



Samenvatting ESBL-Attributieanalyse (ESBLAT)

Op zoek naar de bronnen van antibioticaresistentie bij de mens

Projectnummer Topsector TKI-AF 12067





ESBL-Attributieanalyse

Op zoek naar de bronnen van antibioticaresistentie bij de mens

ESBLAT

Projectnummer topsector TKI-AF 12067

ESBLAT Partners



Februari 2018

One Health for Food (1H4F) Partners



ESBL-Attributieanalyse (ESBLAT)

ESBLAT is een publiek-privaat samenwerkingsproject (PPS) binnen het Topsectoren programma 1Health4Food met een looptijd van april 2013 tot en met december 2017. Dit rapport kan als PDF worden gedownload via de volgende link: <http://www.1health4food.nl/esblat>

Partners in ESBLAT waren de kenniscentra:

Wageningen Bioveterinary Research, Lelystad (WBVR)
Institute for Risk Assessment Sciences, Faculteit Diergeneeskunde, UU Utrecht (IRAS)
Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu, Bilthoven (RIVM)
Departement Infectieziekten en Immunologie Faculteit Diergeneeskunde, UU Utrecht (I&I)
Universitair Medisch Centrum, Utrecht (UMCU)
Gezondheidsdienst voor Dieren, Deventer (GD)

De Stichting TKI Agri&Food (TKI)

Industriële partners waren:

VionFood Group, Eindhoven
Van Drie Group, Mijdrecht

Het project is gecoördineerd door:

Prof. Dr. D.J. Mevius (WBVR) en
Prof. Dr. A. Havelaar (tot 2014), daarna Prof. Dr. D. Heederik (beide IRAS)

Betrokken onderzoekers waren:

WBVR: Kees Veldman, Alieda van Essen, Arie Kant, Apostolos Liakopoulos, Yvon Geurts, Dik Mevius
RIVM: Engeline van Duijkeren, Wilfrid van Pelt, Lapo Mughini Gras, Heike Schmitt, Cindy Dierikx, Angela van Hoek, Eric Evers, Annemaria de Roda Husman, Hetty Blaak, Jaap van Dissel
IRAS: Joost Smid, Wietske Dohmen, Alejandro Dorado-Garcia, Heike Schmitt, Arie Havelaar, Dick Heederik
I&I: Joost Hordijk, Jaap Wagenaar
UMCU: Ad Fluit, Gerrita van den Bunt, Marc Bonten
GD: Annet Velthuis, Annet Heuvelink, Rianne Buter, Maaïke Gonggrijp, Inge Santman-Berends, Theo Lam
VionFood Group: Bert Urlings, Lourens Heres, Martijn Bouwknecht
Van Drie Group: Jacques de Groot, Meindert Nieland

Betrokkenen bij expertsessies:

Rundvee: Theo Lam, Henry Voogd, Jacques de Groot, Peter Mölder
Varkens: Peter van de Wolf, Lourens Heres
Pluimvee: Alex Spieker, Teun Fabri

Editors van het rapport waren:

Dik Mevius, Dick Heederik en Engeline van Duijkeren

Financiering:

Dit project ontving financiële steun van de Topsector Agri & Food. Binnen de Topsector werken bedrijfsleven, kennisinstellingen en de overheid samen aan innovaties voor veilig en gezond voedsel voor 9 miljard mensen in een veerkrachtige wereld. De publieke fondsen waren van de Ministeries van Landbouw, Natuur en Voedselkwaliteit (projectnr.: 1600352-01, BO-22.04-008-001) en het Ministerie van Volksgezondheid, Welzijn en Sport.

De private fondsen werden gegeneerd door:

Productschappen voor Vee en Vlees, Pluimvee en Eieren en Zuivel (2013); Fonds Pluimveebelangen; ZuivelNL; Vion Food Group; Van Drie Group.

Inleiding

Wat is het probleem?

Sinds de eeuwwisseling komen ESBLs in toenemende mate bij mens en dier voor. Dit komt grotendeels door overmatig gebruik van antibiotica, maar ook toegenomen mobiliteit, handel in dieren en besmetting via het milieu dragen hieraan bij. Dat is verontrustend. ESBLs kunnen voor de mens en dier belangrijke antibiotica zoals penicillines en cefalosporines afbreken waardoor ze hun werking verliezen. De mate waarin de veehouderij, de voedselketen en het milieu bijdragen aan dragerschap en infecties bij de mens is onbekend.

Wat zijn ESBLs?

ESBLs zijn door bacteriën geproduceerde enzymen die antibiotica die tot de bèta-lactamgroep behoren inactiveren. De Extended Spectrum Bèta-Lactamasen, waar de afkorting ESBLs voor staat, inactiveren de penicillines, ampicilline, amoxicilline en ook alle cefalosporines, allen bèta-lactamantibiotica. Dit zijn voor mens en dier zeer belangrijke antibiotica. Bacteriën die ESBLs produceren zijn resistent en dus niet effectief met deze middelen te behandelen.

Er zijn veel soorten ESBLs bekend en die behoren tot een toenemend aantal groepen waarvan de naam altijd uit een code bestaat met een nummer erachter. De meest voorkomende ESBLs behoren tot de groepen TEM, SHV en CTX-M. Een veel voorkomende variant op de ESBLs is de CMY-groep (behorend tot de plasmid overdraagbare AmpC-klasse). Het nummer zegt iets over de genetische variant binnen een groep. Veel voorkomend zijn CTX-M-1, 9, 14, 15 etc., TEM-20, 52 etc., SHV-2, 12 etc. en CMY-2.

Waar komen ESBLs voor?

ESBLs komen sinds ongeveer 2000 in toenemende mate bij mens en dier voor. Bij de mens wordt dat grotendeels veroorzaakt door een wereldwijde (pandemische) verspreiding van CTX-M-genen, met name CTX-M-15 die van bacterie op bacterie wordt overgedragen via plasmiden, kleine ringvormige stukje DNA (zie de volgende paragraaf "hoe worden ESBLs verspreid"). Deze plasmiden hebben zich in een bij mensen succesvolle darmbacterie, de *E. coli*-variant ST131, genesteld. Deze *E. coli*-bacterie met ESBL wordt van mens op mens overgedragen.

In landbouwhuisdieren worden veelal andere ESBL-varianten gezien, waarbij CTX-M-1, TEM-52, CMY-2, SHV-12, CTX-M-14 en SHV-2, in volgorde van mate van voorkomen, kunnen worden genoemd. Deze ESBLs worden in de mest van alle diersoorten gevonden zonder dat deze er last van hebben.

Daarnaast is vooral pluimveevees vaak besmet. Vlees van andere diersoorten is veel minder vaak besmet. De ESBL die bij mensen het vaakst wordt gevonden, CTX-M-15, komt ook voor bij landbouwhuisdieren, maar dat is slechts incidenteel het geval.

Hoe worden ESBLs verspreid?

De verspreiding van ESBLs is uiterst complex van aard omdat ESBL-genen overdraagbaar zijn binnen bacteriën van het chromosomale DNA naar plasmiden. Plasmiden zijn DNA-structuren die zich in een bacterie zelfstandig kunnen vermenigvuldigen en die onafhankelijk van de celdeling van bacteriën actief worden overgedragen naar andere bacteriën. Dit laatste proces heet conjugatie. Conjugatie is het meest efficiënt binnen een soort, bijvoorbeeld van de ene *E. coli* naar een andere *E. coli*. Maar overdracht van plasmiden kan ook plaatsvinden tussen bacteriën die minder nauw verwant zijn zoals *E. coli* en *Salmonella*. Conjugatie gebeurt vooral op plekken waar veel bacteriën dicht op elkaar zitten, zoals het maagdarmkanaal van mens of dier en in mestputten of riolen. Hierdoor zijn er in feite geen grenzen aan de verspreidingsmogelijkheden van ESBLs.

De overdracht van ESBLs tussen dier en mens begint bij mensen die besmet raken met ESBL-dragende bacteriën. Deze bacteriën kunnen vervolgens hun plasmiden met ESBLs overdragen aan bacteriën van de mens. De bijdrage van mens specifieke bacteriestammen, zoals de humane *E. coli* ST131, lijkt voor dierlijke bronnen van minder belang te zijn. Dit betekent dat voor het bestuderen van de verspreiding van ESBLs het dus nodig is om zowel de ESBL-genen zelf, als ook de plasmiden die ESBLs dragen goed te karakteriseren. Op basis van de aan- of afwezigheid van genetische overeenkomsten kan een inschatting worden gemaakt van de bijdrage vanuit een bepaald reservoir aan het voorkomen bij de mens.

Wat bepaalt het voorkomen van ESBLs?

Het voorkomen van ESBLs bij mensen en dieren is het gevolg van een combinatie van factoren.

Antibioticagebruik, zowel humaan als veterinair, is de belangrijkste factor. Dit heeft een positieve selectie van

ESBLs tot gevolg en stimuleert de recirculatie in een bepaald reservoir en de kans op verspreiding via overdracht. Dit betreft vooral bèta-lactamantibiotica die specifiek ESBLs selecteren, zoals de cefalosporinen, maar via co-selectie kunnen ook andere antibiotica zoals de fluorochinolonen en aminoglycosiden indirect ESBLs selecteren. Dit gebeurt zowel bij de mens als bij dieren.

De verspreiding van ESBLs wordt vervolgens bij mens en dier bepaald door niet-afdoende hygiëne- en infectiecontrolemaatregelen en bij landbouwhuisdieren vooral door dierbewegingen binnen en tussen bedrijven. Blootstelling aan ESBLs bepaalt of er overdracht tot stand kan komen. Dat kan bijvoorbeeld via contact met mens of dier, via besmet voedsel of via het milieu. Wanneer er sprake van blootstelling is, bepaalt niet alleen de concentratie aan ESBLs en de blootstellingsfrequentie of succesvolle uitwisseling tot stand komt en dit tot dragerschap leidt, maar ook de moleculaire eigenschappen van de ESBL-dragende bacteriën en de plasmiden. Al met al een zeer complex en moeilijk te voorspellen proces. Dragerschap leidt vervolgens meestal niet tot ziekte.

Omdat in Nederland een groot verschil bestond tussen de hoeveelheid antibiotica die bij de mens (zeer laag) en dieren (tot voor kort hoog) werden gebruikt, is het reduceren van het gebruik in de dierhouderij een belangrijk onderdeel van het overheidsbeleid sinds 2008. Er zijn door diersectorpartijen binnen de in de keten gebruikte kwaliteitssystemen, uitgebreide maatregelen geïnitieerd ter registratie en reductie van het gebruik. Dit heeft van 2009 tot 2016 geleid tot een reductie van bijna 65% in verkochte antibiotica voor gebruik in dieren. Dit is een belangrijk resultaat dat onder andere tot een reductie van het voorkomen van ESBLs in de meeste landbouwhuisdieren en dierlijke producten heeft geleid.

Wat is er bekend over relaties tussen ESBLs uit mensen en dieren?

Onderzoek van UMCU, WBVR, RIVM en VUMC heeft aangetoond dat er een genetische relatie bestaat tussen een deel van de ESBLs die klinische infecties veroorzaken bij mensen en die van pluimvee en pluimveevlees. Echter, uit kippen(vlees) geïsoleerde ESBLs worden ook in andere diersoorten en het milieu gevonden, wat suggereert dat er ook andere reservoirs voor verspreiding naar de mens kunnen zijn, waaronder de mens zelf (NETHMAP/MARAN-2017).

Verder is niet duidelijk in hoeverre andere overdrachtsroutes dan vlees bijdragen aan blootstelling van de mens, bijvoorbeeld via plantaardige producten, het milieu of direct contact. Ook de relatieve bijdrage van ESBLs uit dierreservoirs ten opzichte van de mens als reservoir (inclusief circulatie in ziekenhuizen en besmetting tijdens buitenlandse reizen) is onbekend. Afhankelijk van het detailniveau waarop naar genetische verwantschap wordt gekeken, is voor de *E. coli*-bacterie geschat dat 10-30% van de ESBLs uit klinische isolaten van de mens uit de veehouderij (vooral kip) afkomstig kan zijn. Het is niet uit te sluiten dat deze relatie aan variatie in regio, tijd en bron onderhevig is.

Doelstelling

Dit project had twee doelstellingen:

1. Vaststellen wat de bijdrage is van alle ESBL-reservoirs aan het dragerschap en infecties bij mensen.
2. Vaststellen wat de transmissieroutes zijn vanuit deze reservoirs naar de (geïnfecteerde) mens.

De belangrijkste reservoirs van waaruit transmissie naar de mens kan plaatsvinden zijn, naast de mens zelf, landbouwhuisdieren: kippen, varkens en runderen. Andere potentieel belangrijke reservoirs zijn voedsel van dierlijke oorsprong (vooral vlees, maar ook zuivelproducten), voedsel van plantaardige oorsprong en het milieu (vooral water en bodem); waarbij ook tal van interacties tussen reservoirs en blootstellingsroutes onderling bestaan. Ook de bijdrage van direct contact tussen mensen en huisdieren en paarden zal worden bestudeerd. Daarnaast is de vermeerdering van ESBL door contact tussen mensen onderling en selectiedruk door antibioticagebruik in de humane geneeskunde een belangrijke factor. Ook moet rekening worden gehouden met "import" van genen/plasmiden/bacteriën via mensen, dieren, voedsel en (rivier)water uit andere landen, en met genoverdracht binnen en tussen reservoirs.

Wat betreft de humane reservoirs wordt onderscheid gemaakt tussen de algemene bevolking (dragerschap), patiënten in huisartsenpraktijken (urineweginfecties) en patiënten in ziekenhuizen. De aanname is dat dragerschap in de algemene bevolking kan leiden tot (urineweg)infecties met resistente bacteriën, waarna een deel van deze patiënten in het ziekenhuis moet worden opgenomen. Daarnaast is er een autonome kringloop in het ziekenhuis (*Klebsiella* overleeft beter in ziekenhuizen dan *E. coli*) naast die van de instroom uit de algemene bevolking.

Resultaten

Breed onderzoek onder mens, dier en in het milieu

Om in de toekomst adequate maatregelen te kunnen treffen, is door het consortium ESBLAT, onderzoek gedaan naar de bijdrage van dieren, vlees en het milieu aan het ESBL-dragerschap bij de mens (figuur 1). Daarnaast is gekeken in hoeverre verschillende overdrachtsroutes, zoals vleesconsumptie en zwemmen in oppervlaktewater, bijdragen aan de blootstelling van de algemene bevolking. Hiervoor is informatie verzameld over de aanwezigheid van ESBLs bij verschillende landbouwhuisdieren zoals koeien, kippen en varkens, en ook huisdieren en wilde vogels. ESBL-dragerschap bij de mens is onderzocht in de algemene bevolking en bij veehouders. Bij patiënten in ziekenhuizen en huisartsenpraktijken is onderzocht welk aandeel ESBLs hadden bij infecties door *E. coli*.

De genetische informatie van de verschillende soorten ESBLs, de mate waarin die voorkomen en de aantallen ESBL-producerende bacteriën per reservoir zijn verzameld uit 35 Nederlandse studies met meer dan 27.000 observaties in de periode tussen 2005-2015. Deze studies waren al eerder uitgevoerd of zijn in het kader van het ESBLAT-onderzoeksproject geïnitieerd.

ESBLs komen overal voor

In alle onderzochte reservoirs, van zowel mens, dier als milieu, kwamen ESBLs voor. De hoogste percentages ESBLs werden gevonden bij pluimvee, op vlees van pluimvee en in oppervlaktewater (50 tot 100%). Bij de algemene bevolking en bij urineweg-, en invasieve infecties waarbij een *E. coli* geïsoleerd wordt, lag dit rond de 5%. Een hogere kans op dragerschap werd gevonden bij mensen die door hun beroep meer kans hebben op blootstelling aan dierlijke reservoirs, zoals veehouders en slachthuismedewerkers.

Ook alle ESBL-soorten zijn overal

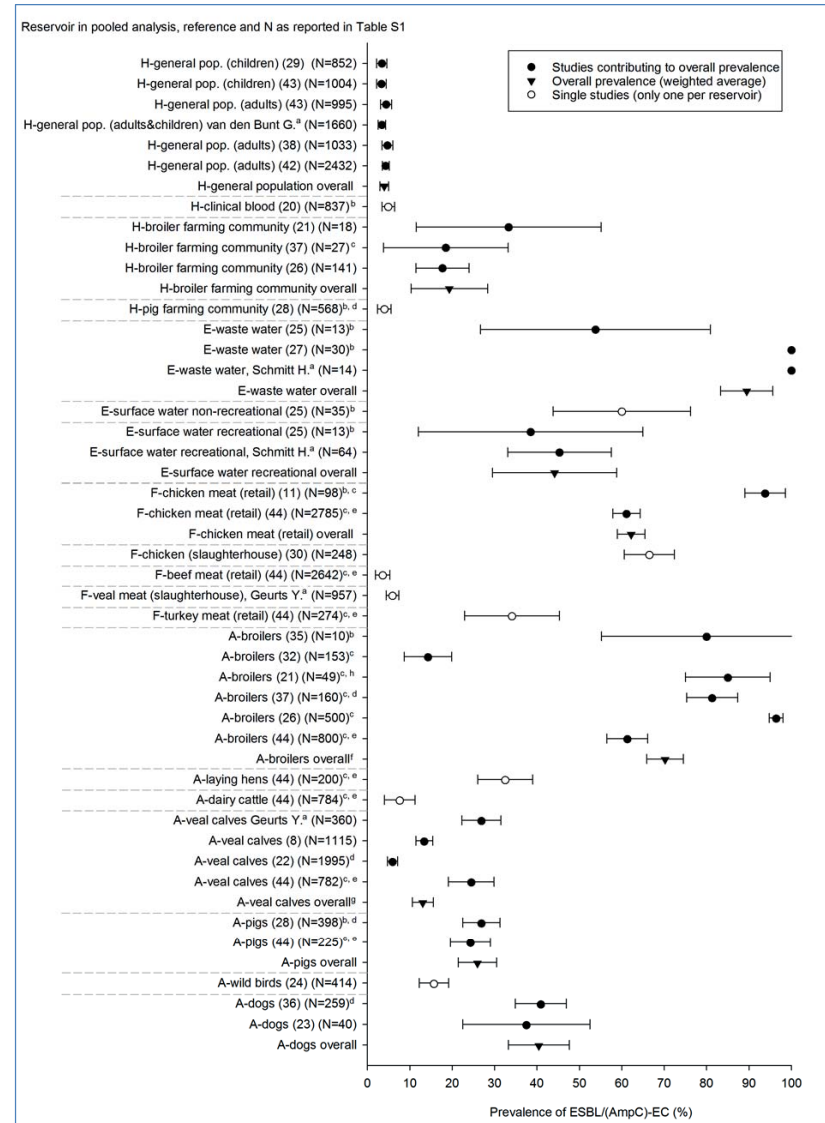
Door de genetische overeenkomst van ESBL-soorten tussen reservoirs in kaart te brengen (*similariteitsanalyse*) ontstaat een beeld van de mogelijke transmissieroutes tussen deze reservoirs (figuur 2). Hoe groter de genetische overeenkomst, hoe aannemelijker dat er daadwerkelijk overdracht heeft plaatsgevonden. In alle onderzochte reservoirs en transmissieroutes werd een grote diversiteit aan soorten ESBLs gevonden. Een opvallende bevinding is dat alle ESBL-soorten ook in alle reservoirs voorkomen, zij het in verschillende mate.

Uitwisseling tussen mensen onderling levert grootste bijdrage

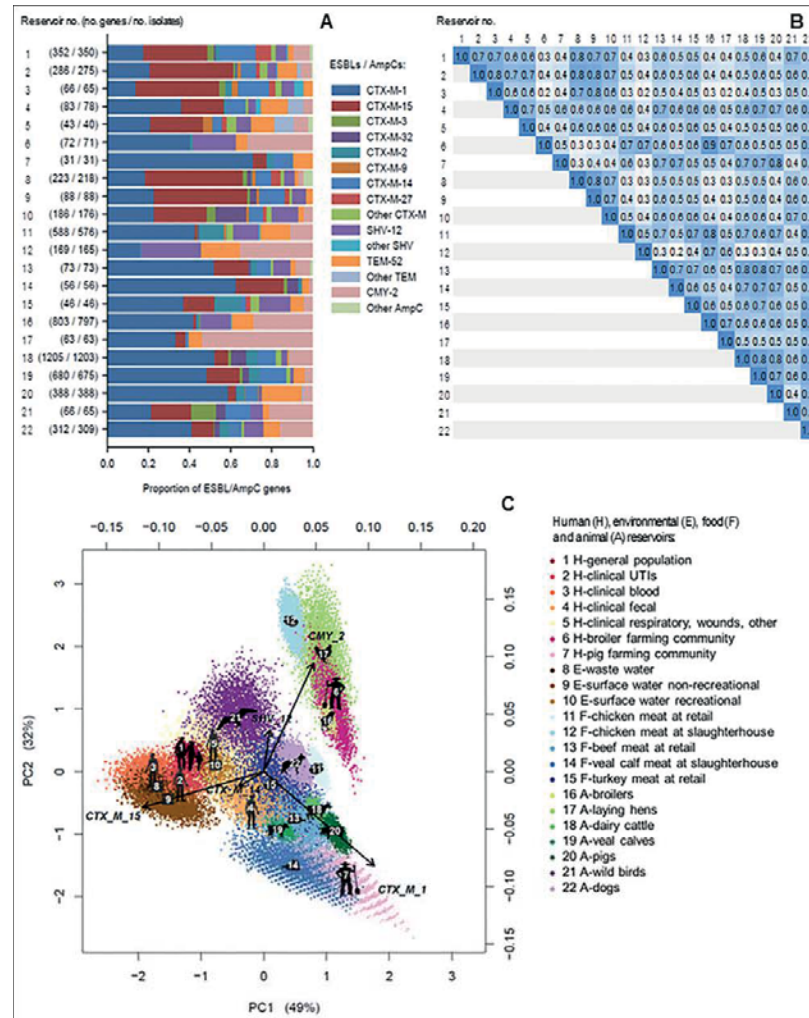
ESBL-soorten uit de algemene bevolking en patiënten vertonen onderling grote genetische overeenkomsten, terwijl soorten uit de veehouderij (vee, vlees) beduidend minder overeenkomen met die van de mens. De gevonden verschillen tussen ESBLs in mensen en in de veehouderij suggereren dat landbouwhuisdieren, met inbegrip van pluimvee en vlees van pluimvee, een relatief kleine bijdrage leveren aan ESBLs die voorkomen bij de mens in vergelijking met de bijdrage van de mens zelf.

Dat de mens zelf de belangrijkste bron is van ESBLs, is in lijn met het recent uitgebrachte ECDC/EFSA/EMA-rapport, waarin het gebruik van cefalosporines in de humane gezondheidszorg als belangrijkste oorzaak voor het voorkomen van ESBL-producerende *E. coli* bij de mens werd genoemd.

Figuur 1. Prevalentie (%) van ESBL/(AmpC) producerende *E. coli* per reservoir (met toestemming uit Dorado-García et al. 2017).



Figuur 2. A: Relatieve verdeling van ESBL-genen aangetoond in 22 reservoirs. B: Proportionele similariteit in ESBL-verdelingen tussen de 22 reservoirs (0 is geen overeenkomst en 1 is identiek). C. Principale componenten analyse op basis van bootstrap waarbij de overeenkomsten en verschillen in de verdelingen worden gevisualiseerd (met toestemming uit Dorado Garcia et al, 2017).



Uitwisseling met vee belangrijkste route voor veehouder

Een uitzondering vormen veehouders. De verdelingen van ESBL-soorten in deze groepen vertonen een sterke gelijkheid met die in het eigen vee en verschillen van die van anderen bevolkingsgroepen. Dit suggereert dat contact met vee de meest waarschijnlijkste transmissieroute is.

ESBL-bijdrage gezelschapsdieren nog onduidelijk.

De ESBL-soorten van honden leken zowel op die van mensen als die van de veehouderij. Dit is vermoedelijk deels te verklaren door het intensieve contact van de hond met zijn eigenaar, maar deels ook door het eten van besmet verse of rauwe vleesproducten en deels door het uitwisselen van ESBLs tussen honden via intensief onderling contact. Of direct contact met gezelschapsdieren leidt tot een hogere kans op ESBL-dragerschap bij mensen is binnen ESBLAT niet aangetoond.

ESBL-bijdrage door vlees eten, zwemmen en veehouderijlucht gering

Op basis van zwemfrequentie, wateropname en watercontaminatie is de blootstelling van zwemmers geschat. Hetzelfde is gedaan voor de blootstelling door consumptie van varkens-, kip- en rundvlees. Hiervoor zijn gegevens over de mate van besmetting van vlees en vleesproducten gecombineerd met informatie over de consumptiefrequentie.

De analyses laten zien dat zowel zwemmers als consumenten worden blootgesteld aan lage concentraties ESBLs. De blootstelling door consumptie van vlees, en vooral rauwe vleesproducten, is hoger dan de blootstelling aan ESBLs via zwemmen. Op dit moment zijn er in Nederland geen epidemiologische studies die laten zien dat blootstelling door vleeseten of zwemmen leidt tot een verhoogde kans op dragerschap in de algemene bevolking of infecties bij patiënten.

Omwonenden van veehouderijbedrijven zijn blootgesteld aan ESBLs via het milieu, bijvoorbeeld in de lucht. Onderzoek onder omwonenden liet zien dat deze blootstelling niet resulteert in een verhoogde kans op dragerschap.

Rekenmodel verspreiding van ESBLs bevestigt geringe bijdrage dier en milieu

De eerste verkennende attributieanalyse, gebruikmakend van reeds bestaande modellen, ondersteunt eerdere studies die concludeerden dat ESBLs bij de mens slechts in beperkte mate kunnen worden toegeschreven aan dierlijke bronnen en oppervlaktewater.

Door de vele mogelijke verspreidingsroutes en reservoirs is een kwantitatieve analyse van de bijdrage aan ESBL bij de mens echter uitermate complex (figuur 3). Zelfs met de omvangrijke hoeveelheid nieuwe gegevens die verkregen zijn in de ESBLAT-studies blijven er nog vragen over. Bijvoorbeeld over hoe lang mensen en dieren drager van ESBL blijven, wat de relatie tussen de mate van blootstelling en de kans op dragerschap is (dosis-effectrelaties) en wat de rol van met ESBL terugkerende reizigers is. Ook geeft de analyse nog geen volledig en onvoldoende kwantitatief beeld van de transmissieroutes van verschillende reservoirs naar de mens (direct contact, voedsel, milieu).

Mens, dier en milieu: one-health

De alom aanwezigheid van ESBLs in mens, dier en milieu maakt het opsporen van bronnen en transmissieroutes een typisch *one-health* probleem, wat een interdisciplinaire aanpak vraagt. Het onderzoek binnen het ESBLAT-consortium betrof dan ook een unieke samenwerking van experts uit de humane gezondheidszorg en gezondheidsonderzoek, diergeneeskunde en milieuwetenschappen. Deze samenwerking was van groot belang om de humane blootstellings- en gezondheidsrisico's door mens, dier en milieu te kunnen onderzoeken en kwantificeren. Dit heeft geleid tot belangrijke nieuwe inzichten in de aanwezigheid en de verspreiding van ESBLs, en ook openliggende vragen. Gezien de dynamische aard van deze problematiek blijft daarom continue aandacht in alle domeinen gewenst.

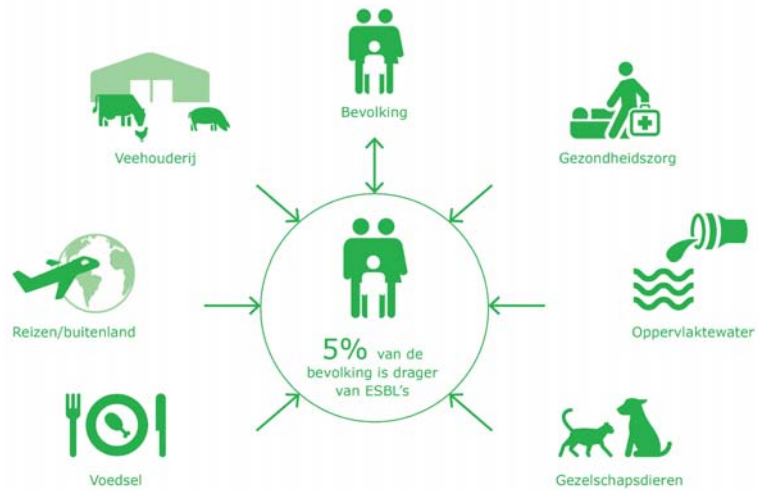
Blijvende monitoring ESBL cruciaal

De mens zelf lijkt vooraan de belangrijkste bron van ESBLs die bij patiënten infecties veroorzaken. Infectiecontrole en verantwoord gebruik van antibiotica (*antibiotic stewardship*) in de gezondheidszorg en de diergeneeskunde blijven daarom van belang om verspreiding van ESBLs te voorkomen. Hoewel de directe bijdrage vanuit de voedselketen en het oppervlaktewater op dit moment gering lijkt, zijn het wel zeer grote reservoirs die altijd een bron van blootstelling en verspreiding zullen blijven. Er is dan ook grote behoefte aan aanvullende longitudinale studies in een aantal reservoirs om de rekenmodellen verder te

verbeteren en de bijdrage van bronnen te identificeren. Monitoring van ESBLs in de verschillende reservoirs is daarom cruciaal om veranderingen in de dynamiek tijdig te herkennen.

Aantekeningen

Figuur 3. Bronattributiemodel waarin de mens is opgenomen als bron voor andere mensen.



Referentie

Dorado-García A. et al, *Molecular relatedness of ESBL/AmpC-producing Escherichia coli from humans, animals, food and the environment: a pooled analysis.* J Antimicrob Chemother. **2017** Nov 18. doi: 10.1093/jac/dkx397.