



Nederlandse Voedsel- en
Warenautoriteit
Ministerie van Economische Zaken

> Retouradres Postbus 43006 3540 AA Utrecht

Bureau Risicobeoordeling & onderzoeksprogrammering

Catharijnesingel 59
3511 GG Utrecht
Postbus 43006
3540 AA Utrecht
www.vwa.nl

T 088 223 33 33
F 088 223 33 34
risicobeoordeling@vwa.nl

Onze referentie
NVWA/BuRO/2013/11268

**Advies van de directeur bureau Risicobeoordeling
& onderzoeksprogrammering
Aan de minister van VWS en de staatssecretaris van EZ**

Datum
6 november 2013

Advies over de risico's van ESBL's en MRSA in voedsel

Aanleiding

De ministeries van VWS en EZ hebben de Tweede Kamer toegezegd in het najaar van 2013 te rapporteren over de ontwikkelingen rondom ESBL producerende bacteriën en MRSA. Beide categorieën van tegen antibiotica resistente microorganismen veroorzaken hoge medische kosten en toenemend lijden van patiënten. De verspreiding van deze vormen van antibioticaresistentie wordt gedeeltelijk veroorzaakt door de blootstelling van bacteriën aan antibiotica in veehouderijen. De beide ministeries hebben daarom om advies gevraagd aan het Bureau Risicobeoordeling en Onderzoekprogrammering van de NVWA (BuRO) over de risico's van voedselgebonden resistente bacteriën en onderzoek dat beleid op dit terrein kan onderbouwen.

Ondernomen acties

Om de vraag van de beide ministeries te kunnen beantwoorden heeft BuRO de kennis die over dit onderwerp die momenteel beschikbaar is, geïnventariseerd. Over het voorkomen van antimicrobiële resistentie waaronder die van ESBL producerende bacteriën en MRSA, is veel wetenschappelijke literatuur beschikbaar en het RIVM heeft verscheidene rapporten hierover uitgebracht. In Nederland wordt de ontwikkeling van antibiotica resistentie goed gemonitord, zowel in humane gezondheidszorg als in de landbouwsector. Op basis van deze en andere beschikbare bronnen heeft BuRO de vragen van de ministeries beantwoord en een advies opgesteld.

Conclusies

Het is duidelijk dat resistentie tegen antibiotica die geselecteerd is in de landbouw, zijn weg kan vinden naar humaan pathogenen. Het is evenwel niet bekend welke fractie van de resistentie in de humane gezondheidszorg zijn oorsprong heeft in de agrarische sector. Het generieke maatregelbeleid om het antibioticumgebruik in de agrarische sector terug te dringen zal op den duur waarschijnlijk effect sorteren. Er is echter nader onderzoek nodig voor het ontwikkelen van specifieke maatregelen om de resistentietoename risicogericht terug te dringen.



Bureau Risicobeoordeling & onderzoeksprogrammering

Datum
6 november 2013

Onze referentie
NWWA/BuRO/2013/11268

Advies NWWA-BuRO

BuRO doet de volgende aanbevelingen voor de onderbouwing van risicomanagement maatregelen die tot doel hebben de gezondheidsrisico's van ESBL's en MRSA en andere resistente pathogenen op voedsel te verminderen:

- Continueer de monitoring van antibiotica resistentie bij landbouwhuisdieren en levensmiddelen en in de humane gezondheidszorg minimaal op het huidige niveau. Sluit daarbij aan de op EU initiatieven op dit terrein.
- Laat het veterinaire antibioticumgebruik vastleggen in dagdoseringen per dier (DDD) zoals dat ook in het medische domein gebeurt. Die gegevens zijn noodzakelijk voor een goed inzicht in de relatie tussen het voorkomen van resistentie en het antibioticumgebruik. Bovendien kunnen medische en veterinaire data dan optimaal worden vergeleken.
- Voer de onderzoeksprojecten aangaande antimicrobiële resistentie en speciaal ESBL's, uit volgens plan. Laat daarbij de focus leggen op het onderzoek dat duidelijkheid moet geven over de aard en de omvang van de risico's voor de volksgezondheid van resistentie bij productiedieren.
- Implementeer de uitkomsten van de verschillende onderzoeken aangaande antimicrobiële resistentie en in het bijzonder ESBL's bij het vaststellen van kosteneffectief risicomanagement. Leg daarbij de nadruk op het ontwikkelen van optimale toedieningregimes voor antibiotica in de landbouwsector, zowel vanuit het oogpunt van ontwikkeling van resistentie als van overdracht van resistentiegenen.
- Stel het volgen van de zogenoemde formularia verplicht en eis dat kritische antibiotica alleen op basis van een gevoeligheidstest toegediend mogen worden waarbij de indicatie en het regime van behandeling (DDD) op het VKI-formulier worden geregistreerd.

Hoogachtend,


Dr. Antoon Opperhuizen
Directeur bureau Risicobeoordeling & onderzoeksprogrammering



Bijlage 1

De risico's van ESBL's en MRSA op voedsel

Aanleiding

De afgelopen jaren hebben ESBL (extended spectrum beta-lactamases) producerende bacteriën, kortheidshalve vaak aangeduid als ESBL's, veel in de belangstelling gestaan, omdat ziekteverwekkers die deze enzymen aanmaken resistent zijn tegen een groot aantal antibiotica. De aandacht voor MRSA (methicillin resistent *Staphylococcus aureus*) en VRE (Vancomycine Resistente Enterococceen) is ouder, omdat deze bacteriën al langer voor problemen zorgen in ziekenhuizen. In tegenstelling tot MRSA en VRE, zijn ESBL's niet één soort of groep bacteriën, maar is het een verzamelnaam voor alle bacteriën die deze genen bij zich dragen. Een tweede verschil tussen MRSA en VRE aan de ene kant en ESBL's aan de andere, is dat ESBL producerende bacteriën niet alleen een bedreiging vormen wanneer zij zelf ziekteverwekkend zijn. Niet-pathogene bacteriën die plasmiden, stukjes DNA die door bacteriën onderling uitgewisseld kunnen worden, met ESBL genen bevatten kunnen deze in een later stadium van de voedselketen overdragen op ziekteverwekkers. Dit gebeurt weliswaar ook bij MRSA en VRE, maar met lagere frequentie (Tacconelli et al., 2008)

De ministeries van VWS en EZ zijn bezorgd over de risico's als gevolg van het voorkomen van deze bacteriën op levensmiddelen. Daarnaast hebben zij behoefte aan een overzicht van de aanwezige kennis omtrent de voedselveiligheidsrisico's en een analyse van waarover nieuwe wetenschappelijke kennis en/of onderzoek nodig is om doelmatig maatregelen te kunnen nemen die de voedselveiligheid waarborgen. Ook is een nadere analyse wenselijk van de onderzoeksprioriteiten.

Eén van de zorgen is dat het voorkomen van ESBL's en MRSA op levensmiddelen tot twijfel leidt aan de voedselveiligheid. Het advies van de gezondheidsraad van 2011 noemt ESBL's, MRSA en VRE als voornaamste in de landbouw ontstane risico's voor de volksgezondheid. In het rapport werd opgemerkt dat de situatie betreffende antibiotica resistentie zich over de jaren bijzonder dynamisch heeft getoond. De reden hiervoor is dat bacteriën, inclusief pathogene vormen, zich snel aanpassen en dat derhalve bij blootstelling aan antibiotica resistente vormen zullen evolueren die groeien en fit zijn. Dit gebeurt ook bij gebruik van antibiotica in de veeteelt. Daarom moet worden aangenomen dat ook in de toekomst onwelkome verrassingen zich kunnen voordoen, die op overeenkomstige wijze als MRSA en de ESBL's tot onrust bij het publiek kunnen leiden.

De problematiek van ESBL-producerende bacteriën en MRSA kan niet los worden gezien van de algemene problematiek van antibiotica resistentie. Hoewel ESBL's en MRSA beide resistentie tegen beta-lactam antibiotica als naamgevende eigenschap hebben, zijn zij vaak ook resistent tegen andere klassen van antibiotica. Wanneer in plaats van antibiotica uit de beta-lactam klasse, andere antibiotica gebruikt worden in de landbouwsector is er ten eerste een risico dat ESBL's en MRSA alsnog geselecteerd worden als de resistentiegenen op dezelfde plasmide liggen. Ten tweede is er grote kans dat die andere antibiotica op hun beurt weer voor andere resistente stammen selecteren, waardoor het probleem



Bureau Risicobeoordeling & onderzoeksprogrammering

Datum

6 november 2013

Onze referentie

NVWA/BuRO/2013/11268

zichzelf niet alleen maar verplaatst, maar er zelfs een kans is dat de situatie verslechtert.

De NVWA doet veel aan gerichte monitoring van het voorkomen van ESBL's op levensmiddelen. De afgelopen jaren zijn niet alleen vlees en vleesproducten, maar ook groenten en fruit en andere producten die voor consumptie niet verhit worden, hierop onderzocht. Daarnaast worden willekeurig ongeveer 2000 isolaten die in het reguliere onderzoek op voedsel zijn verkregen onderzocht op resistentie patronen. Typische ESBL patronen worden daarbij opgemerkt en de bijbehorende stammen worden met behulp van PCR om te zien of ze echt dragers van ESBL genen zijn. Ongeveer de helft van de verdachte monsters bevat inderdaad ESBL's. Binnen de EU is Nederland het enige land dat in 2011 over ESBL's rapporteerde (EFSA, 2013). Binnenkort wordt een door alle lidstaten ondersteund uitvoeringsbesluit (SANCO 11591 en SANCO 11267) in stemming gebracht waardoor monitoring van ESBL's voor alle lidstaten verplicht wordt.

Vragen die zijn gesteld

De ministeries van VWS en EZ hebben BuRO de volgende vragen gesteld:

1. Wat is met het oog op voedselveiligheid en op basis van de bestaande wetenschappelijke literatuur bekend over het voorkomen van ESBL's, MRSA en eventuele andere belangrijke resistente bacteriën op voedsel in Nederland?
2. Op welke (groepen van) voedingsmiddelen komen het meest en/of het vaakst ESBL's of MRSA voor en welke vormen de belangrijkste risico's voor de voedselveiligheid?
3. Wat zijn de belangrijkste hiaten in de huidige kennis over ESBL's, MRSA e.a. vormen van resistentie in relatie tot de voedselveiligheid?
4. Mag verwacht worden dat het lopende en binnenkort te starten onderzoek het nodige kwantitatieve en/of kwalitatieve inzicht zal opleveren voor de onderbouwing van risicomanagement maatregelen die tot doel hebben de gezondheidsrisico's van ESBL's en MRSA e.a. op voedsel te verminderen?
5. Welke kennishiaten zijn in dat licht te verwachten?
6. Welke stukken kennisontwikkeling zouden met het oog op de voedselveiligheid met voorrang moeten worden opgepakt?

Aanpak

Gezien de korte termijn waarop dit advies moest worden afgerond, is er niet gekozen voor het stellen van ad-hoc vragen aan het Frontoffice RIVM-RIKILT. Er is een aantal rapporten van het RIVM over deze problematiek beschikbaar en daarnaast zijn de jaarlijkse MARAN en Nethmap rapporten belangrijke bronnen van informatie. De NVWA verricht ook zelf onderzoek op dit terrein en is opdrachtgever voor een aantal projecten. Daardoor was het mogelijk in plaats van een ad-hoc project uit te laten voeren, literatuuronderzoek te doen mede op basis van al deze gegevens.

Wat zijn de gevaren

Infecties door bacteriën die resistent zijn tegen antibiotica zijn moeilijker te behandelen, omdat aanvankelijk werkzame middelen niet langer effectief zijn. Dit



leidt tot langduriger en complexere behandelingen en hogere kosten. De extra kosten voor de behandeling in het ziekenhuis van een patiënt met een resistente variant van één van de veelvoorkomende veroorzakers van infecties liggen tussen de € 5000,- en € 35.000,- per geval (Maragakis et al., 2008; Slama, 2008). In Nederlandse ziekenhuizen is het overlijden van een patiënt aan een infectie met een vanwege resistentie onbehandelbare bacterie nog een grote uitzondering, als het al gebeurt. In het buitenland is dit echter niet meer uitzonderlijk. De resistente bacteriën die de afgelopen jaren veel in het nieuws zijn geweest vormen maar een deel van de totale resistentie problematiek. De dynamiek is groot door het uitwisselen van genen tussen bacteriën en het verwerven van nieuwe vormen van resistentie. Daarom moet antibioticaresistentie in het algemeen zoveel mogelijk worden teruggedrongen, zoals eerder werd geconcludeerd in het advies van de Gezondheidsraad over dit onderwerp.

Infecties met ESBL dragende *E. coli* zijn duurder te behandelen dan die met gevoelige *E. coli*, met gemiddeld 7 extra ziekenhuisdagen, en brengen een 5 keer hogere kans op overlijden teweeg (Tumbarello et al., 2010). Sommige ESBL's en zelfs stammen die carbapenems, het laatste werkzame middel tegen ESBL's, kunnen afbreken, zijn in staat epidemieën te veroorzaken (Livermore, 2012). Ook MRSA veroorzaakt hoge kosten, geschat op maximaal \$ 16 miljard per jaar in de VS (Lee et al., 2012). Alleen al de ziekenhuiskosten in de EU bedragen ongeveer € 380 miljoen per jaar (Kock et al., 2010). De verschillende wijzen van berekenen van de totale extra zorgkosten als gevolg van antibiotica resistentie geven sterk verschillende uitkomsten, maar in alle gevallen zijn de kosten bijzonder hoog. Overlijden van patiënten als gevolg van therapiefalen is daarbij doorgaans nog niet meegenomen.

In het algemeen bestaat voor alle resistentie die in de landbouwsector wordt geselecteerd de kans dat deze na verloop van tijd wordt overgedragen op de humane sector. Resistentie van bacteriën tegen antibiotica ontstaan in de landbouw kan rechtstreeks, of indirect een bedreiging vormen voor de volksgezondheid.

Rechtstreeks: Verwekkers van voedselinfecties zoals *Salmonella* en *Campylobacter* soorten die voorkomen bij dieren, worden resistent als gevolg van behandeling van die dieren met antibiotica. Infecties die optreden bijvoorbeeld via het consumeren van het vlees van deze dieren, zijn vervolgens moeilijker te behandelen.

Indirect: Bacteriën die zelf geen ziekte bij de mens veroorzaken dragen resistentie over op ziekteverwekkers. Deze ziekteverwekkers worden resistent en veroorzaken lastig te behandelen infecties.

Veel bacteriën die multiresistent zijn, zoals ESBL producerende darmbacteriën en MRSA, vormen geen probleem voor gezonde mensen. Onder bepaalde omstandigheden (na een operatie, bij slechte algemene conditie) kan infectie met een dergelijke resistente bacterie optreden, die dan moeilijk te behandelen kan zijn. Om voor de hand liggende redenen treden zulke infecties vaak in ziekenhuizen op. Deze bacteriën worden daarom ook wel "ziekenhuisbacteriën" genoemd. Zij zorgen voor aanzienlijke extra ziektelast en kosten, niet alleen in ziekenhuizen, maar ook in verpleeghuizen. De bekende voedselpathogenen van de genera *Salmonella* en *Campylobacter* zijn tegenwoordig ook vaak resistent tegen meerdere antibiotica. Een combinatie van beide risico's zijn de ESBL bevattende *Salmonella* stammen, waarvan er al ruimschoots zijn aangetroffen op pluimveevlees (Maran, 2013). Een deel van de resistentie van *Salmonella* soorten,



bijvoorbeeld tegen cefotaxime, is te wijten aan de opname van plasmiden met ESBL genen.

Het voorkomen van ESBL's op levensmiddelen is wijd verbreid. Dat zou op zich geen probleem hoeven te zijn, omdat de meeste ESBL producerende bacteriën niet ziekteverwekkend zijn. Het gevaar zit in de overdracht van de plasmiden die de resistentiegenen bevatten aan pathogene soorten. Daardoor wordt de selectie voor resistentie die in de landbouwsector plaatsvindt overgedragen op de humane gezondheidszorg. Die overdracht hoeft niet alleen via levensmiddelen te gebeuren. Overdracht van pathogene bacteriën vanuit boerderijen via het milieu naar de mens is zeer waarschijnlijk (Friesema et al., 2012). Voor ESBL's lijkt dit niet het geval (Huijbers et al., 2013), hoewel lopend onderzoek van het RIVM juist wel aanwijzingen geeft voor transmissie van ESBL's via het milieu (Schets, pers. comm.). Daarnaast zijn gevallen bekend dat ESBL producerende *E. coli* stammen die genetisch sterk verwant zijn met op kippenvlees voorkomen urineweginfecties hebben veroorzaakt bij mensen (Geenen et al., 2011; Leverstein-van Hall, 2011). Deze verwantschap is overigens geen overtuigend bewijs van een causaal verband, maar wel een aanwijzing daarvoor.

Er is veel onderzoek gedaan naar de overdracht van landbouw-geassocieerde (Livestock-Associated) LA-MRSA van de boerderij naar de algemene bevolking (Geenen et al., 2013). De conclusie is dat voedsel daarbij een verwaarloosbare rol speelt, maar dat de LA-variant van MRSA zich langzaam in de Nederlandse bevolking verspreidt. Het risico van dragerschap LA-MRSA is buiten zorginstellingen overigens uitermate gering. Deze verspreiding vindt plaats doordat mensen die beroepshalve met landbouwhuisdieren in aanraking komen en hun familie de MRSA op anderen overdragen. Als gevolg daarvan maakt de LA-variant ongeveer 40% uit van de bij patiënten aangetroffen MRSA stammen, veel meer dan in de ons omringende landen. Hierbij moet worden opgemerkt dat de prevalentie van MRSA binnen de Nederlandse bevolking bijzonder laag is, minder dan 1% van de populatie is drager.

Resultaten

Hoe frequent komen ESBL's voor in voedsel

Uit onderzoek van de NVWA blijkt dat ongeveer een zesde van alle onderzochte monsters voedingsmiddelen, ESBL's bevatte. De verschillen tussen de verschillende categorieën levensmiddelen zijn groot: vrijwel al het kippenvlees is ermee besmet, maar mosselen en oesters alleen sporadisch. Wat meer zorgen baart dan de hoge besmetting op het kippenvlees is dat een aantal onverhit te consumeren producten, zoals kant-en-klaar salades en filet americain (gesneden groenten en pakketten respectievelijk rauwe vleeswaar in tabel 1), eveneens besmet zijn. Dat betekent dat de consument wordt blootgesteld aan levensvatbare ESBL producerende bacteriën. Geconstateerd moet worden dat de ESBL's dermate veelvuldig op levensmiddelen voorkomen dat het voor de consument vrijwel niet mogelijk is er niet mee in aanraking te komen. Als gevolg daarvan kan overdracht plaatsvinden van de plasmiden met de genen die voor resistentie coderen op humaan pathogenen. De resultaten van het onderzoek van levensmiddelen in 2012 zijn vermeld in Tabel 1.



Tabel 1

Percentage monsters die positief waren voor ESBL verkregen in 2012 van verschillende producten. De percentages betreffen stammen waarin de aanwezigheid van ESBL genen met moleculair biologische methoden is aangetoond (ook wel aangeduid als "bevestigd"). Bron: NVWA

Project	Aantal Monsters	ESBL +	%	
MANT1228 Gesneden groenten/fruit	744	38	5,1%	gesneden groenten en pakketten
MANT1225 Vlees vers	456	37	8,1%	
MANT12P2 VIP Rundergehakt en hamburger	448	79	41,6%	89 partijen N=5; 37 positief
MANT1224 Pluimvee vers	216	170	78,7%	
MANT12P1 VIP Rauwe vleeswaar	160	22	25,0%	32 partijen N=5; 8 positief
MANT12V2 Levende tweekleppige weekdieren industrie	104	1	1,0%	mosselen en oesters
MANT1231 Aziatische kruiden niet-669	88	6	6,8%	22 partijen n=1 tot 5; 4 positief
MANT1205 Horeca Monitor	70	3	4,3%	groente en fruitsalades
Totaal	2286	356	15,6%	

De vraag of alle op groenten en fruit aangetroffen ESBL's van origine afkomstig zijn uit de veehouderij kan niet eenduidig worden beantwoordt. De stammen op groenten en vlees zijn duidelijk verschillend op DNA niveau, maar het is goed mogelijk dat die verschillen veroorzaakt worden doordat ze zich op andere matrices vestigen. De oorspronkelijk selectie voor resistentie kan dan nog altijd in de landbouwsector hebben plaatsgevonden.

In het MARAN rapport over antibioticaresistentie in Nederland worden eveneens gegevens over het voorkomen van ESBL producerende bacteriën op vlees van verschillende diersoorten samengevat. Onderstaande tabel is afkomstig uit dat rapport (MARAN, 2013).

Tabel 2

Het voorkomen van ESBL bacteriën op vlees van verschillende diersoorten. Stammen die de resistentiepatronen vertonen die typerend zijn voor ESBL producenten (suspected / verdacht) zijn vervolgens moleculair biologisch (PCR) onderzocht op de aanwezigheid van ESBL genen (confirmed / bevestigd).

Animal source	N	ESBL suspected	%	ESBL confirmed	%
Beef	265	45	17%	17	6%
Pork	298	31	10%	3	1%
Mixed meat	15	6	40%	1	7%
Poultry	188	157	84%	138	73%
Turkey	28	13	46%	8	29%
Ostrich	1	0	0%	0	0%
Deer	1	0	0%	0	0%
	796	252	32%	167	21%



Datum

6 november 2013

Onze referentie

NVWA/BuRO/2013/11268

Naast de vraag hoeveel producten positief zijn voor ESBL's is een andere belangrijke maat voor het risico veroorzaakt door ESBL's, het percentage ESBL's binnen de bacteriepopulatie op een product. Na een scherpe toename van zowel het aantal positieve monsters van producten, zoals bijvoorbeeld pluimveevlees, als van het percentage ESBL's in de totale microbiota op deze producten in het eerste decennium van deze eeuw tot 15 – 20 % van de *E. coli* isolaten is er nu weer een daling waarneembaar tot 5,8% in 2012 (MARAN, 2013). Deze daling correleert met het verminderde gebruik van antibiotica dat de afgelopen jaren in de pluimveesector is gerealiseerd.

Hoe frequent komen MRSA en VRE voor op dieren en in voedsel

Er is sinds de ontdekking in 2005 van de landbouwgebonden (Livestock-associated, LA) variant van MRSA op varkensbedrijven in Nederland veel onderzoek gedaan naar deze variant en het voorkomen ervan op landbouwbedrijven. In 2012 waren vrijwel alle geteste varkens en de overgrote meerderheid van de vleeskalveren positief voor MRSA (MARAN, 2013). In de tussentijd hebben de MRSA stammen die van varkens zijn geïsoleerd weer een aantal resistentiegenen er bij verworven in vergelijking met de stammen uit 2005. De prevalentie bij vleeskalveren was in 2012 een beetje lager dan in 2011, 79% tegen 90%, maar bij varkens was er weinig verschil. Dit geeft aan dat het verminderde gebruik van antibiotica in de afgelopen jaren nog niet tot een snelle reductie van de prevalentie van MRSA heeft geleid. Nader onderzoek naar trends en de wijzen van overdracht kan een meer risicogericht interventiebeleid mogelijk maken.

Tabel 2. MRSA in vlees. De NVWA heeft in 2007 ruim 2000 vleesmonsters onderzocht op MRSA

Vleessoort	Aantal monsters	Aantal (%) positief
Rund	395	42 (10,6)
Kalf	257	39 (15,2)
Varken	309	33 (10,7)
Lam/schaap	324	20 (6,2)
Kip	520	83 (16,0)
Kalkoen	116	41 (35,3)
Gevogelte	118	4 (3,4)
Wild	178	4 (2,2)
Total	2217	264 (11,9)

Uit bovenstaande gegevens blijkt dat de consument in Nederland regelmatig wordt blootgesteld aan ESBL's en MRSA in voedingsmiddelen van dierlijke oorsprong. De gemiddelde prevalentie van ESBL's en MRSA op vlees is respectievelijk 21% en 12%. De verschillen tussen vleessoorten zijn aanzienlijk: bij beide categorieën heeft pluimveevlees de hoogste prevalentie. Gericht onderzoek naar wijzigingen in prevalentie over de tijd kan gebruikt worden om bronnen en transmissieroutes te identificeren. Ook aan andere voedselgebonden



Bureau Risicobeoordeling & onderzoeksprogrammering

Datum

6 november 2013

Onze referentie

NVWA/BuRO/2013/11268

zoönoseverwekkers zoals *Campylobacter* en *Salmonella* wordt de consument via vlees regelmatig blootgesteld. Op pluimveevlees worden anno 2013 nog steeds hoge prevalenties resistente *Campylobacter* gevonden. Resistente *Salmonella* komt minder vaak voor en is meer verspreid over de vleessoorten.

Dragerschap van vancomycine resistente enterokokken (VRE) die afkomstig kunnen zijn van dieren vormt een risico voor patiënten met een verminderde afweer. De ban op het gebruik van avoparcin, een structurele analoog van vancomycine, heeft de verspreiding van VRE via de landbouw een halt toegeroepen, maar desondanks wordt VRE nog steeds in ziekenhuizen aangetroffen. Dit toont aan dat resistente varianten nog lang aanwezig blijven, ook wanneer de selectiedruk die voor de verspreiding heeft gezorgd, is weggenomen. Positief nieuws is dat in 2012 voor het eerst in 15 jaar geen VRE is aangetroffen op landbouwhuisdieren.

Voedselinfecties veroorzaakt door resistente bacteriën behorend tot de genera *Salmonella* en *Campylobacter* vormen, in tegenstelling tot de meeste ESBL producerende bacteriën, een rechtstreekse bedreiging voor de volksgezondheid. De gegevens van het meest recente MARAN rapport suggereren dat de voortdurende opgaande trend van het percentage resistenties sinds het begin van de rapportages is doorbroken en dat het gemiddelde percentage van 2011 tot 2012 niet verder is toegenomen. Voor enkele antibiotica-bacterie combinaties is het percentage weliswaar verder toegenomen, maar dat wordt gecompenseerd door een verlaging van andere. Dit vormt een verdere aanwijzing dat de verminderde blootstelling aan antibiotica van landbouw bacteriën het gewenste effect begint te sorteren van een lager percentage van resistente bacteriën. Dit laat echter onverlet dat een uitbraak met multiresistente *Salmonella* of *Campylobacter* niet denkbeeldig is en tot grote publieke onrust kan leiden.

Hoe kunnen de risico's verminderd worden

Generieke vermindering van veterinair antibioticum gebruik

Het terugdringen van het gebruik van antibiotica in de agrarische sector blijft de meest belangrijke, generieke maatregel om resistentieontwikkeling tegen te gaan. Enkele jaren geleden behoorde Nederland tot de lidstaten met het hoogste antibioticumgebruik in de agrarische sector. Het medische domein daarentegen werd gekenmerkt door het laagste gebruik. Onder druk van de overheid en mede naar aanleiding van het opduiken van LA-MRSA en ESBL's heeft de veterinaire sector het gebruik van antibiotica in 5 jaar met ruim 50% terug gebracht (MARAN 2012). De generieke maatregelen die gelden voor alle diersoorten hebben bij varkens en mestkuikens geleid tot een vermindering van het gebruik met circa 60% ten opzichte van 2009. De vleeskalveren zijn in dit opzicht achtergebleven: in deze sector bleef de vermindering ten opzichte van 2009 beperkt tot ongeveer 30% en verdient om die reden extra aandacht van de overheid

Door middel van onder andere 'prudent use', optimalisatie van huisvesting en hoogwaardige voeding, kan een nog verdergaande reductie worden gerealiseerd zonder dat dit ten koste hoeft te gaan van het dierwelzijn. Er is echter nog



Bureau Risicobeoordeling & onderzoeksprogrammering

Datum
6 november 2013

Onze referentie
NVWA/BuRO/2013/11268

onderzoek nodig om te bepalen welke maatregelen het meest kosten-effectief zullen zijn. Door de beroepsgroep wordt aan dierenartsen geadviseerd bij antimicrobiële therapie de zogenoemde formularia te volgen om risico's voor de volksgezondheid waar mogelijk te beperken. De overheid moet meer inzicht krijgen of deze formularia daadwerkelijk zijn gevolgd. Daartoe moet de behandelend dierenarts aangeven, bijvoorbeeld in de voedselketen informatie (VKI), wanneer de formularia niet zijn gevolgd en waarom dit niet is gebeurd.

Welke gerichte maatregelen zijn mogelijk

Waar mogelijk moeten maatregelen risicogericht worden genomen, dat wil zeggen op die plaatsen waar de grootste gezondheidswinst behaald kan worden. Om de kans op overdracht van de veterinaire naar de medische sector te verminderen moet het gebruik van essentiële antibiotica die in het medische domein worden gebruikt, de zogenoemde kritische antibiotica, in het veterinaire domein worden gemeden. Eventueel noodzakelijke toepassing moet aan strikte voorwaarden worden gebonden, zeker als deze middelen bestemd zijn voor koppelbehandelingen. Voorbeelden van kritische antibiotica zijn cephalosporines en fluoroquinolonen. De verkoop van derde en vierde generatie cephalosporines voor veterinaire gebruik is door een restrictief beleid in 5 jaar tijd afgenomen met 92% tot 0,03% van de totale jaarlijkse verkoop van veterinaire antibiotica. De verkoop van fluoroquinolonen nam in die periode af met ruim 50% tot ongeveer 1% van het totaal. Met name het gebruik van de kritische fluoroquinolonen zou nog verder teruggedrongen moeten worden.

Lange termijn onderzoek

Een centrale rol in de monitoring van antibioticaresistentie in de humane gezondheidszorg wordt vervuld door het RIVM-CIb en door het CVI (Centraal Veterinair Instituut) voor de landbouwsector. Deze werkzaamheden worden uitgevoerd in opdracht van de ministeries van EZ en VWS en vormen de basis voor het jaarlijks Nethmap/MARAN rapport waarin de staat van antibiotica resistentie in Nederland voor de beide sectoren, humaan en landbouw, wordt beschreven en de trends over de jaren worden geanalyseerd. Het RIVM-CIb doet eveneens onderzoek dat relevant is voor de beoordeling van de risico's van ESBL's en andere vormen van resistentie die vanuit de landbouw op de humane bevolking kunnen worden overgedragen. De verbinding met het onderzoek naar resistentie in de humane gezondheidszorg wordt vanuit dit perspectief gelegd. Beide instituten vervullen belangrijke rollen in de Europese en wereldwijde samenwerkingverbanden om de verspreiding van resistentie tegen te gaan. Door de aanwezige deskundigheid heeft Nederland grote invloed op het denken over deze problematiek, niet alleen binnen de EU, maar ook daarbuiten.

De NVWA verzorgt de monitoring van microorganismen op levensmiddelen door middel van een gericht bemonsteringsprogramma. Een willekeurige selectie van meer dan 2000 monsters uit dit reguliere onderzoek wordt op resistentie getest. Monsters van feces van varkens uit de surveillance zoonoseverwekkers landbouwhuisdieren worden ook onderzocht op resistentiepatronen. Daarnaast worden vleeskuikenbedrijven in samenwerking met het RIVM-CIb bemonsterd, mede met het doel transmissieroutes vast te stellen. Een gezamenlijk project van CVI en NVWA onderzoekt jaarlijks 100 koppels kippen en kalveren en 100 melkkoeien op ESBL en MRSA.



Verscheidene aspecten van de ESBL problematiek worden door een verscheidenheid aan projecten onderzocht. De bruikbaarheid van koppelpaspoorten voor vleeskuikens, resistentie in kalverhouderijen, introductie van ESBL in pluimveebedrijven en ESBL en MRSA in de bodem zijn voorbeelden van dit soort onderzoek. Al met al loopt er een groot aantal projecten rondom antibiotica resistentie en ESBL's in het bijzonder, niet alleen in Nederland, maar in de gehele EU.

Kennishiaten

De antwoorden op twee hoofdvragen zijn essentieel om een effectief en goed onderbouwd beleid ten aanzien van antibiotica resistentie in de landbouw mogelijk te maken:

- 1) Wat is de ziektelast die veroorzaakt wordt in de humane gezondheidszorg door resistentie die van origine is geselecteerd in de landbouw?
- 2) Op welke wijze kan het niveau van resistentie in de landbouw worden verminderd en hoe kan de overdracht van resistentie uit de landbouw naar de humane sector worden voorkomen?

Het beantwoorden van ieder van deze twee vragen vergt flinke onderzoeksprogramma's die meerdere deelvragen adresseren. Het in 2013 begonnen topsectoren onderzoek ESBL richt zich in het bijzonder op deze twee vragen met betrekking tot deze microorganismen. Delen van deze vragen werden al onderzocht in de verschillende programma's in opdracht van de overheid bij het RIVM (5, 9 en 10) die reeds lopen. Het is raadzaam te streven naar een mate van compleetheid die kwantitatieve beantwoording mogelijk maakt, zodat eventuele maatregelen op te verwachten effectiviteit kunnen worden getoetst. Het ontwikkelen van een overkoepelende visie op grond van de uitkomsten van de deelonderzoeken is hierbij essentieel.

Ondanks de grote hoeveelheid wetenschappelijk bewijs dat een verband tussen beide sectoren onderbouwt, is de opvatting dat gebruik van antibiotica in de landbouw bijdraagt aan resistentie van humaan pathogenen nog steeds niet alom aanvaard (Mole, 2013). De reden hiervoor is dat losstaande bevindingen, zoals bijvoorbeeld dat bepaalde ESBL genen eerst alleen in pluimvee bacteriën werden gevonden en later steeds vaker in humane isolaten, niet als overtuigend bewijs werden beschouwd. Daarom is lang twijfel blijven bestaan over een oorzakelijke relatie tussen blootstelling aan antibiotica van microorganismen in de landbouw en de verspreiding van resistentie in de humaan pathogenen. Direct bewijs is vrijwel onmogelijk te verkrijgen, omdat daarvoor bij wijze van spreken een individuele bacterie gevolgd zou moeten worden in de voedselketen. Een experiment waarin een indicatororganisme door de gehele keten gevuld wordt zou sluitend bewijs kunnen opleveren. De totale hoeveelheid indirect bewijs is echter dermate overweldigend dat in het oordeel van BuRO vaststaat dat resistentie waarvoor geselecteerd is in de landbouw bijdraagt aan de resistentie binnen de humane gezondheidszorg. De vraag is echter in welke mate. Het bovenstaande maakt duidelijk dat de resistentie vorming en de daaropvolgende overdracht van resistentie van de landbouw naar de humane sector onder de noemer voedselveiligheid vallen. Daarbij is voedsel niet de enige overdrachtsroute. Overdracht kan ook plaatsvinden via het milieu, direct contact, mest of andere wijzen.

De eerste hoofdvraag omvat een aantal deelvragen:

- Welk percentage microorganismen is resistent tegen welke antibiotica, met uitzondering van intrinsieke resistentie? Deze vraag wordt grotendeels beantwoord door het huidige monitoringsprogramma.



Bureau Risicobeoordeling & onderzoeksprogrammering

Datum

6 november 2013

Onze referentie

NVWA/BuRO/2013/11268

- Wat is de trend in de tijd van het voorkomen van specifieke landbouwgerelateerde stammen in de humane sector?
- Wat zijn de blootstellingsroutes van de humane bevolking aan landbouwgerelateerde resistentie?
- Hoeveel van de blootstelling is te wijten aan resistente zoönosen en hoeveel aan overdracht van commensalen op humaan pathogenen?
- Welke microorganismen en welke genen en plasmiden zijn kwantitatief het meest van belang voor de blootstelling van de humane gezondheidszorg aan in de landbouw geselecteerde resistentie?

Om de bijdrage van selectie in de landbouw aan de ontwikkeling van resistentie van humaan pathogenen te kunnen kwantificeren zal voornamelijk onderzoek van epidemiologische aard uitgevoerd moeten worden. Cruciaal daarvoor is een zeer goede monitoring over de jaren in beide sectoren van zowel de resistentie als genen en de plasmiden die daaraan te grondslag liggen. In Nederland is deze monitoring zowel humaan (bijvoorbeeld Nethmap, 2013) als agrarisch (MARAN, 2013) van een bijzonder hoog niveau. Binnen de EU, met name de EFSA, wordt Nederland, samen met Denemarken, vaak aangehaald als voorbeeld van optimale monitoring van resistentieontwikkeling in de landbouw. De analyse van de resistentie en de genen en bacteriën die daarbij betrokken zijn die nodig is voor het kwantitatief vaststellen van de overdracht over de jaren heen is echter tot nu toe nog zelden uitgevoerd. Dit soort onderzoek mag conceptueel simpel lijken, in werkelijkheid is een zeer gedetailleerde en arbeidsintensieve bestudering van alle gegevens vereist.

In het kader van de topsectoren Poultry4Food (P4F) en 1Health4Food (1H4F) zijn onderzoeksprogramma's opgesteld gericht op de ESBL en MRSA problematiek. Dit zijn aanvullingen op het lopende onderzoek dat al door de overheid en de NVWA gefinancierd wordt, zoals programma's 5, 9 en 10 van het RIVM. Het onderzoek van het 1H4F programma zal de bijdrage van ESBL vanuit de dierlijke productieketens aan de humane blootstelling kwantificeren. Daarbij zal het belang van de verschillende transmissie routes worden vastgesteld en tevens welke reductie van de blootstelling van de humane populatie mag worden verwacht bij het uitvoeren van maatregelen in de landbouwsector. Deze interventie-strategieën zullen worden uitgewerkt in nauwe samenwerking met het P4F programma. In de praktijk toepasbare interventies zullen aan de pluimveehouders worden gepresenteerd. Vergelijkbaar onderzoek voor het onderbouwen van maatregelen in de varkens- en kalverssectoren is gewenst. Naar de verspreiding van MRSA vanuit de landbouw is in het verleden veel onderzoek gedaan en er is sindsdien genoeg kennis over dit specifieke microorganisme om beleid op te kunnen baseren.

Naast een kwantitatieve correlatie moeten de routes waarlangs de microorganismen vanaf de boerderij de bevolking bereiken worden vastgesteld. Deze route is niet alleen via levensmiddelen. Naast het 1H4F programma voert het RIVM-CIB in opdracht van de NVWA tevens ander onderzoek uit naar interventiemogelijkheden om overdracht van ESBL's te voorkomen. Het RIVM heeft aangetoond dat *Campylobacter* ook via andere wegen dan voedsel de bevolking in de omgeving bereikt (Friesema et al., 2012). Op dit moment loopt er een onderzoek bij het RIVM naar de overdracht van ESBL's dragende *E. coli* en *Campylobacter* vanaf een tweetal boerderijen naar de omgeving. De resultaten tot nu toe geven aan dat deze overdracht inderdaad meetbaar is, maar zelfs bij voltooiing volgens de opzet, blijven er nog veel vragen over voordat een algemene conclusie kan worden getrokken die geldig is voor meerdere bacteriesoorten. Wat ook door de gecombineerde programma's waarschijnlijk niet



bereikt zal worden is de kwantificatie van de stromen van resistentie(genen) van de landbouw naar microbiota van de humane bevolking.

Het antwoord op de eerste hoofdvraag is echter niet alleen het percentage van de resistentie aangetroffen in humane pathogenen dat van origine in de landbouw geselecteerd is. Daarnaast is ook de aard van de resistentie die vanuit de landbouw de humane gezondheidszorg bedreigt van belang. Goed gedocumenteerd zal moeten worden tegen welke antibiotica resistentie wordt overgedragen, welke genen daarvoor coderen en welke plasmiden daarbij betrokken zijn. Het effect van generieke maatregelen zal op den duur zeker bijdragen aan een geleidelijke vermindering van de antimicrobiële resistentie in de agrarische sector. Deze vermindering is echter geen 1-op-1 relatie en wordt onder andere tegengewerkt door het feit dat de genen die coderen voor resistentie tegen meerdere antibiotica gelegen zijn op plasmiden die via conjugatie kunnen worden uitgewisseld. Restrictie van het gebruik van een bepaald antibioticum leidt hierdoor niet zo snel als verwacht tot afname van resistentie zolang blootstelling aan bepaalde andere antibiotica plaatsvindt. In opdracht van de NVWA wordt daarom onderzocht welke factoren de overdracht van resistentieplasmiden beïnvloeden.

Om een handelingsperspectief te bieden kan de tweede hoofdvraag ook worden geformuleerd als: welke wijzen van gebruik selecteren het meest en welke het minst voor resistentie en onder welke omstandigheden worden resistentiegenen het vaakst overgedragen? Om deze vraag te beantwoorden moet de fysiologische en genetische reactie van microorganismen op blootstelling aan antibiotica in kaart worden gebracht. Onafhankelijk van het mechanisme van resistentie, kan het verwerven daarvan in principe op drie wijzen gebeuren:

- A) Door aanpassing van cellulaire structuren en processen, zonder DNA mutatie, zoals het omvormen van pompen die het zoutgehalte en pH van de cel reguleren tot effluxpompen voor antibiotica of het omzeilen van geblokkeerde metabole loopbanen. Een voorbeeld hiervan is de geïnduceerde resistentie tegen antibiotica uit de penicilline groep.
- B) Door omvormen van de eiwitten die het doel vormen van de antibiotica door middel van mutaties in het DNA. Een veelvoorkomend voorbeeld hiervan is het verwerven van resistentie tegen fluoroquinolonen door mutaties in eiwitten die essentieel zijn in de DNA replicatie en die in de originele vorm door deze groep van antibiotica effectief geblokkeerd worden.
- C) Door overdracht van resistentiegenen. In de landbouw worden vaak microorganismen geselecteerd die een "resistome" (Perry and Wright, 2013) bevatten met resistentiegenen tegen veelgebruikte antibiotica zoals tetracycline. De ESBL's en MRSA zijn hiervan ook voorbeelden. Deze genen kunnen vervolgens op andere bacteriën, waaronder humane pathogenen worden overgedragen. Resistentiegenen hoeven overigens niet op plasmiden te liggen om te kunnen worden overgedragen. Chromosomale genen kunnen ook worden uitgewisseld, zij het met lagere frequentie.

Alle drie deze vormen lijken voor te komen in de relevante bacteriën. De eerste twee worden wel als "de novo" aangeduid, worden niet uitgewisseld tussen bacteriën en verspreiden zich daarom via klonale uitgroei. Hoeveel ieder van deze mechanismen aan de totale resistentievorming bijdraagt valt niet te zeggen, maar het geeft wel aan dat de situatie complex is en dat daarom maatregelen die zich



Bureau Risicobeoordeling & onderzoeksprogrammering

Datum
6 november 2013

Onze referentie
NVWA/BuRO/2013/11268

op één aspect richten maar zeer gedeeltelijk succesvol zullen zijn. De verspreiding van resistentie die genetisch gecodeerd is, kan zowel door klonale uitgroei als door horizontale gen-uitwisseling plaatsvinden. Het feit dat de resistentie van de ESBL's en de MRSA via plasmiden kan worden doorgegeven betekent niet dat alleen overdracht op die manier tegen gegaan moet worden. De andere vormen van resistentie die dan de kop kunnen opsteken hebben eenzelfde potentieel om medische problemen te veroorzaken.

Eén van de conclusies die uit de verschillende onderzoeken die in opdracht van de NVWA en haar voorgangers zijn uitgevoerd is dat de blootstelling aan niet letale concentraties van antibiotica in het bijzonder het risico op de ontwikkeling van resistentie met zich meebrengt (Van der Horst et al., 2011, 2013; Händel et al., 2013). Daarnaast is gebleken dat langdurige blootstelling de verspreiding van resistentie bevordert. In de landbouw zal een therapeutische behandeling bij voorkeur kort en met een hoge dosis zijn, maar voor profylactisch gebruik ligt een langdurige lage dosis meer voor de hand. Op grond het nu bekende onderzoek zou geconcludeerd kunnen worden dat, als er al antibiotica toegepast moeten worden, dit het beste kortdurig en bij hoge concentraties zou kunnen gebeuren. Een dergelijke conclusie is echter nog niet voldoende onderbouwd en nader onderzoek op dit terrein is daarom gewenst.

De veronderstelling is lang geweest dat resistentie kosten voor de bacterie met zich mee zou brengen in de vorm van een minder efficiënt metabolisme. Recent onderzoek in opdracht van de NVWA (Handel et al., 2013) suggereert dat deze kosten ook kunnen bestaan uit een kleiner ecologisch bereik, omdat de cel meer moeite heeft de interne condities te beheersen bij veranderingen in het milieu. Als die gevolgtrekking algemeen geldig zou blijken, dan zou dat nieuwe mogelijkheden scheppen voor het tegengaan van de verspreiding van resistentie. Bijvoorbeeld, in theorie zou reinigen van een kippenstal tussen koppels met behulp van een licht aangezuurde zoutoplossing de resistente varianten kunnen uitspoelen en de gevoelige ongemoeid laten. Nader onderzoek zal moeten aantonen of dit in principe uitvoerbaar is en zo ja, welke wijze optimaal is.

Samenvattend kan gesteld worden dat het antwoord op de tweede vraag ligt in onderzoek naar de gevolgen van blootstelling aan antibiotica voor de ontwikkeling van resistentie en de overdracht van plasmiden. De lijnen van onderzoek die in het topsectoren project ESBL voorzien zijn, zullen in belangrijke mate deze vraag kunnen beantwoorden.



Bureau Risicobeoordeling & onderzoeksprogrammering

Datum
6 november 2013

Onze referentie
NVWA/BuRO/2013/11268

Conclusies

Resistente bacteriën uit de landbouw kunnen langs verschillende routes de mens bereiken: via levensmiddelen, via het milieu of via blootgestelde werkers bij veehouderijen, slachterijen of veetransportbedrijven. De bijdrage van de verschillende routes is niet kwantitatief bekend. Er is eveneens een gebrek aan inzicht over hoe de ontwikkeling van en selectie voor resistentie in de landbouw kan worden tegen gegaan door optimale doseringsregimes. De antwoorden op beide vragen kunnen worden gebruikt om een effectief antibiotica beleid te formuleren. Het is echter niet raadzaam het te ontwikkelen beleid alleen op ESBL's en MRSA te concentreren, omdat dan vergelijkbare problemen met andere combinaties van microorganismen en antibiotica verwacht moeten worden.

Paraaf

Dr. Antoon Opperhuizen
Directeur bureau Risicobeoordeling & onderzoeksprogrammering



Referenties

H. Blaak | F.M. Schets | R. Italiaander | H. Schmitt | A.M. de Roda Husman 2010 Antibioticaresistente bacteriën in Nederlands oppervlaktewater in veeteeltgebied RIVM Rapport 703719031/2010

P. L. Geenen, E. A.M. Graat, A. Haenen, P. D. Hengeveld, A. H. A. M. Van Hoek, X.W. Huijsdens, C. C. Kappert, G. A. C. Lammers, E. Van Duijkeren, A.W. Van De Giessen 2013 Prevalence of livestock-associated MRSA on Dutch broiler farms and in people living and/or working on these farms *Epidemiol. Infect.* 141, 1099–1108

Friesema IH, Havelaar AH, Westra PP, Wagenaar JA, van Pelt W. 2012 Poultry culling and *Campylobacteriosis* reduction among humans, the Netherlands. *Emerg Infect Dis.* 18:466-8.

N. Händel, J. M. Schuurmans, S. Brul, B.H. ter Kuile 2013 Compensation of the Metabolic Costs of Antibiotic Resistance by Physiological Adaptation in *Escherichia coli* *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 57: 3752–3762

P. M. C. Huijbers, M. de Kraker, E. A. M. Graat, A. H. A. M. van Hoek, M. G. van Santen, M. C. M. de Jong, E. van Duijkeren and S. C. de Greeff 2013 Prevalence of extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in humans living in municipalities with high and low broiler density *Clin Microbiol Infect*; 19: E256–E259

Köck R, Becker K, Cookson B, van Gemert-Pijnen JE, Harbarth S, Kluytmans J, Mielke M, Peters G, Skov RL, Struelens MJ, Tacconelli E, Navarro Torné A, Witte W, Friedrich AW. 2010 Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): burden of disease and control challenges in Europe. *Euro Surveill.*;15(41):pii=19688.

B.Y. Lee, A. Singh, M.Z. David, S.M. Bartsch, R.B. Slayton, S.S. Huang, S. M. Zimmer, M.A. Potter, C.M. Macal, D.S. Lauderdale, L.G. Miller and R.S. Daum 2012 The economic burden of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA) *Clin Microbiol Infect* 2012; 19: 528–536

M. A. Leverstein-van Hall, C. M. Dierikx, J. Cohen Stuart, G. M. Voets, M. P. van den Munckhof, A. van Essen-Zandbergen, T. Platteel, A. C. Fluit, N. van de Sande-Bruinsma, J. Scharinga, M. J. M. Bonten and D. J. Mevius 2011 Dutch patients, retail chicken meat and poultry share the same ESBL genes, plasmids and strains *Clin Microbiol Infect*; 17: 873–880

D.M. Livermore 2012 Current Epidemiology and Growing Resistance of Gram-Negative Pathogens *Korean J Intern Med*;27:128-142



Bureau Risicobeoordeling & onderzoeksprogrammering

Datum
6 november 2013

Onze referentie
NWWA/BuRO/2013/11268

Maragakis, L.L., E.N. Perencevich, and S.E. Cosgrove. 2008. Clinical and economic burden of antimicrobial resistance. *Expert. Rev. Anti. Infect. Ther.* 6:751-763.

Mole, 2013 Farming up trouble *Nature* 499: 398-400

D.J. Mevius, B. Wit and W. van Pelt 2013 Maran 2013
http://www.rivm.nl/dsresource?objectid=rivmp:210067&type=org&disposition=inline&ns_nc=1

J.A. Perry and G.D. Wright 2013 The antibioticresistance "mobilome": searching for the link between environment and clinic *Frontiers in Microbiology* doi: 10.3389/fmicb.2013.00138

J.L. Siefert 2009 Defining the Mobilome *Methods in Molecular Biology* Volume 532, 2009, pp 13-27

Slama, T.G. 2008. Gram-negative antibiotic resistance: there is a price to pay. *Crit. Care* 12 Suppl 4:S4.

E. Tacconelli*, G. De Angelis, M. A. Cataldo, E. Pozzi and R. Cauda, 2008 Does antibiotic exposure increase the risk of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolation? A systematic review and meta-analysis *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 61, 26-38

M. Tumbarello, T. Spanu, R. Di Bidino, M. Marchetti, M. Ruggeri, E.M. Trecarichi, G. De Pascale, E.M. Proli, R. Cauda, A. Cicchetti, and G. Fadda 2010 Costs of Bloodstream Infections Caused by *Escherichia coli* and Influence of Extended-Spectrum-Lactamase Production and Inadequate Initial Antibiotic Therapy *ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY*, 54: 4085-4091

M.A. van der Horst, J.M. Schuurmans, M.C. Smid, B.B. Koenders, and B.H. ter Kuile 2011 De Novo Acquisition of Resistance to Three Antibiotics by *Escherichia coli* *MICROBIAL DRUG RESISTANCE* 17: 141-7

M.A. van der Horst, T.H. Fabri, J.M. Schuurmans, B.B. Koenders, S. Brul and B.H. ter Kuile 2013 Effects of Therapeutical and Reduced Levels of Antibiotics on the Fraction of Antibiotic-Resistant Strains of *Escherichia coli* in the Chicken Gut *FOODBORNE PATHOGENS AND DISEASE* 10: 55-61