtypedata uit de EUCAST database (2009)

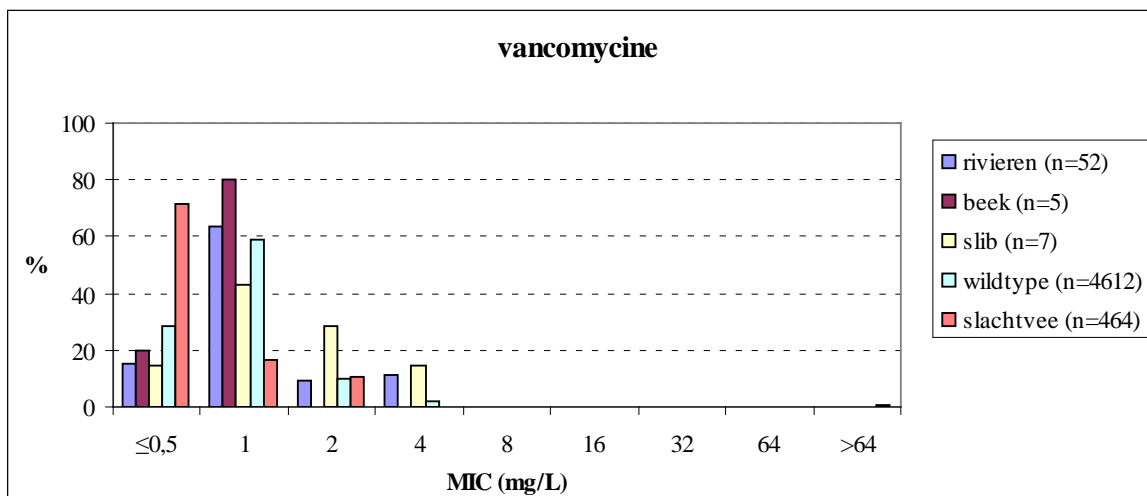
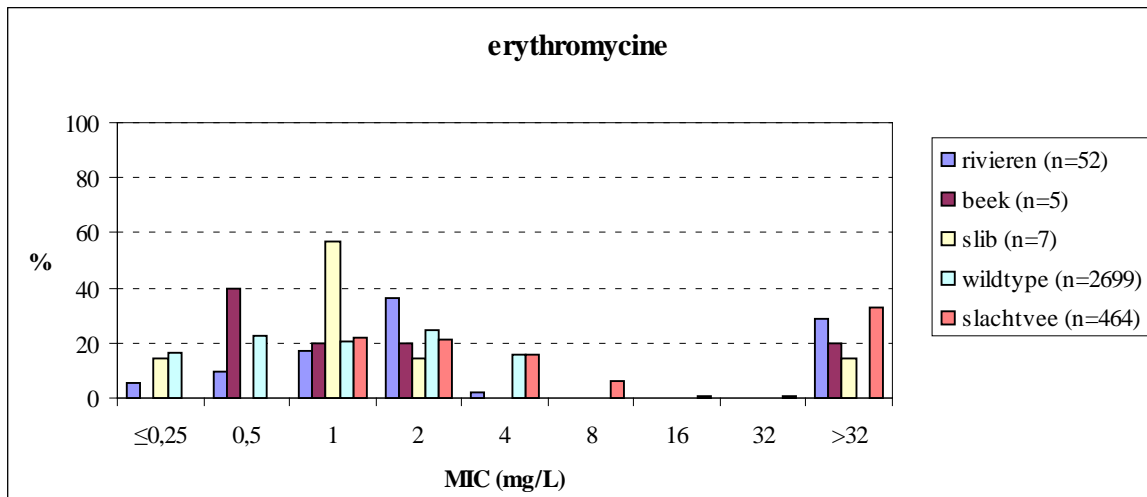


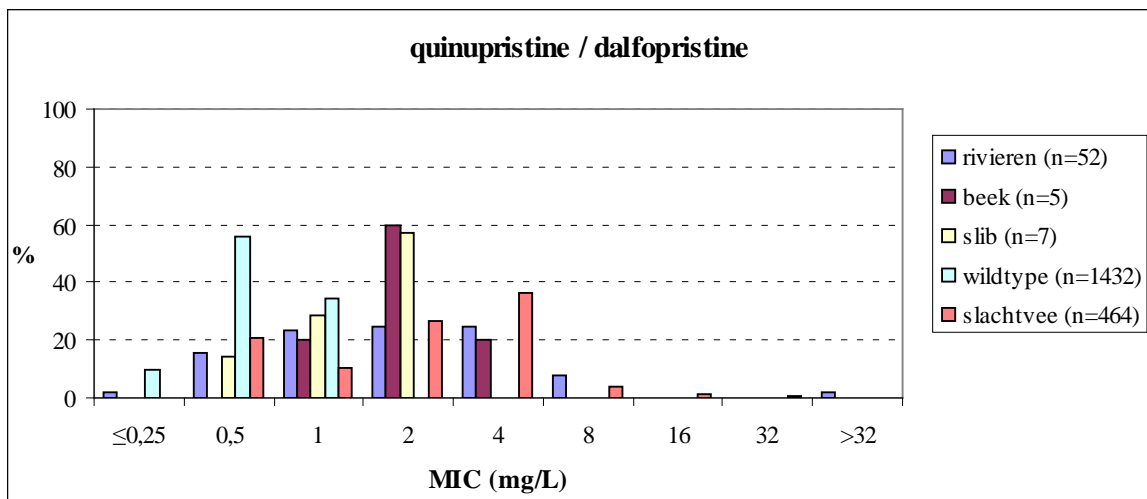
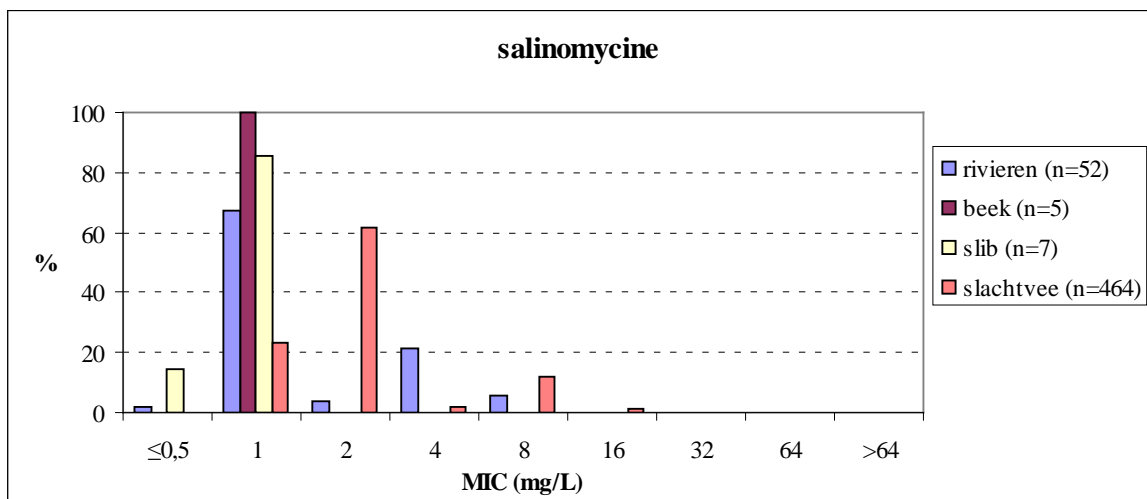
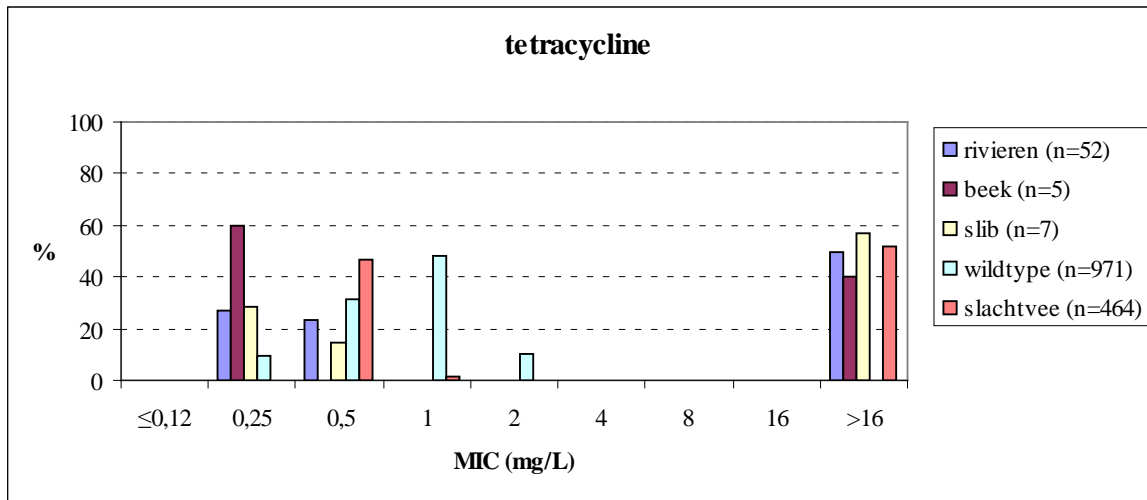


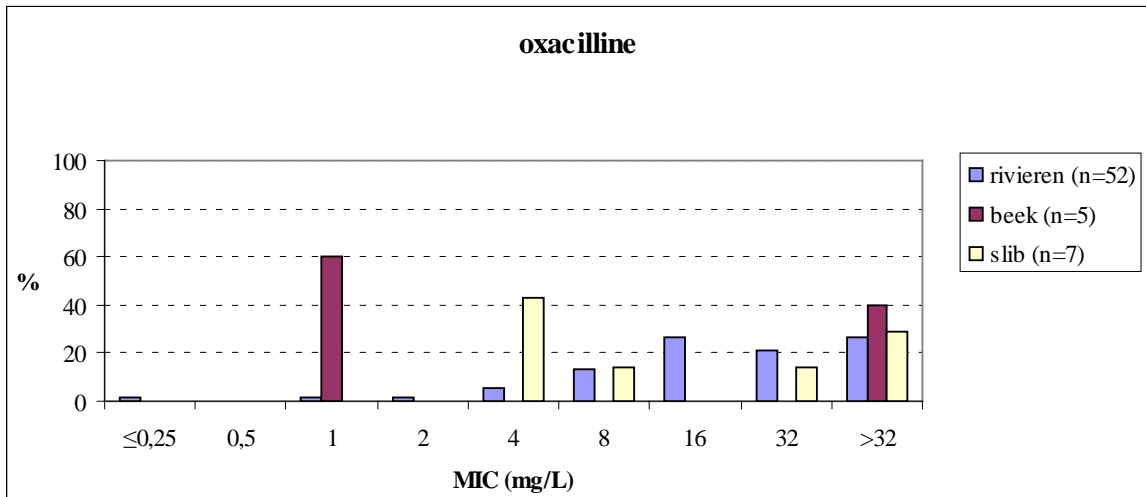
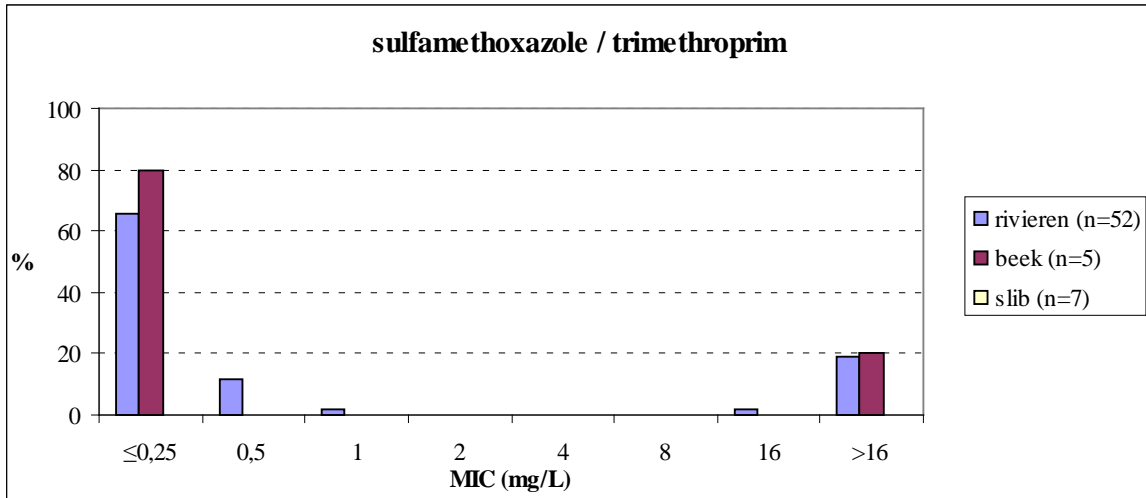


Bijlage 6. MIC-verdelingen voor *E. faecium*-isolaten

De data voor slachtvee zijn afkomstig uit MARAN (2007), de wildtypedata uit de EUCAST-database (2009)

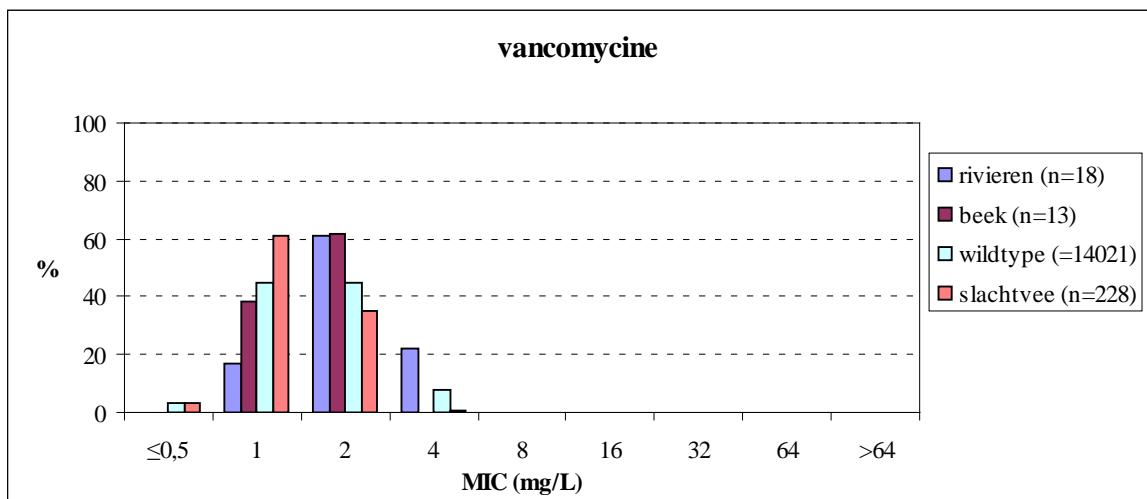
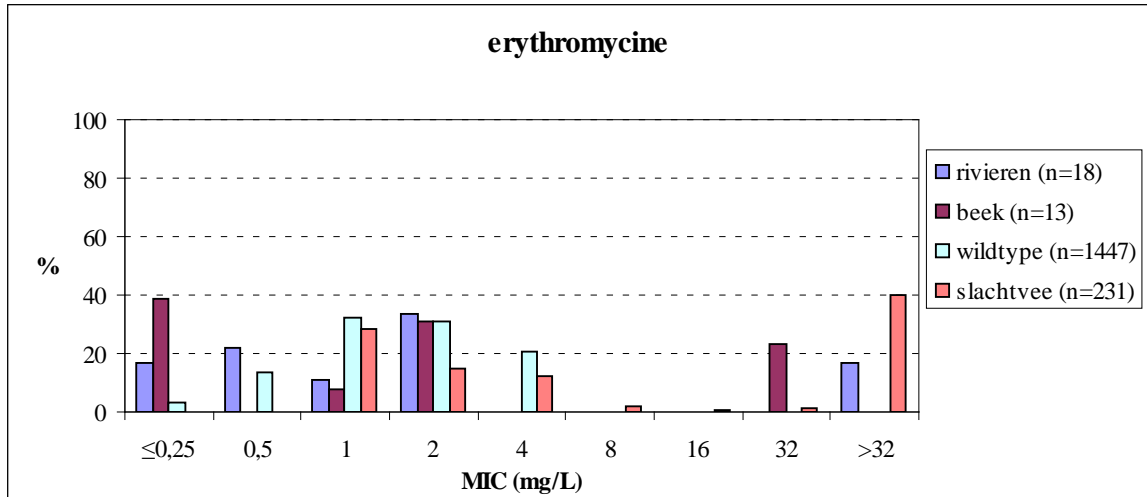


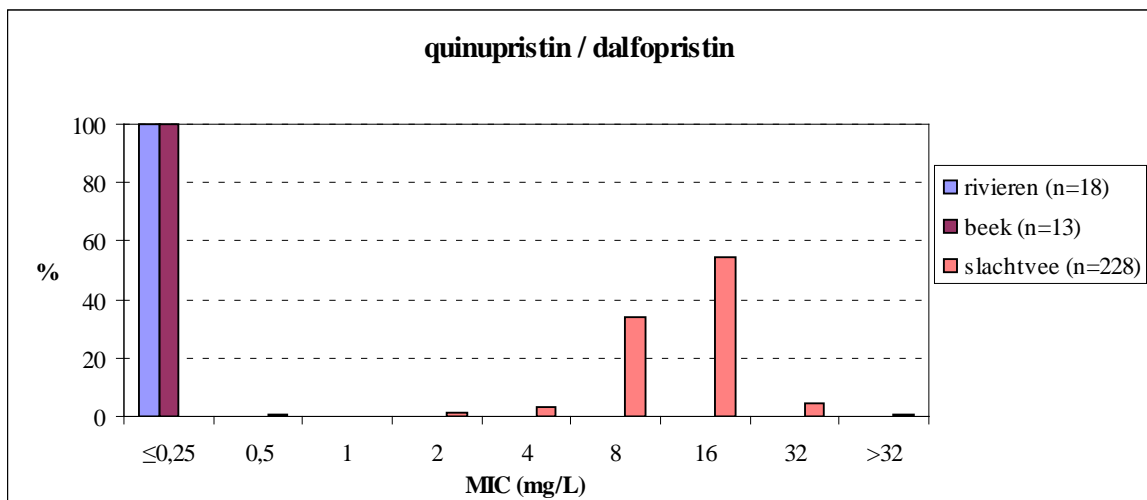
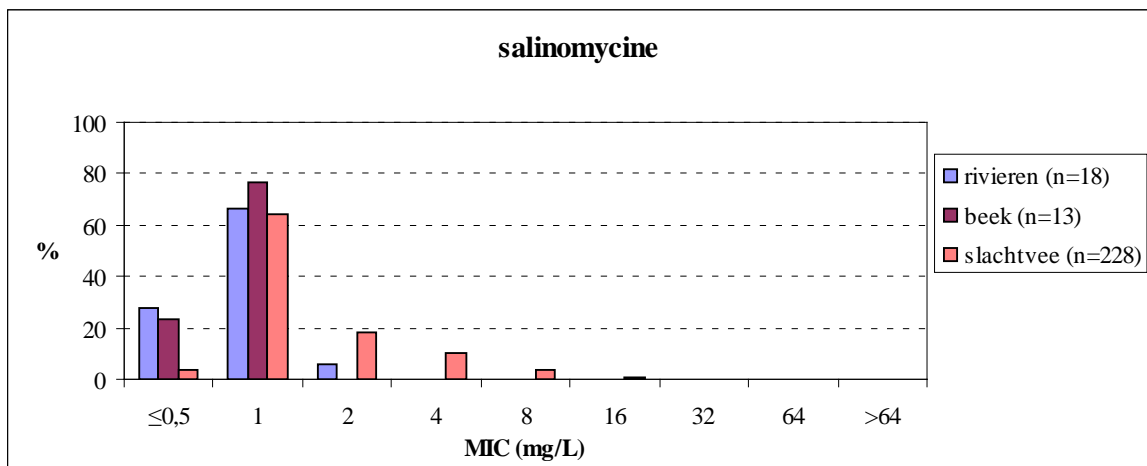
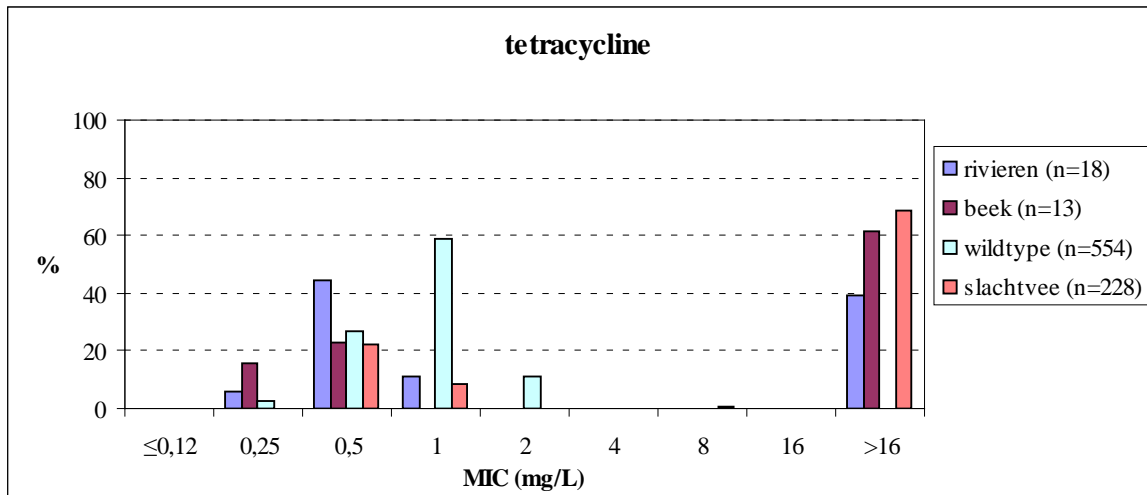


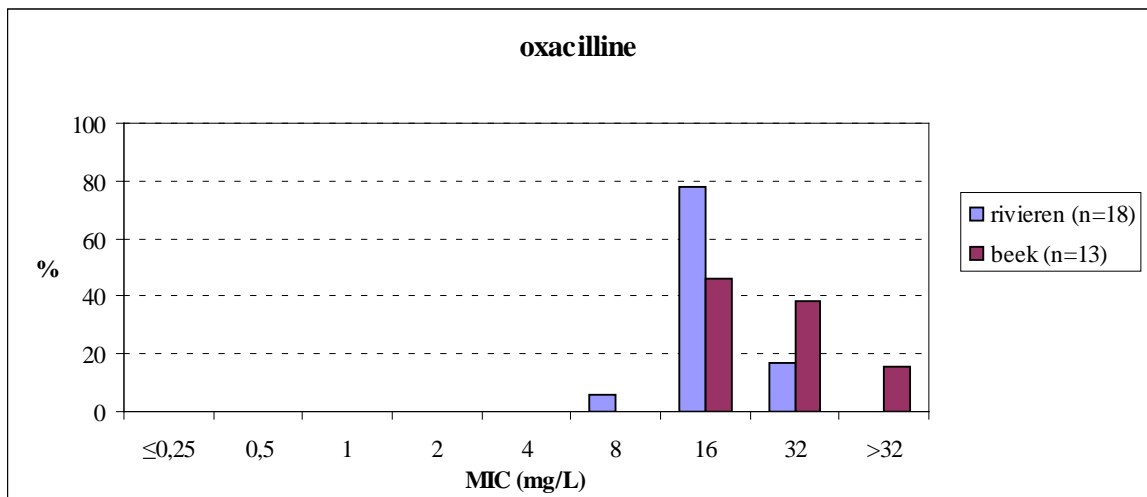
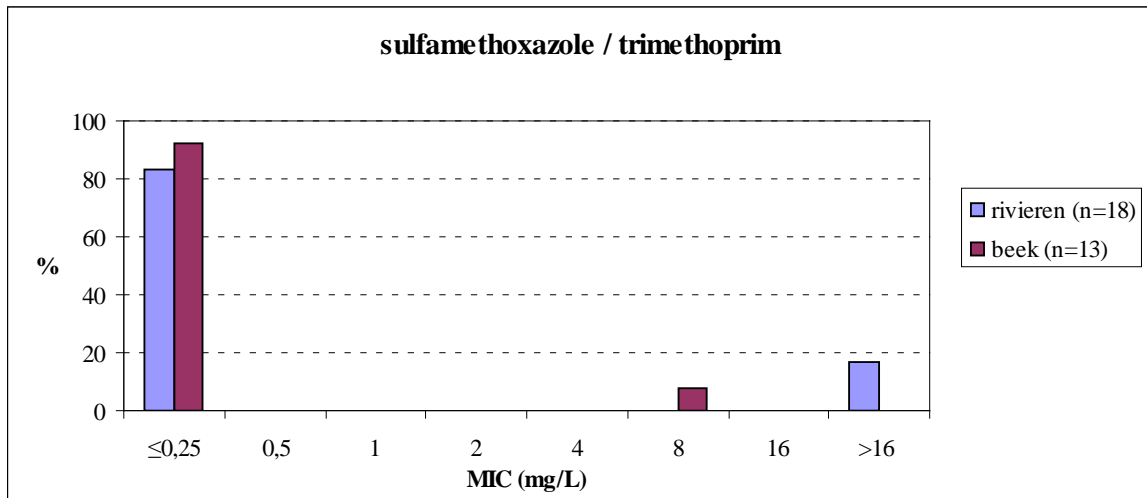


Bijlage 7. MIC-verdelingen voor *E. faecalis*-isolaten

De data voor slachtvee zijn afkomstig uit MARAN (2007), de wildtypedata uit de EUCAST-database (2009)

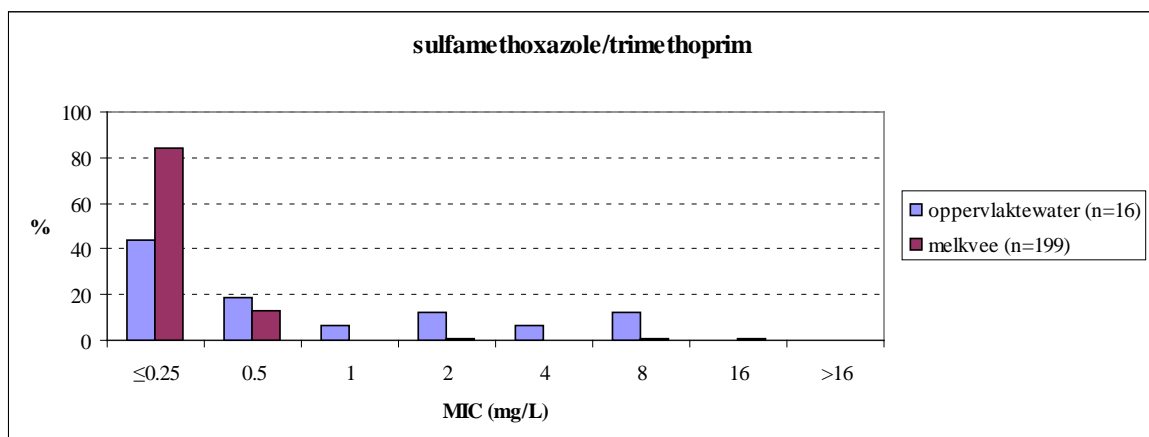
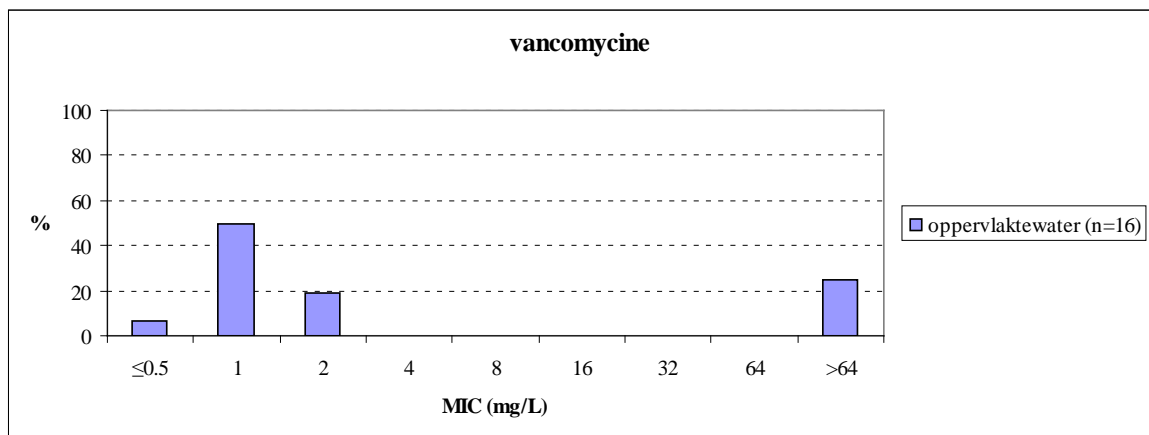
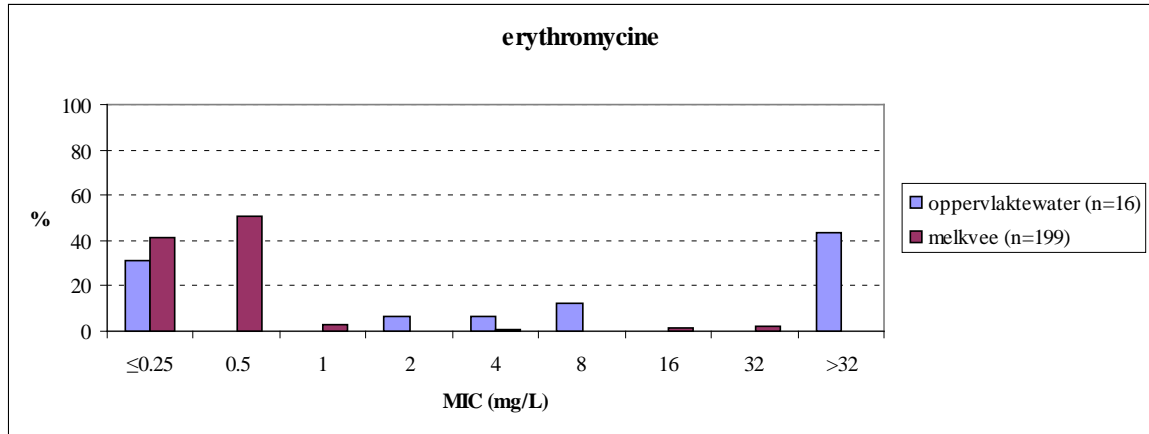


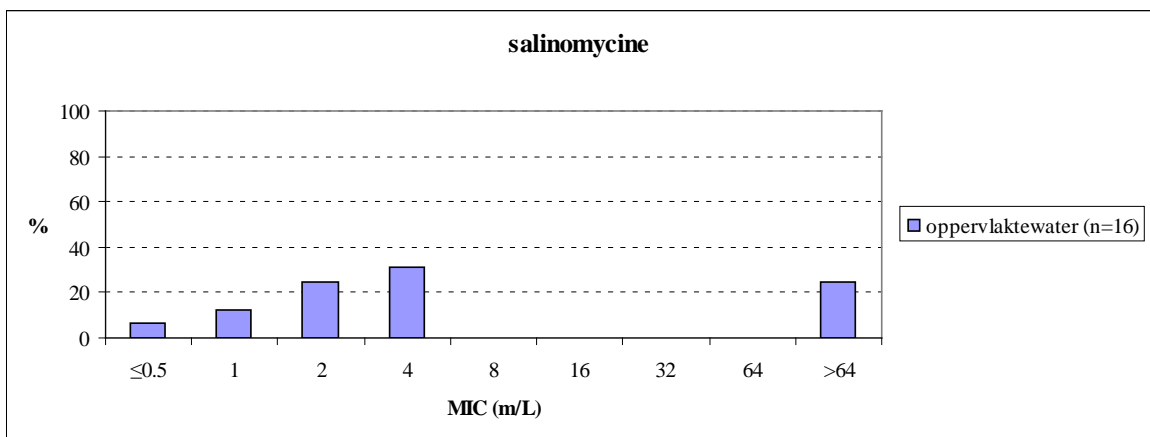
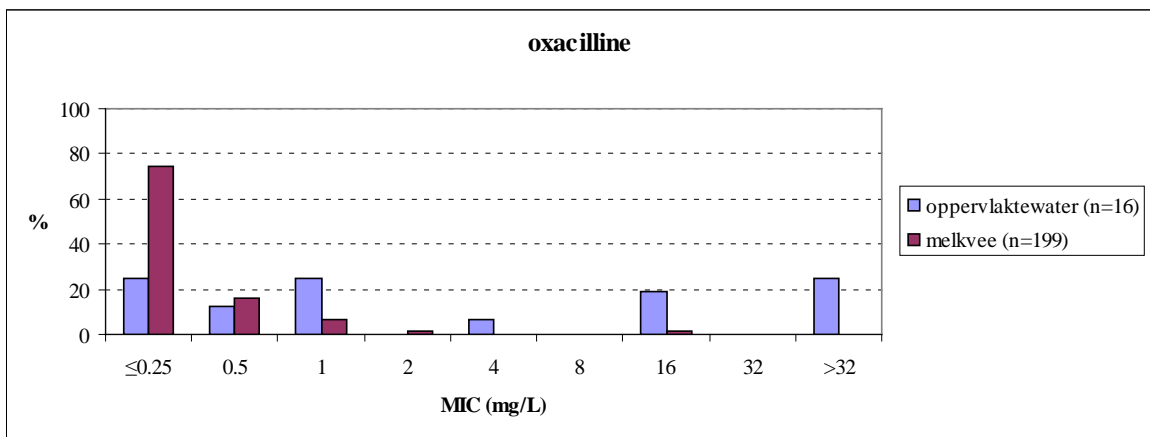
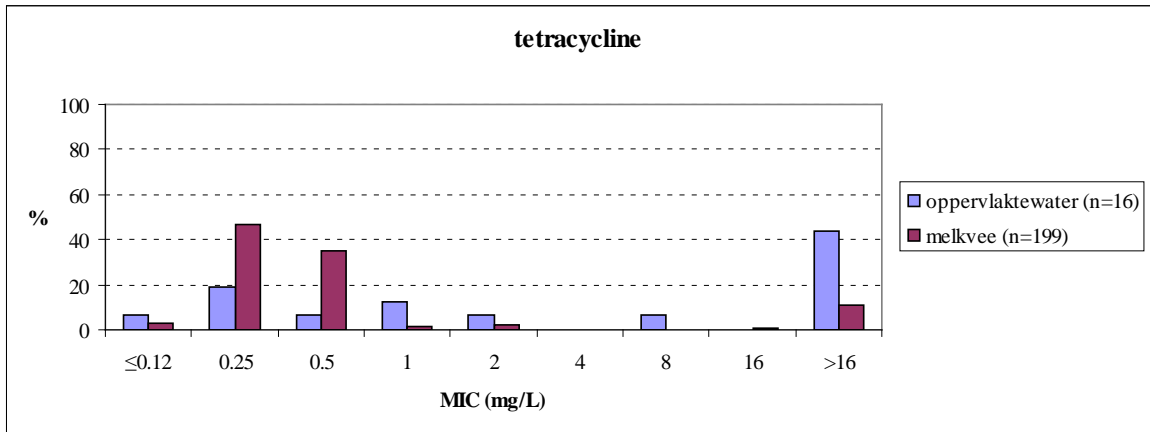


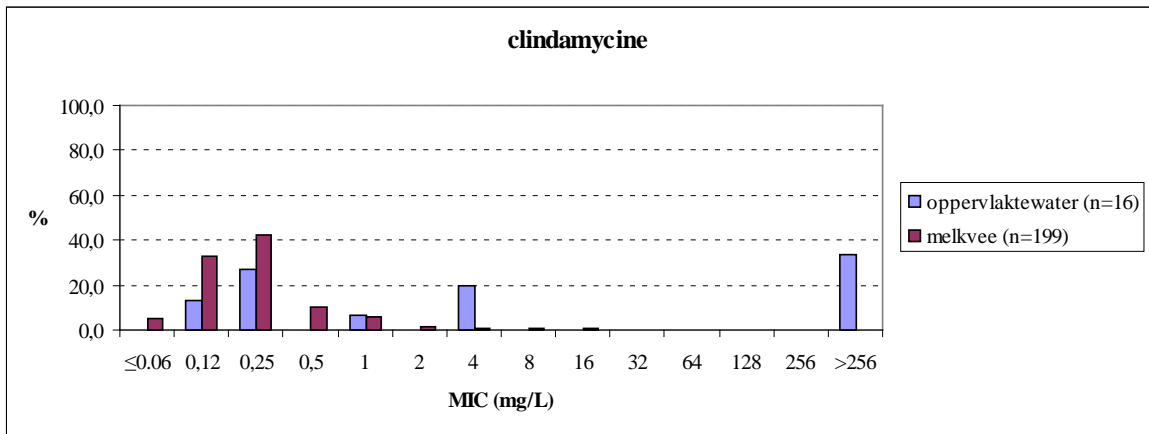
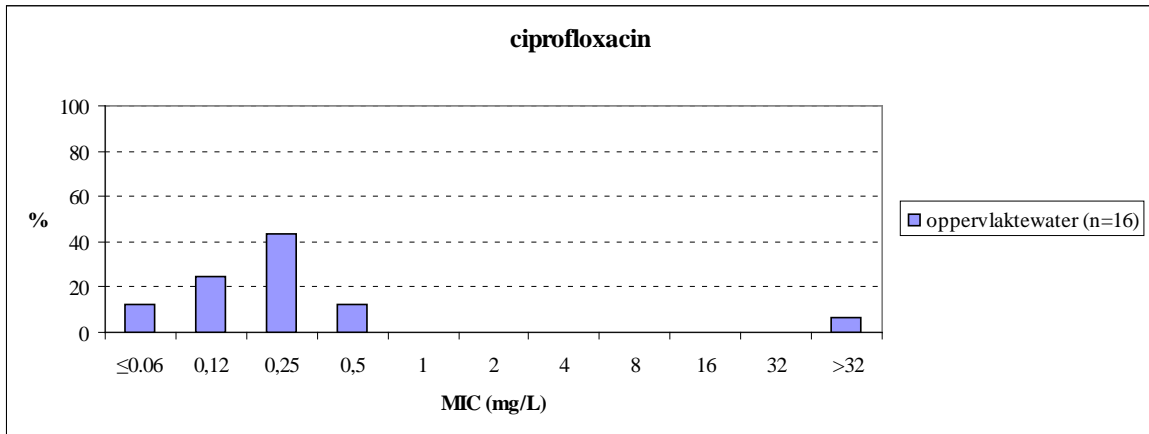


Bijlage 8. MIC-verdelingen voor *Staphylococcus*-isolaten

De data voor melkvee zijn afkomstig uit MARAN (2007)

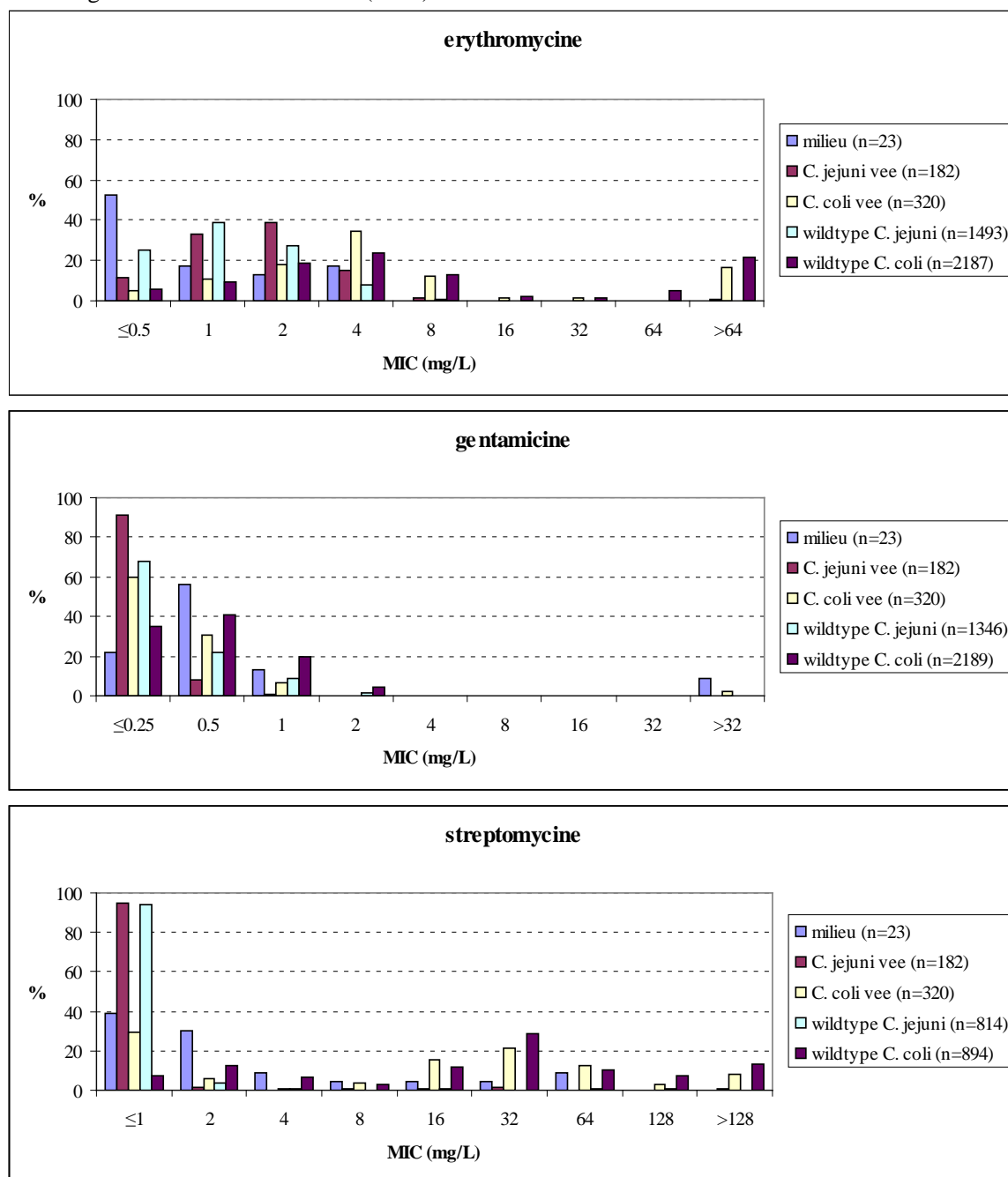


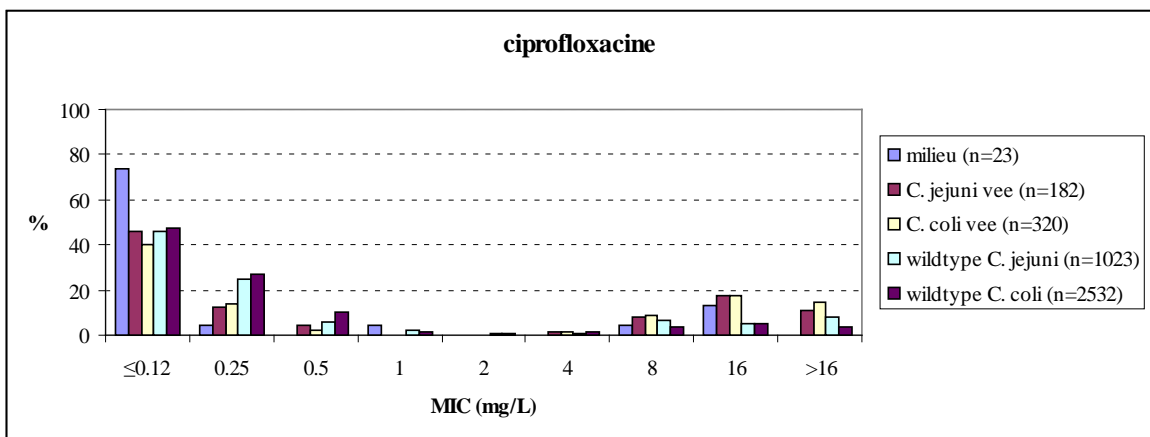
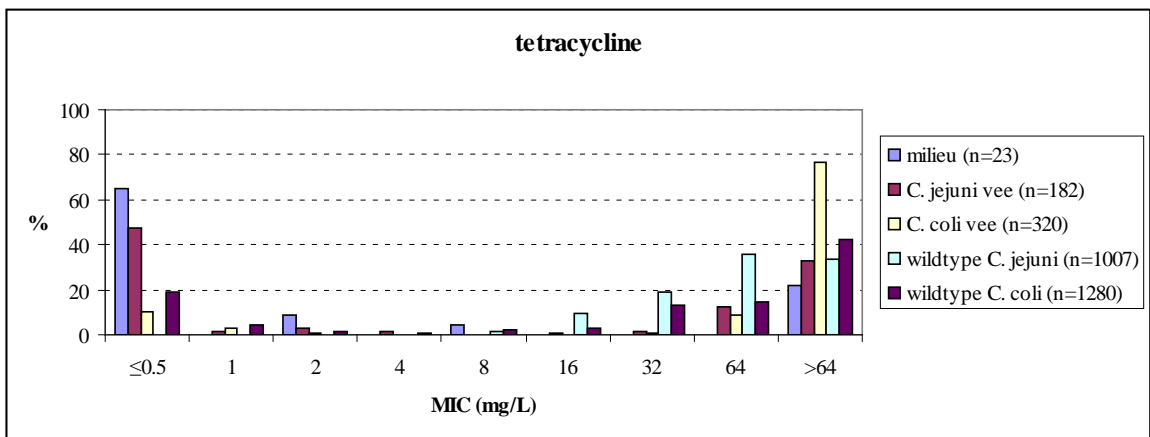
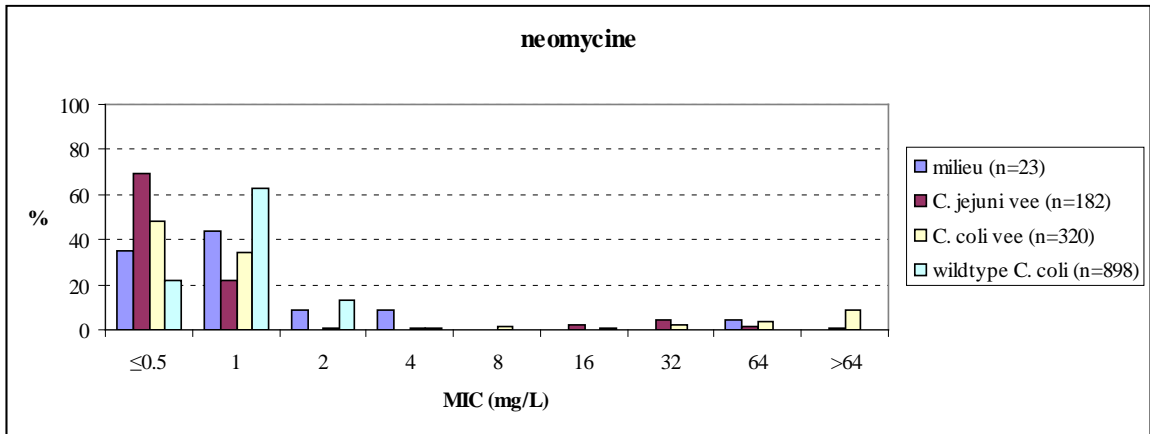


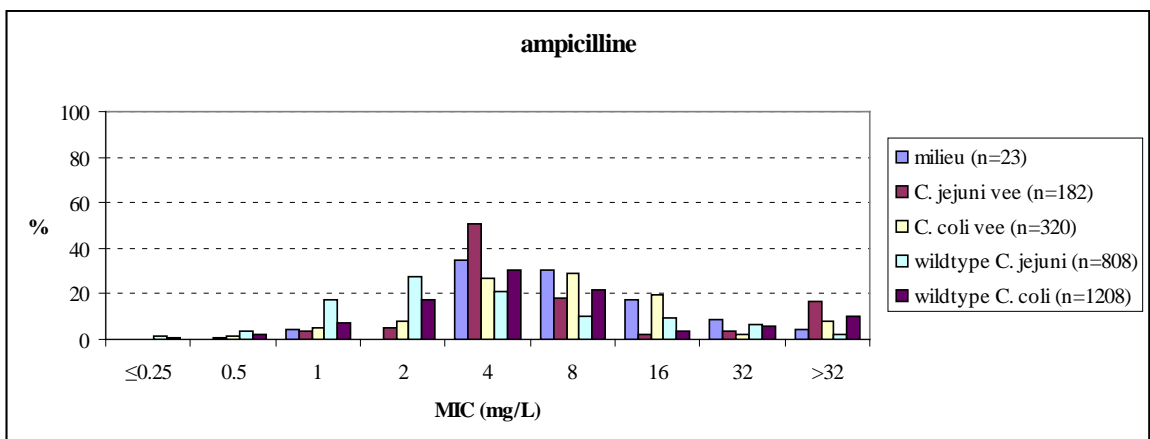
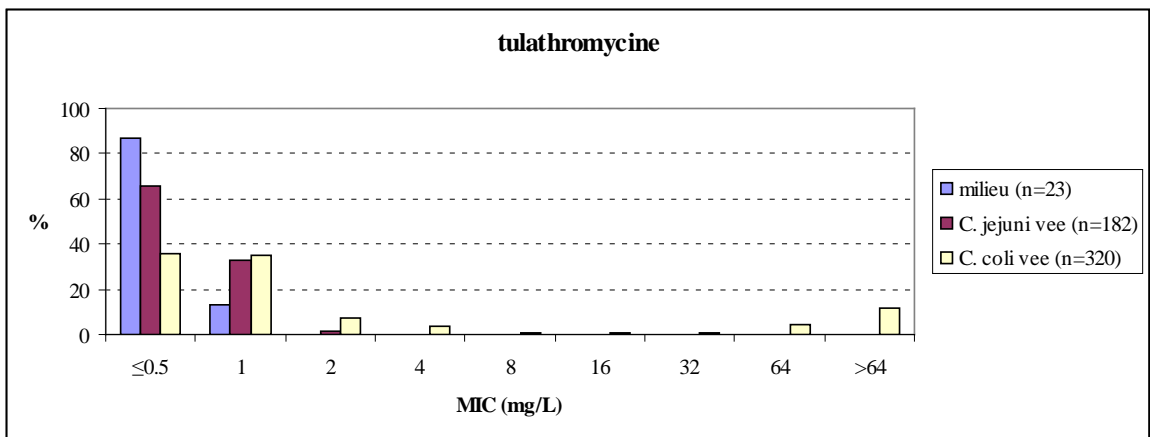
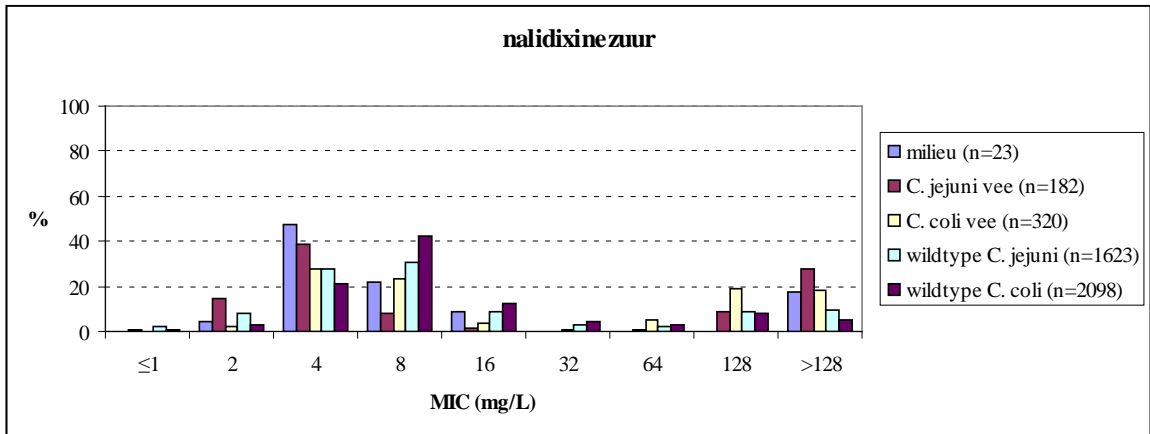


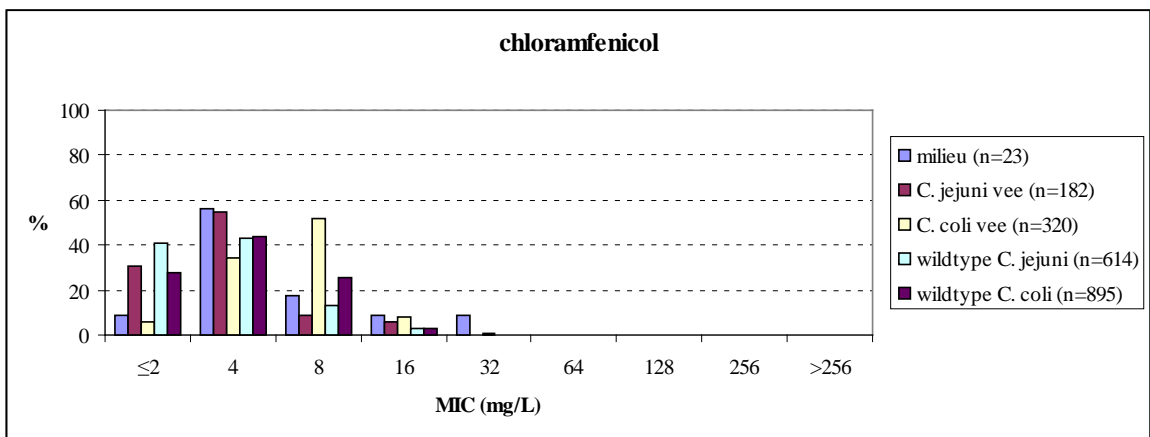
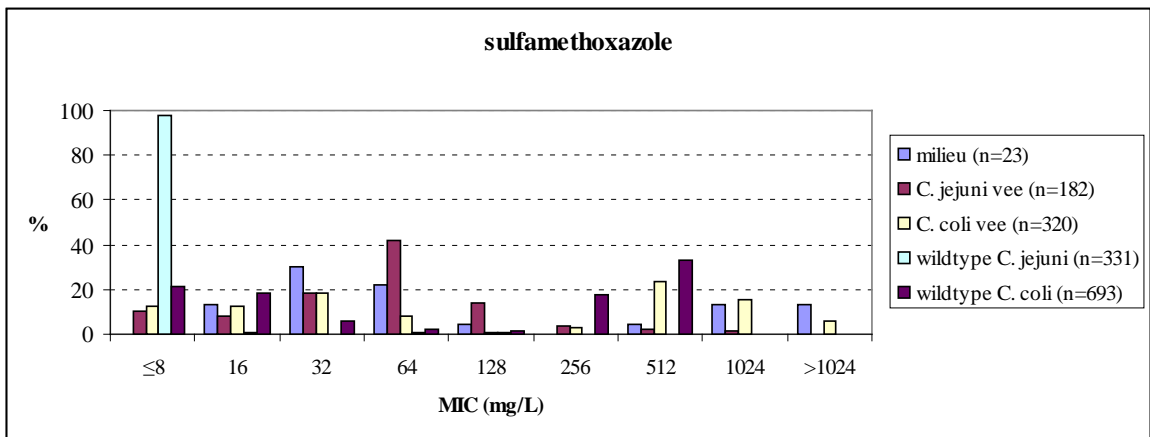
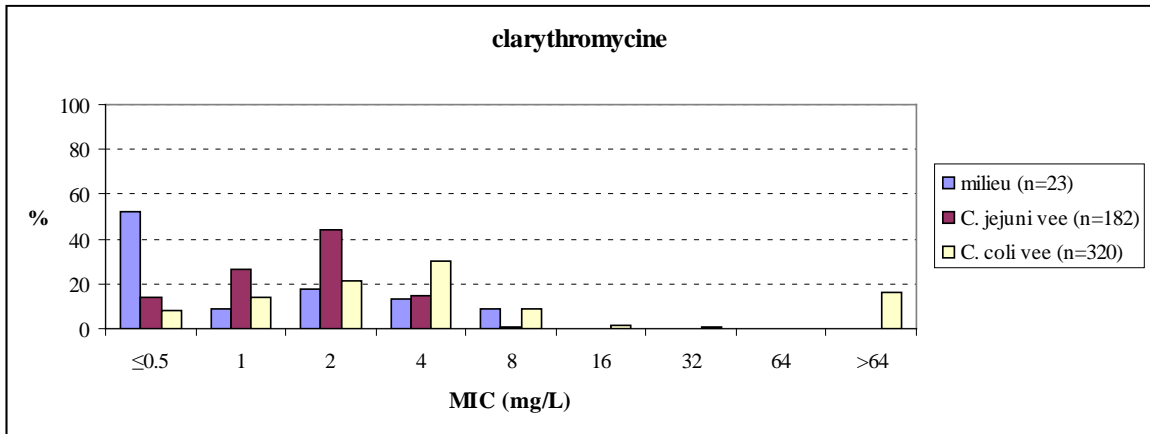
Bijlage 9. MIC-verdelingen voor *Campylobacter*-isolaten

De data voor *C. jejuni* en *C. coli* uit vee zijn afkomstig uit MARAN (2007), de wildtypedata zijn afkomstig uit de EUCAST-database (2009)



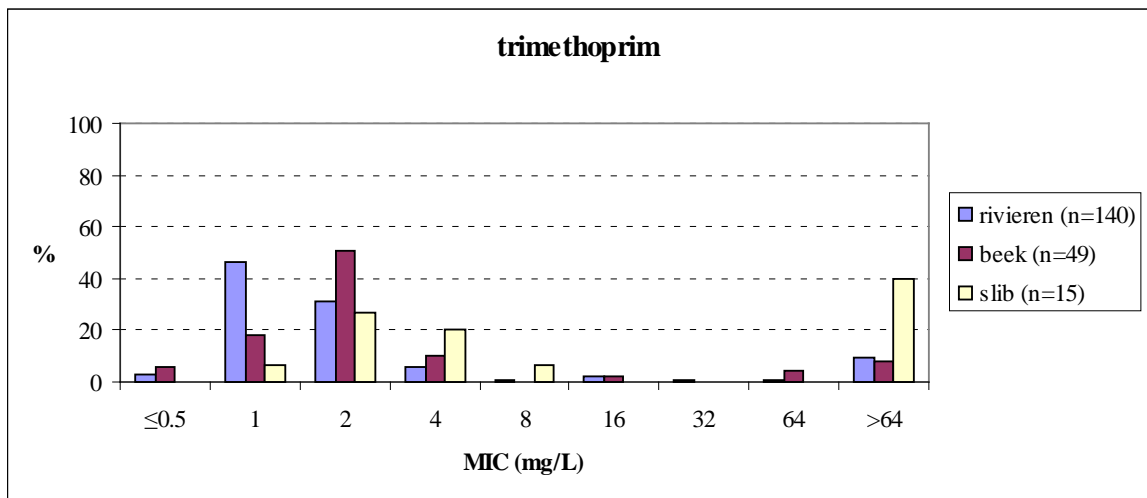
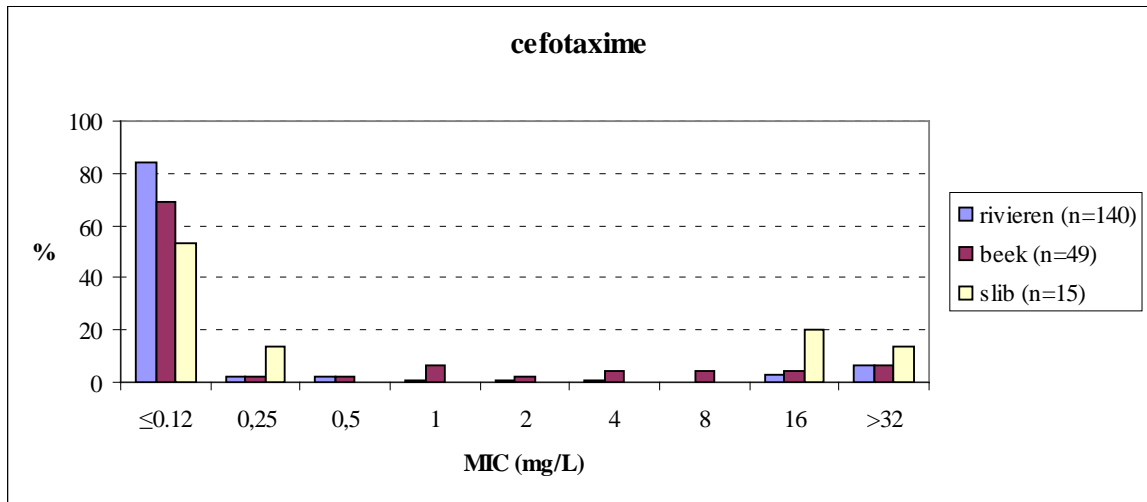


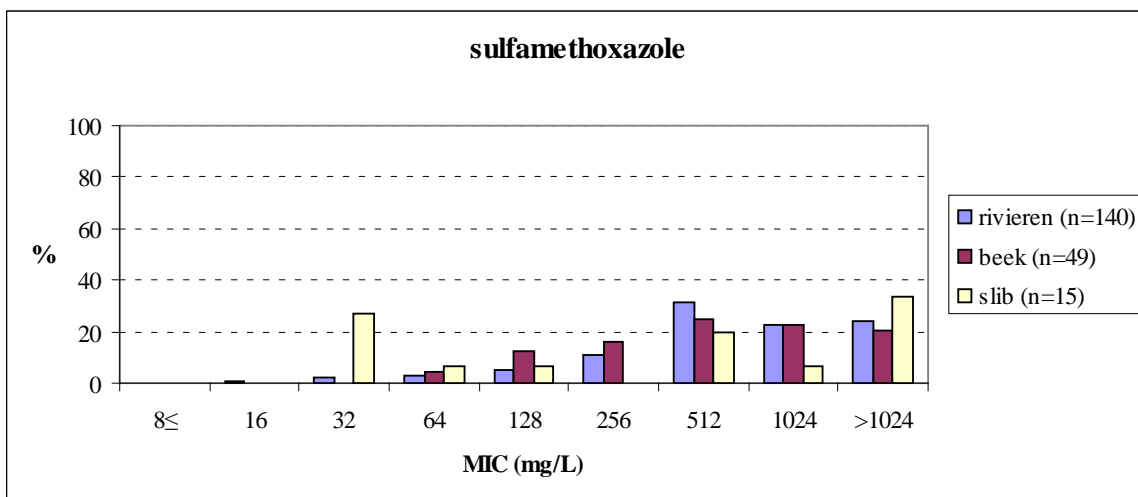
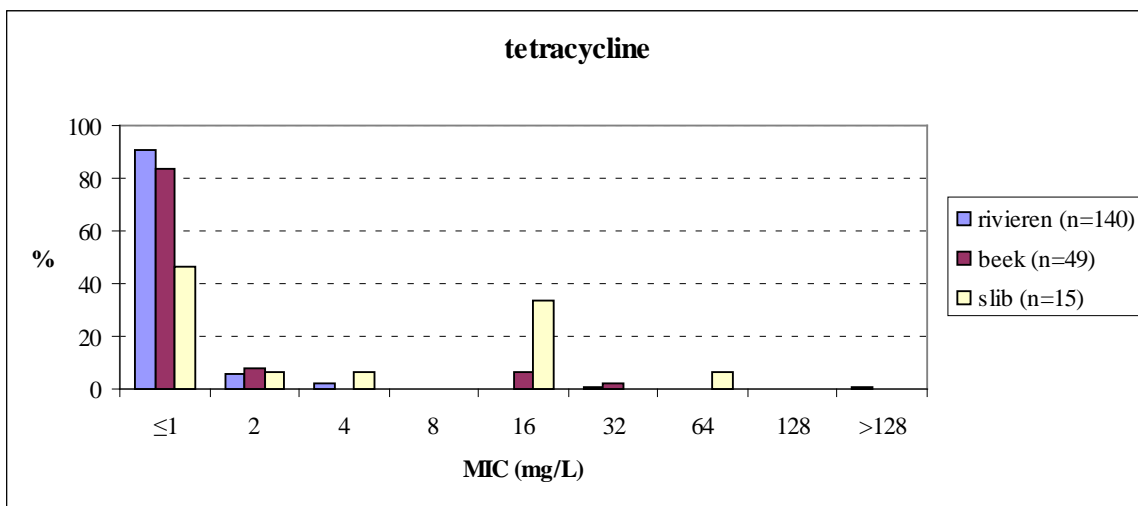
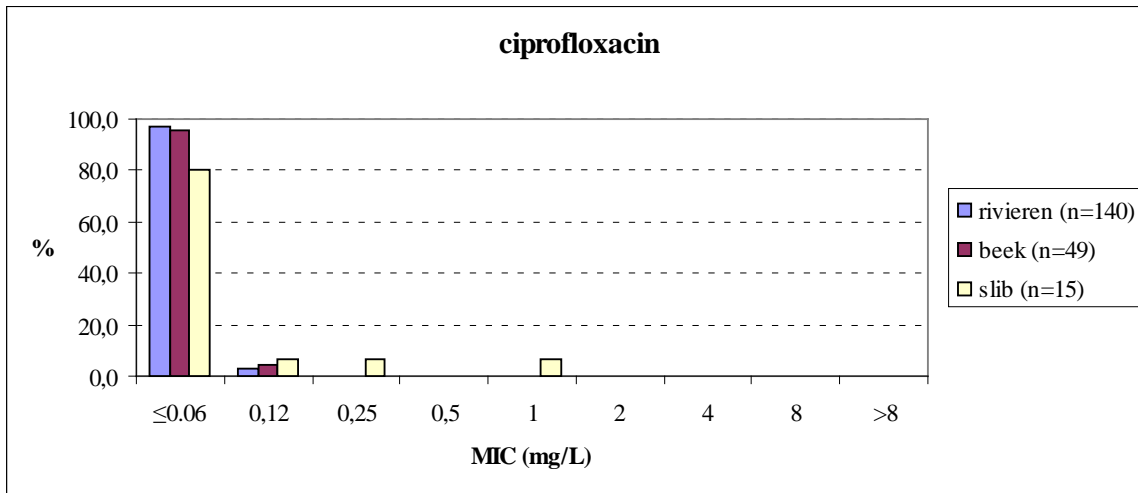




Bijlage 10. MIC-verdelingen voor *Aeromonas*-isolaten

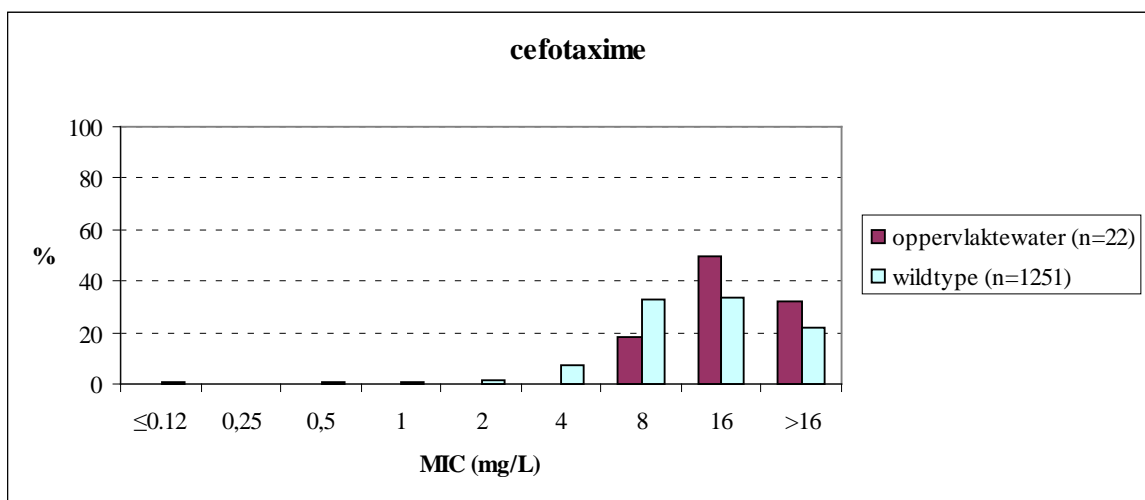
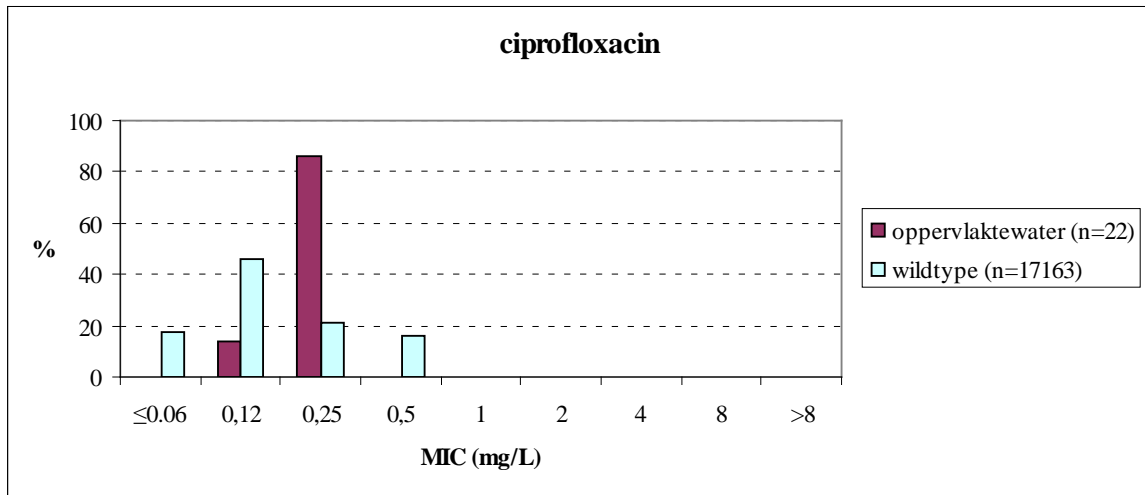
Voor ampicilline zijn geen MIC-verdelingen weergegeven, omdat alle isolaten een MIC > 32 hadden.

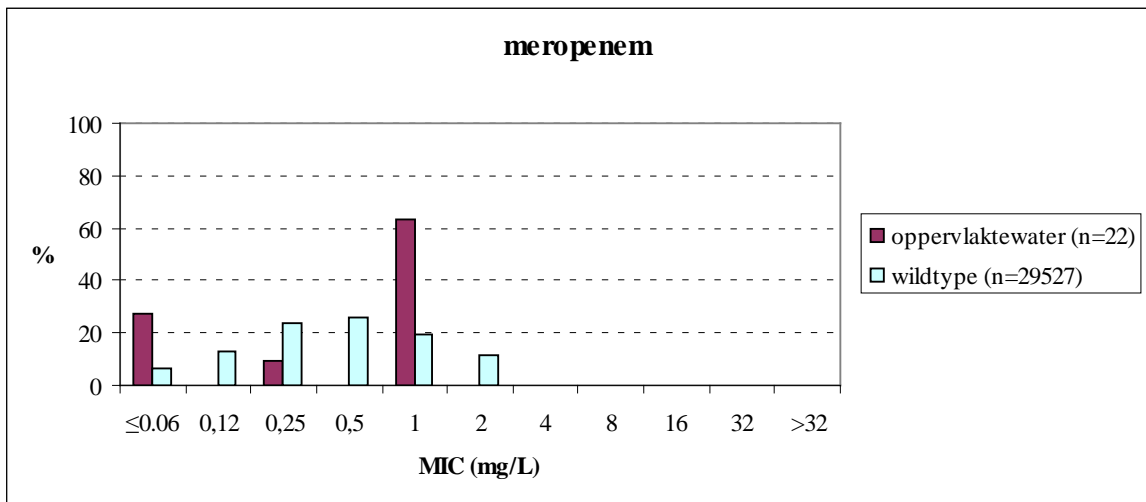
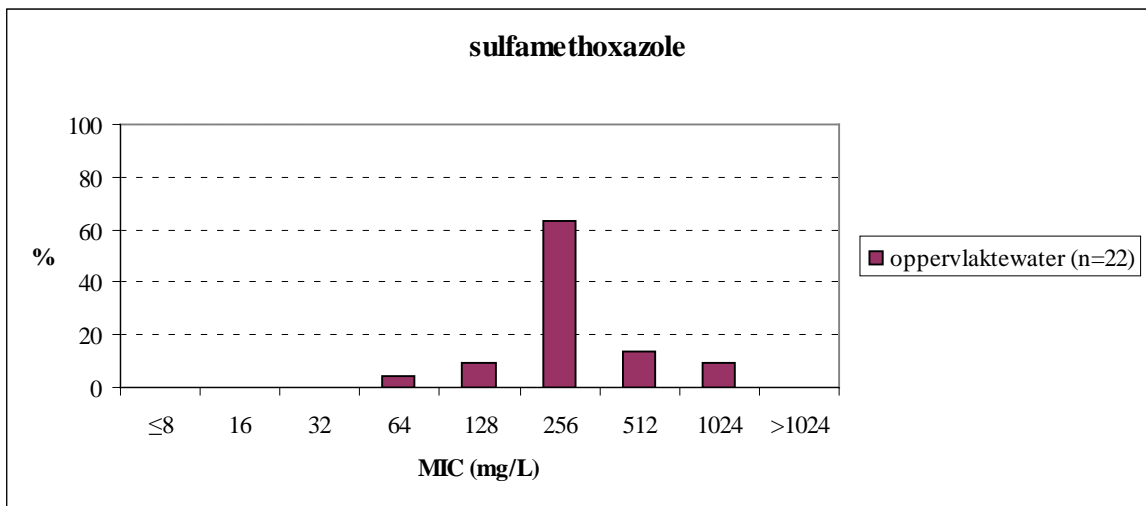
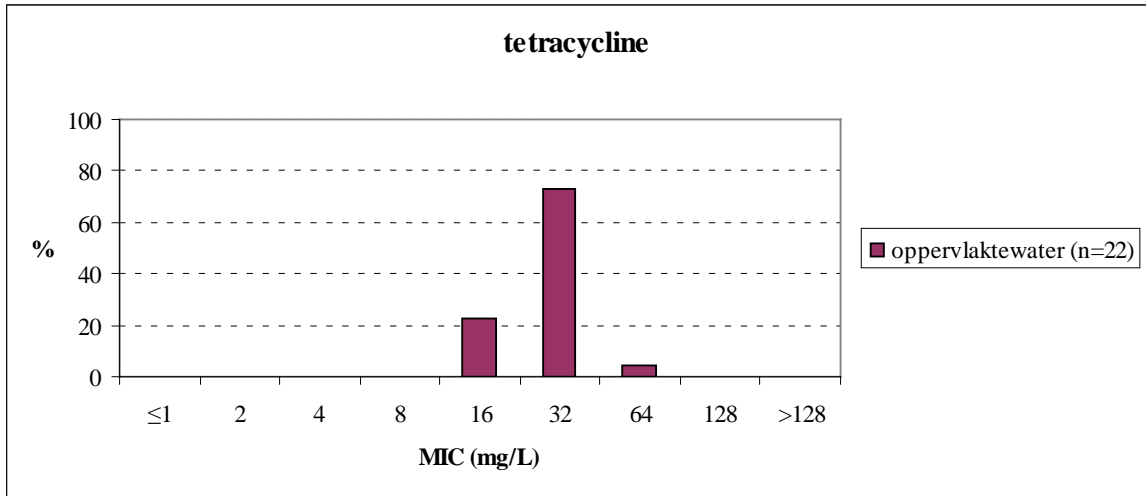


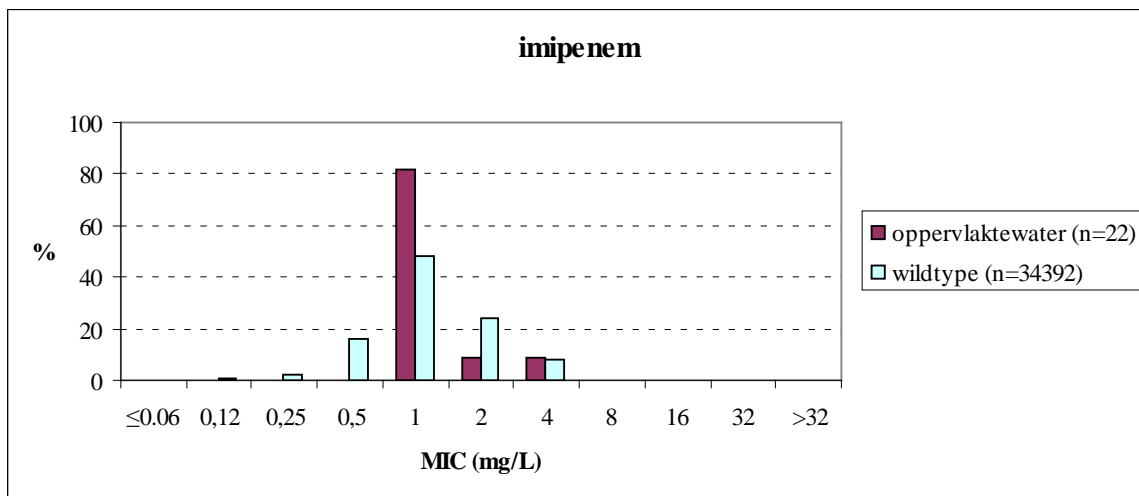


Bijlage 11. MIC-verdelingen voor *P. aeruginosa*-isolaten

De wildtypedata zijn afkomstig uit de EUCAST-database (2009); voor trimethoprim en ampicilline zijn geen MIC-verdelingen weergegeven, omdat voor deze antibiotica alle stammen dezelfde MIC-waarden hadden, (respectievelijk 128 en > 32)







RIVM

Rijksinstituut
voor Volksgezondheid
en Milieu

Postbus 1
3720 BA Bilthoven
www.rivm.nl