

**BO-20-016-006 Surveillance Carbapenemase Producterende Enterobacteriaceae (CPE)**

**Projectleider / Project leader:** Mevius, Dik (meviu001) Centraal Veterinair Instituut  
**Financiële looptijd / Financial term:** 01-jan-2014 / 31-dec-2014  
**Beschikbaar budget** 157300 (incl. BTW), 157300 (excl BTW)

**1. Doelstelling / Objective****1.1 Aanleiding / Relevantie project voor EZ / Relevance for EZ****1.2 Probleemstelling / Problem Definition**

Carbapenemases zijn beta-lactamasen die de laatste generatie beta-lactam antibiotica, de carbapenems (ertapenem, imipenem, meropenem), inactiveren. De meest belangrijke Carbapenemases (CP) bij Enterobacteriaceae zijn: KPC (Klebsiella pneumoniae carbapenemase) en NDM (New Delhi metallo-beta-lactamase), OXA-48 (die voorkwam in het Maasstad Ziekenhuis), VIM (ook in Pseudomonas aeruginosa) en IMP. Omdat stammen die CPs bevatten meestal ook ESBL-positief zijn, zijn er nog weinig therapeutische opties over. Die beperken zich veelal tot amikacine, tigecycline en colistine. CPs zoals hierboven beschreven zijn gelegen op plasmiden en daardoor gemakkelijk uitwisselbaar tussen bacteriën. Hoewel de mate waarin dit gebeurt varieert per gen en per bacteriële gastheer. In landbouwhuisdieren en gezelschapsdieren zijn een aantal recente rapportages over het voorkomen van CP. In Duitsland zijn deze gevonden in varkens en kippen en recent in het JAC beschreven door Jennie Fischer van het Bundesinstitut für Risikobewertung in Berlijn.[1, 2] Dit betrof een VIM-1 gen in combinatie met een ACC-1 AmpC-type beta-lactamase. Ook in Duitsland is in 2013 OXA-48 gevonden in een gezelschapsdieren kliniek in Hessen.[3] Dit betreft een langdurige besmetting in deze kliniek met typische "ziekenhuis"-infecties door E. coli en Klebsiella. Een beeld wat sterk overeenkwam met de epidemiologie in het Maasstad Ziekenhuis. Ook deze stammen waren CP en ESBL-positief. In China is het voorkomen van NDM-1 in Acinetobacter spp. in voedselproducerende dieren beschreven.[4, 5] Daarnaast is recent een review artikel verschenen die het voorkomen van CP in niet-humane bronnen en het milieu beschrijft.[6] Eind 2013 heeft de EFSA een wetenschappelijk rapport gepubliceerd over carbapenemases in het ecosysteem van voedselproducerende dieren. [7] In zowel het review artikel als in het EFSA rapport wordt geadviseerd om een actief surveillance programma op CP in dieren uit te voeren en inperkende maatregelen te nemen indien er CP gevonden wordt.

**1.3 Doelstelling(en) van het project / Objective(s) of the Project**

Het doen van een actieve surveillance van CPE in landbouwhuisdieren. Verdacht positieve isolaten worden moleculair gekarakteriseerd (gen/plasmide/stam) en gemeld aan EZ/NVWA/Cib.

**1.4 Doelgroep(en) / Target Group(s)**

Ministerie van EZ, VWS, NVWA, Cib

**2 Werkplan /Workplan****2.1 Aanpak en tijdsplan / Approach and time schedule**

Actieve surveillance doen op CP in dieren gericht op risicogroepen [7]. Dit betreft: Doorgaan met bestaande surveillance bij de intensieve veehouderij in 2014. Er worden in 2014 door de NVWA 1600 faecesmonsters uit legkippen, vleeskuikens, vleeskalveren melkkoeien, en vleesvarkens verzameld ten behoeve van het AMR monitoringsprogramma.

Deze monsters worden allen geënt in een niet-selectieve ophopingsbouillon (TSB) en overnacht bebroed bij 37°C

Uit de pellet wordt met RT-PCR onderzocht of er carbapenemase genen aanwezig zijn.

Positieve monsters worden bevestigd met CT102 array, PCR en sequentie analyse

Bij een PCR positief monster wordt vanuit de bouilloncultuur worden twee commerciële platen beënt, t.w.: ChromID Carba en ChromID OXA-48.

Vanaf deze media worden isolaten met verschillende koloniemorfologie onderzocht:

Speciestypering met MaldiToF

Confirmatie van CP-genen met PCR

Conjugatie en transformatie van plasmiden

MIC bepaling van parent stam en transconjuganten/transformanten

Plasmid karakterisering, zoals:

PBRT, en eventueel subtypering (pMLST )

Grootte door PFGE van S1 nuclease digesten

conjugeerbaarheid

#### Passieve surveillance

Alle *E. coli* en *Salmonella* bacteriën worden vanaf 1 januari 2014 zowel door de NVWA als het CVI onderzocht op gevoeligheid voor een carbapenem. Dit gebeurt omdat standaard in het Sensititre panel wat pan-Europees voor resistentie monitoring wordt gebruikt, een carbapenem is opgenomen (meropenem). Alle isolaten met verminderde gevoeligheid zullen met moleculaire technieken worden geconfirmeerd als zijnde CPE, waarbij het gen en de locatie van het gen worden bevestigd. Dit geeft geen volledige dekking omdat OXA-48 hiermee gemist kan worden.

#### ESBLs

Alle ESBL-verdachte isolaten komend uit lopende (actieve en passieve) surveillance worden fenotypisch gescreend op het voorkomen van carbapenemases met het 2<sup>e</sup> Sensititre panel (EUVSEC2), met waarin verschillende beta-lactam antibiotica en carbapenems (of de gevoeligheid voor carbapenems wordt getest met disk diffusie). Alle isolaten met verminderde gevoeligheid zullen eveneens met moleculaire technieken worden geconfirmeerd als zijnde CPE, waarbij het gen en de locatie van het gen worden bevestigd. Alle ESBL-verdachte isolaten worden met de micro-array (Identibac/Clondiag) gescreend op voorkomende beta-lactamase genen. Hoewel het BO project gericht op ESBL en MRSA surveillance eind 2013 is afgesloten worden als onderdeel van de routinebewaking van het voorkomen van ESBLs, alle monsters onderzocht op het voorkomen daarvan. In 2014 is er geen separaat budget om in deze isolaten de ESBL-genen te karakteriseren. Relevante genen die mbv de screening worden gevonden worden gericht gesequenced.

#### 2.2 Producten (incl. verwachte oplevering)/Products (including expected completion)

- voorkomen van CPE in monsters van landbouwhuisdieren
- genetische karakteristieken van ESBLs en CP in landbouwhuisdieren

#### 2.3 Kennisverspreiding naar de doelgroepen / Dissemination

Openbaar rapportage in MARAN-rapporten en in separate publicaties en presentaties.

### 3. Realisatie (toelichting behaalde resultaten) / Realisation (Explanation achieved Results)

#### 3.1 Resultaten en doorwerking / Results and Opportunities

Informatie over de mate en aard van het voorkomen van CP in dieren conform de hieronder beschreven case definities

Carbapenemases zijn in allerlei organismen beschreven. Omdat er veelal een gastheerspecificiteit bestaat van bepaalde bacteriespecies of bacteriestammen, wat betekent dat bacteriën die in dieren voorkomen meestal meer aan dieren zijn aangepast en minder affiniteit hebben voor de mens, is het van belang om de maatregelen vooral op overdraagbare carbapenemase genen te richten. Indien carbapenemase-genen chromosomaal gelegen zijn kan het een reden voor maatregelen zijn indien het zoönotische voedselpathogenen betreft.

Als case definitie geldt dus in volgorde van belangrijkheid:

1. Een plasmidaal-gecodeerd carbapenemase-gen in een bacterie behorende tot de Enterobacteriaceae familie
2. Een chromosomaal-gecodeerd carbapenemase-gen in een voedselpathogeen zoals *Salmonella enterica*
3. Een overdraagbaar carbapenemase-gen in overige bacterie species (zoals bv. *Acinetobacter*, *Pseudomonas*). In deze species zijn CP's beschreven op plasmiden, transposons en insertiesequenties. Dat zijn mobiele elementen van waaruit overdracht naar andere bacteriën kan plaatsvinden.
4. Een plasmidaal-gecodeerd CP-gen in een milieu organisme

Chromosomaal-gecodeerde carbapenemase-genen in milieuorganismen zoals *Shewanella* spp. zijn van nature in waterig milieu aanwezig en vormen geen risico voor de mens.

---

### 3.2 Inhoudelijk / Content

#### CPE's in 2013

In 2013 zijn t.b.v. de actieve carbapenemase surveillance van 1544 fecale monsters van vleeskuiken (N = 401), biologische kippen (N= 207), vleesvarkens (N = 303), vleeskalveren (N= 333) en melkkoeien (N = 300) onderzocht op de aanwezigheid van carbapenemase producerende Enterobacteriaceae (CPE) met een commerciële RT-PCR. Hierbij werden drie monster met een positief signaal gevonden. Het betrof 1 monster van een kip en 2 van vleesvarkens (afkomstig van 2 verschillende bedrijven). Uit de aanvullend analyses (PCR and sequentie analyse) bleek dat het in alle gevallen OXA-48-like genen betrof. Helaas kon in geen van de monsters, via kweek, de aanwezigheid van een carbapenemase-producerende bacterie worden aangetoond. Echter, uit literatuuronderzoek bleek dat deze specifieke varianten van het OXA-48 gen regelmatig voorkomen op het chromosoom van *Shewanella* bacterien. Dit type bacterie komt in het milieu voor. Om deze reden werden deze resultaten als irrelevant beschouwd. Overigens werd begin 2014 alle 3 CPE-verdachte bedrijven bezocht en herbemonsterd (20 monsters per bedrijf). Hierin zijn geen carbapenemase producerende bacteriën zijn aangetoond.

In 2013 zijn t.b.v. van de passieve carbapenemase surveillance alle ESBL-verdachte *E. coli* en *Salmonella* gescreend met de disk diffusietest, waarbij de gevoeligheid voor 3 carbapenem antibiotica is getest (meropenem, imipenem en ertapenem. Hierbij zijn geen carbapenemase-verdachte bacteriën gevonden.

#### CPE's in 2014

In 2014 zijn t.b.v. de actieve carbapenemase surveillance in totaal 1601 fecale monsters van vleeskuiken (N = 400), leghennen (N= 200) vleesvarkens (N = 400), vleeskalveren (N= 301) en melkkoeien (N = 300) onderzocht op de aanwezigheid van carbapenemase producerende Enterobacteriaceae (CPE) met een commerciële RT-PCR. Hierbij werd één monster met een positief signaal gevonden. Het betrof een varkensmonster, waarin met klassieke PCR en sequentie analyse, een OXA-48-like gen werd aangetoond (OXA-199). Het positieve PCR resultaat van het monster werd bevestigd met een positieve kweek van *Shewanella* spp., waarin de aanwezigheid van het OXA-199 gen kon worden aangetoond. Net als in 2013 wordt dit resultaat als irrelevant beschouwd voor de verspreiding van carbapenemases bij dieren en mensen.

T.b.v. de passieve carbapenemase surveillance zijn in 2014 505 ESBL-verdachte *E. coli* en 34 ESBL-verdachte *Salmonella* fenotypisch gescreend op carbapenemase resistentie (verminderde gevoeligheid). Uit de aanvullende gevoeligheidstesten bleek dat alle ESBL-producerende isolaten gevoelig waren voor carbapenems.

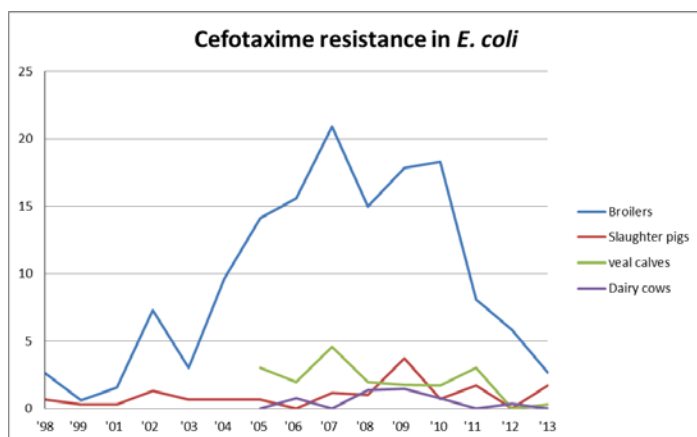
Daarnaast is van alle *E. coli* (N = 4) en *Salmonella* (N = 163) isolaten uit de reguliere monitoring waarbij een meropenem MIC werd gevonden die groter was dan 0,06 mg/L (range: 0,12 – 0,25 mg/L) een extra disk diffusietest ingezet met 3 carbapenems (meropenem, imipenem en ertapenem) om te controleren op aanwijzingen voor carbapenemase activiteit. Uit deze screening zijn geen verdachte carbapenemase-producerende bacterien gekomen.

**ESBL's 2013 (passieve surveillance), bron: MARAN 2014**

Sinds 1998 werd verminderde cefotaxime gevoeligheid, indicatief voor ESBL/AmpCs, op een laag niveau gezien in *E. coli* van alle diersoorten. In vleeskuikens werd na 2001 en vooral na 2003 een toename waargenomen tot niveaus die varieerden van 15-20%. De prevalentie daalde vanaf 2010 tot 2,7% in 2013 (zie Figuur 1). Dit is waarschijnlijk het gevolg van het verminderde gebruik van antibiotica bij vleeskuikens en het feit dat sinds het voorjaar van 2010 er geen of label gebruik van ceftiofur meer plaatsvond op Nederlandse broederijen.

**Trends in cefotaxime resistentie**

Figuur 1. Trends in cefotaxime resistentie (%) van *E. coli* uit darminhoud van vleeskuikens, vleesvarkens, vleeskalveren en melkkoeien


**ESBL typering**

CTX-M-1 werd in al die jaren voornamelijk gevonden. CTX-M-9 en TEM-20 (beide gevonden in *E. coli* van vleeskuikens) werden slechts sporadisch gevonden en lijken geen te spelen een rol bij de verspreiding van ESBLs in voedselproducerende dieren. Aan de andere kant, werden jaarlijks (en in 2013) naast CTX-M-1 ook frequent TEM-52, SHV-12 en CMY-2 gevonden. Dit suggereert een succesvolle verspreiding van deze resistentiegenen onder voedselproducerende dieren (zie Tabel 1).

Tabel 1. ESBL-genen in *E. coli* isolates met verminderde gevoeligheid voor cefotaxime uit vleeskuikens, kalkoenen (alleen 2011 en 2012), vleesvarkens, vleeskalveren en melkkoeien in de periode 2007-2013.

Year	ESBLs isolated from					Total ESBL suspected (n)	ESBL-genes detected										Total <i>E.coli</i> (n)	% ESBL of total <i>E. coli</i>
	Broiler	Veal calves	Slaughter pigs	Dairy cows	Turkey		CTX-M-1-group#	CTX-M-2	CTX-M-9	TEM-52c	TEM-20	SHV-12*	SHV-2	CMY-2	chromosomal ampC	no gene found		
2007	9	6	2			17	3	1	3				1	2	7	539	3,2	
2008	66	4	3	2		75	38	5	1	9		2	12	3	5	1026	7,3	
2009	53	2	11	2		68	34	7		2	1	8	1	12	3	894	7,6	
2010	52	3	2	2		59	21	6		5	1	9	4	5	3	1002	5,9	
2011	23	5	5		6	39	9			8		9	2	3	3	1096	3,6	
2012	26	2		1		29	8			4		8		5	4	1328	2,2	
2013	13	1	4			18	7			4		3		3	1	1371	1,3	
<b>Total</b>	<b>242</b>	<b>23</b>	<b>27</b>	<b>7</b>	<b>6</b>	<b>305</b>	<b>120</b>	<b>19</b>	<b>1</b>	<b>35</b>	<b>2</b>	<b>37</b>	<b>9</b>	<b>41</b>	<b>15</b>			

**ESBL's 2013 (actieve surveillance in dieren)**, bron: MARAN 2014

**ESBL prevalentie:**

In tabel 2 staan de prevalentie cijfers van ESBL-producerende E. coli in slachthuismonsters in 2013, waarbij in 46.1% van de onderzochte batches vleeskalveren en in 57% van de batches vleesvarkens ESBL-producerende E. coli werden gevonden. Het aantal positieve dieren per batch varieerde van 1 positief dier tot alle 10 onderzochte dieren per slacht batch. In d individueel bemonsterde melkkoeien werd in 7% van de monsters ESBL-producerende E. coli gevonden.

Tabel 2. Beta-lactamases gedetecteerd in slachthuis batches van vleeskalveren (N=89), vleesvarkens (N=93) en individuele melkkoeien (N=100) bemonsterd op slachthuizen in Nederland in 2013.

N animal positive	Veal calves		Slaughter pigs			Dairy cows	
	N batches	%	N batches	%		N	%
0	48	53,9	40	43,0	neg.	93	93,0
1	5	5,6	14	15,1	pos.	7	7,0
2	9	10,1	13	14,0			
3	3	3,4	4	4,3			
4	6	6,7	10	10,8			
5	6	6,7	2	2,2			
6	3	3,4	4	4,3			
7	1	1,1	1	1,1			
8	4	4,5	1	1,1			
9	3	3,4	1	1,1			
10	1	1,1	3	3,2			
Total	89		93			100	
Batch prevalence		46,1%		57,0%			Not applicable

**ESBL typering:**

Er werd een grote variatie in beta-lactamase genen aangetoond (zie Tabel 3), waarbij blaCTX-M-1 het meest voorkomende gen was in de onderzochte diersoorten. Naast blaCTX-M-1, was blaCTX-M-14 (beschouwd als een humane variant) het meest predominant. Daarnaast werden andere "humane" varianten gevonden: blaCTX-M-15, -32 and -3. Promotor mutanten van chromosomale ampC-genen werden in alle diersoorten gevonden.

Tabel 3. Beta-lactamases in E. coli van vleeskalveren, vleesvarkens en melkkoeien in 2013 afkomstig uit de actieve surveillance.

		Veal calves	Slaughter pigs	Dairy cows	Total
CTX-M-1 group	CTX-M-1	17	26	1	44
	CTX-M-3	2			2
	CTX-M-15	3			3
	CTX-M-32	2		1	3
CTX-M-2 group	CTX-M-2		2		2
CTX-M-9 group	CTX-M-14	4			4
TEM	TEM-52c		5		5
	CMY-2	3			3
CMY	CMY-79-var		1		1
	Chromosomal ampC-type-3	5	8	1	14
ampC	ampC-type-34		5		5
Total		36	47	3	86

**ESBLs 2013 (actieve surveillance in vlees), bron MARAN 2014**

In tabel 4 staan de prevalentiecijfers van ESBL-verdachte bacterie isolaten in vlees weergegeven en vergeleken met de cijfers uit 2012. Het is heel belangrijk dat er onderscheid wordt gemaakt tussen ESBL-verdacht en bevestigd ESBL-positief. De eerste categorie is gebaseerd op cefotaxime resistentie. Hierdoor zijn bacteriesoorten als *Serratia*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Acinetobacter* en *Hafnia* meegenomen. Deze species zijn intrinsiek resistent en geen ESBL-producenten. Hierdoor was de meerderheid van de ESBL-verdachte isolaten géén ESBL-producent. Om deze reden is het essentieel dat het aanwezige ESBL-gen geconfirmeerd wordt met moleculaire technieken. Uiteindelijk werd in 23% van de vleesproducten daadwerkelijk ESBL/AmpCs aangetoond. Net als in 2012, zien we meer variatie van ESBL/AmpC genen in bacteriën uit rauwe vleesproducten in vergelijking met de fecale monsters samples. Toch blijkt blaCTX-M-1 (zie tabel 5), ook in vlees veruit de meest voorkomende variant. Deze bevinding indiceert dat vlees tijdens het slachtproces worden besmet met ESBLs.

Tabel 4. ESBL-verdachte én ESBL-producerende bacteriën uit rauwe vleesproducten in Nederland in 2013, (prevalentiecijfers (%) zijn vergeleken met 2012)

Animal source	N total	ESBL suspected	tested	ESBL confirmed	% ESBL positive in 2013*	% ESBL positive in 2012
Beef	408	71	71	20	5%	6%
Pork	695	98	98	11	2%	1%
Chicken	728	636	118	112	83%	73%
Turkey	80	37	21	16	35%	29%
Crocodile	10	6	6	4	40%	-
Cangaroo	11	1	1	0	0%	-
Total	1932	849	315	163	23%	21%

Tabel 5. Beta-lactamases in *E. coli* uit rauwe vleesproducte in Nederland in 2013.

	ESBL gen	Poultry	Beef	Pork	Turkey	Crocodile	Total
CTX-M-1 group	CTX-M-1	53	8		3	1	65
	CTX-M-3	2		7			9
	CTX-M-15	2	3		3		8
	CTX-M-55				1		1
	CTX-M-32	2	1	1			4
	CTX-M-32, TEM52cVar			1			1
CTX-M-2 group	CTX-M-2	10	1		3		14
CTX-M-8 group	CTX-M-8	3		1	1		5
CTX-M9 group	CTX-M-9	2					2
	CTX-M-14		3				3
TEM	TEM-52c	10					10
	TEM-52cVar	6			3		9
SHV	SHV-12	16	2	1	2	2	23
	SHV-12, CMY-2	1					1
	SHV-12, TEM-52c	1					1
	SHV-12, SHV-2a, TEM-52c	1					1
CMY-2	CMY-2	3	2			1	6
Total		112	20	11	16	4	163

**ESBLs in 2013 in Salmonella**

In tabel 6 staan de ESBL-types in Salmonella weergegeven die zijn gevonden in de periode 2007 - 2013. Ieder jaar werden ESBL/AmpC genen gevonden blaCMY-2, blaCTX-M-2, blaTEM-52 and the blaCTX-M-1-groep gevonden in diverse Salmonella serovars uit verschillende bronnen. De relatief hoge prevalentie blaCMY-2 positive isolaten (vooral S. Heidelberg) in 2013 kan worden toegeschreven aan de extra bemonstering van import vlees uit Zuid-Amerika. Dit is een belangrijke reden voor de stijging van de ESBL prevalentie in 2013 naar 4%.

Tabel 6. ESBL-genen in Salmonella isolaten met verminderde gevoeligheid voor cefotaxime uit humane bronnen en kip (producten) in de periode 2007-2013.

Year	CTX-M-1-group#	CTX-M-2##	CTX-M-8	CTX-M-9-group*	TEM-52	TEM-20	SHV-12**	CMY-2	ACC-1	Total ESBL	Total <i>Salmonella</i> tested	% ESBL of total <i>Salmonella</i>
2007	9	13			17	2	4	2		47	1514	3,1
2008	25	12	1	1	13	1		6	2	61	2149	2,8
2009	12	4		2	3		1	9		31	2232	1,4
2010	8	3		1	2		3	4		21	1715	1,2
2011	5	3		1	1		2	13		25	1444	1,7
2012	14	5		2	2			10	1	34	1795	1,9
2013	1	3	5	4	5	1		36		55	1369	4,0
Total	74	43	6	11	43	4	10	80	3	274		

#bevat CTX-M-1 (n=59, in alle jaren), CTX-M-55 (n=6, 2008-2010,2012), CTX-M-15 (n=6, 2011-2013 ), CTX-M-3 (n=3 , 2010, 2012).

## in 2008 een combinatie van blaCTX-M-2 met blaTEM-52 in S. Paratyphi B var Java.

\*bevat CTX-M-9 (n=6, 2008-2009, 2012-2013), CTX-M-14 (n=4, 2009-2012) en CTX-M-65 (n=1, 2013).

\*\* In 2007 werden 3 S. Concord isolaten gevonden met zowel blaSHV-12 als blaCTX-M-15.

**ESBLs 2014 (passieve surveillance)**

In 2014 werden tijdens de passieve ESBL surveillance in totaal 15 ESBL-verdachte isolaten gevonden in een collectie van 1519 random geïsoleerde *E. coli*. Het merendeel van de ESBL-verdachte isolaten werd in vleeskuikens aangetroffen (N = 11, = 2,9%). Verder werden er 2 ESBL-verdachte *E. coli* isolaten in monsters van vleesvarkens (0,5%) en 2 isolaten in monsters van vleeskalveren (= 0,7%) gevonden. In leghennen en melkkoeien werden via deze passieve surveillance geen ESBL-verdachte *E. coli* isolaten gevonden. Dit indiceert een lage prevalentie van ESBLs in deze diersoorten.

Uit de voorlopige cijfers van de in totaal onderzochte *Salmonella*, blijkt 2% cefotaxime resistent te zijn en daarmee ESBL-verdacht. De geschatte prevalentie van ESBL-producerende *Salmonella* is daarmee lager dan in 2013. Een uitgebreide analyse van de meetresultaten volgt nog.

**ESBLs 2014 (actieve surveillance)**

In 2014 zijn t.b.v. de actieve ESBL surveillance in totaal 1601 fecale monsters van vleeskuikens (N = 400), leghennen (N= 200) vleesvarkens (N = 400), vleeskalveren (N= 301) en melkkoeien (N = 300) onderzocht op de aanwezigheid van ESBL/AmpC producerende *E. coli* d.m.v. selectieve kweek in bouillon (LB + 1 mg/L cefotaxime) gevolgd door afenting op MacConkey met 1 mg/l cefotaxime. Hierbij zijn in totaal 490 ESBL-verdachte *E. coli* gevonden (zie tabel 7). De prevalenties op dierniveau zijn variabel maar voor alle diersoorten behalve melkvee boven de 10%. Dat is dus een groot reservoir gezien de grote aantallen dieren die in Nederland worden geproduceerd.

Tabel 7. ESBL-prevalenties op dierniveau in 2014.

Diersoort	N ESBL	N totaal	% ESBL
vleeskuiken	267	400	67%
leggen	68	200	34%
varken	73	400	18%
melkkoe	26	300	9%
kalf blank	35	151	23%
kalf rosé	21	150	14%

*De analyse van de ESBL genen en plasmiden is nog niet afgerond en wordt weergegeven in de het volgende voortgangsverslag (voorjaarsrapportage 2015).*



### 3.3 Planning

#### Actieve surveillance

*In 2015 worden alle 1300 coecale/ fecale monsters (van 400 vleeskuikens, 300 vleesvarkens, 300 vleeskalveren en 300 melkkoelen) die worden verzameld t.b.v. de reguliere resistentie monitoring onderzocht op de aanwezigheid van ESBL-producerende E. coli via selectieve kweek. Deze zelfde monsters wordt gescreend op de aanwezigheid van carbapenemase producerende Enterobacteriaceae (CPE's) met een commerciële RT-PCR. Naast alle PCR-positieve monsters zal van een selectie van de monsters een selectieve kweek worden ingezet om CPE's te kweken.*

*Alle gevonden ESBL/AmpC-producerende E. coli worden fenotypische bevestigd met een specifiek antibioticum panel (Sensititre EUVSEC2) en species getypeerd met MALDI. Daarnaast wordt van ieder isolaat via moleculaire technieken (microarray en PCR) bepaald worden welk ESBL gen aanwezig is. Van een selectie van de isolaten zal tevens worden gekeken op welk plasmide het ESBL/AmpC gen gelegen is.*

*Alle gevonden CPE's worden fenotypische bevestigd met een specifiek antibioticum panel (Sensititre EUVSEC2) en species getypeerd met MALDI. Daarnaast wordt van ieder isolaat via moleculaire technieken (microarray en PCR) bepaald worden welk carbapenemase gen. Wanneer een carbapenemase gen is aangetoond, dan zal met moleculaire technieken worden bepaald of het gen op een plasmide of op het chromosoom gelegen is. Wanneer blijkt dat het gen op een plasmide gelegen is, dan zal een meer uitgebreide moleculaire analyse van het plasmide worden uitgevoerd (het bepalen van de volledige DNA sequentie).*

#### Passieve surveillance

*In 2015 worden alle isolaten met verminderde gevoeligheid voor cefotaxime (ESBL-verdacht) en meropenem (carbapenemase-verdacht) fenotypisch gescreend in een specifiek antibioticum panel (Sensititre EUVSEC2). Isolaten die een ESBL- of carbapenemase-verdacht resistentiepatroon laten zien, zullen verder moleculair worden onderzocht.*

### 3.4 Financiering / Funding

Voor 2015: 102,52 K€ voor materieel en personeel

### 3.5 Monitoring en evaluatie / Monitoring and Evaluation

### 3.6 Publicaties / Publications

Link	Titel	Jaar	Auteur(s)
	MARAN-2014	2014	Editors: Dierikx, Mevius, Heederik en van Pelt
Int. J. Food Microbiol. 177: 72-77.	Enterobacteriaceae resistant to third-generation cephalosporins and quinolones in fresh culinary herbs imported from Southeast Asia	2014	Veldman, K., Kant, A., Dierikx, C., van Essen-Zandbergen, A., Wit, B., Mevius, D.
Zoonoses Public Hlth. 61: 338-345.	Prevalence and Molecular Characteristics of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus (MRSA) in Organic Pig Herds in The Netherlands.	2014	Van de Vijver, L.P.L., Tulinski, P., Bondt, N., Mevius, D., Verwer, C
J. Antimicrob. Chemoth. 69: 2669-2675.	Extended-spectrum and AmpC $\beta$ -lactamase-producing Escherichia coli in broilers and people living and/or working on broiler	2014	P. M. C. Huijbers, E. A. M. Graat, A. P. J. Haenen, M. G. van Santen, A. van Essen-Zandbergen, D. J. Mevius, E. van Duijkeren, and A. H. A. M.

farms: prevalence, risk factors and molecular characteristics.	van Hoek.
--	-----------

#### 4 Projectorganisatie /Project Organization

##### 4.1 Projectteam (Wageningen UR) / Project Team (Wageningen UR)

Naam/Name	Organisatie/Organisation	Rol/Role	Email/E-mail	Telefoon/Telephone
D. Mevius	CVI	Projectleider	<a href="mailto:dik.mevius@wur.nl">dik.mevius@wur.nl</a>	0320-238413
K. Veldman	CVI	Onderzoeker	<a href="mailto:kees.veldman@wur.nl">kees.veldman@wur.nl</a>	0320-238404
A. Van Essen-Zandbergen	CVI	HBO onderzoeker	<a href="mailto:alieda.vanessen@wur.nl">alieda.vanessen@wur.nl</a>	0320-238332
A. Kant	CVI	HBO-onderzoeker	<a href="mailto:arie.kant@wur.nl">arie.kant@wur.nl</a>	0320-23

##### 4.2 Betrokken instellingen (buiten Wageningen UR) / Involved Parties (besides Wageningen UR)

Naam/Name	Organisatie/Organisation	Rol/Role	Email/E-mail	Telefoon/Telephone
-----------	--------------------------	----------	--------------	--------------------

##### 4.3 Externe teamleden alleen Contactpersonen EZ

Naam	Organisatie	Rol	Email	Telnr

---

## 5 Samenvatting (engels) / Summary

Prevalence of ESBL-producing *E. coli* from broilers using non-selective methods has further decreased in 2013 (to 2.7%) compared to former years, but seems to have stabilized at this level in 2014 (with a prevalence of 2.8%).

In 2013, selective isolation of ESBL-producers in faeces from batches of veal calves and slaughter pigs and individual dairy cows resulted in 46.1%, 57% and 7% ESBL-prevalence, respectively. In veal calves and slaughter pigs this suggests a slight decrease of ESBLs at farm level, although future sampling must reveal whether this is just a variation in results or indeed a decrease in prevalence. In 2014, selective isolation in individual faecal samples of veal calves, slaughter pigs, dairy cows, broilers and laying hens resulted in an ESBL prevalence of 19%, 18%, 9%, 67% and 34%, respectively. The lower prevalence of ESBLs measured in 2014 in veal calves and slaughter pigs is most probably caused by the lower chance of detecting ESBLs in individual animals (in 2014) compared to slaughter badges (in 2013). In the individually sampled dairy cows the ESBL prevalence was at the same level in both years (7% and 9%). As expected, the ESBL prevalence was the highest in broilers (67%), but was also relative in laying hens (34%). For 2013, the decreasing trend in ESBL-prevalence was not seen in targeted surveillance of meat which might be explained by the inclusion of imported meat in the surveillance.

Both in slaughter animals and in meat CTX-M-1 is the most prevalent ESBL. This strongly suggest that faecal contamination during slaughter or processing of the meat was the main source of these genes. In slaughter animals, other variants were detected that are considered to be of human origin: CTX-M-14, -15, -32 and -3. As in former years the variation of ESBL genes in meat products was larger than in faecal samples.

The prevalence of ESBL-producing *Salmonella* was 4% in 2013, which is more than two times as high as in previous years. This can mainly be attributed to an extra import project in which poultry meat from South America was extra sampled. In 2014, the prevalence of ESBL-suspected isolates was lower with 2% (preliminary data).

In 2013, targeted screening for carbapenemase-producing strains in all faecal samples (N = 1544) from broilers, veal calves, slaughter pigs and dairy cows did not result in isolates with plasmid-mediated carbapenemase genes. However, in three samples (two from pig samples and one from broilers) a positive signal was observed. Additional molecular analysis (classical PCR and sequencing) revealed the presence of a OXA-48-like genes in all three samples. The genes detected differed 3-5 mutations to the reference OXA-48 gene and from the genes found in isolates from patients in the OXA-48 outbreak that occurred in 2012 in the Netherlands in the "Maasstad" hospital. The genes were identical to OXA-48 genes described to occur chromosomally in environmental *Shewanella* spp., which are considered to be not-pathogenic and not a source of transmission to humans. In 2014, the carbapenemase screening was continued and resulted in one PCR positive pig sample. Classical PCR and sequencing demonstrated the presence of an OXA-48-like gene (OXA-199). Additional culturing resulted in the isolation of a *Shewanella* spp. carrying this OXA-199 gene. Based on the result of the bacterial culturing, this finding was not considered to be relevant for the spread of carbapenemase genes in animals or humans. In summary, in 2014, no plasmid-mediated carbapenemase-producing strains were detected in the samples included in the monitoring.