



Antibiobug Project: Studie over antibioticaresistente bacteriën in waterlopen in Wallonië

Plan ENVleS – gefinancierd door
SPW

Leslie Crettels

Ir. Gembloux Agro-Bio Tech
PhD student sciences vétérinaires Uliège

l.crettels@issep.be



Presentatie van ISSeP

- Referentielaboratorium in het domein van de monitoring van het leefmilieu in Wallonië.
- Monitoring van de **luchtkwaliteit, water (oppervlaktewater, ondergronds water, zwemwater,...)**, studie van de **bodem** en karakterisering van **afval**.

2 Sites
Luik & Colfontaine



~300 medewerkers 

~120 masters of > 

~180 technici 


~150 Geaccrediteerde methodes
water, lucht, aarde & sediment

~15000 Omgevingsstalen
Jaarlijkse laboanalyses



BBE LAG LAC
060-TEST 060-PT
EN ISO/IEC 17025:2005 EN ISO/IEC 17043:2010

>30 Onderzoeksprojecten
Voor de monitoring van het leefmilieu,
Risico-evaluatie leefmilieu-gezondheid

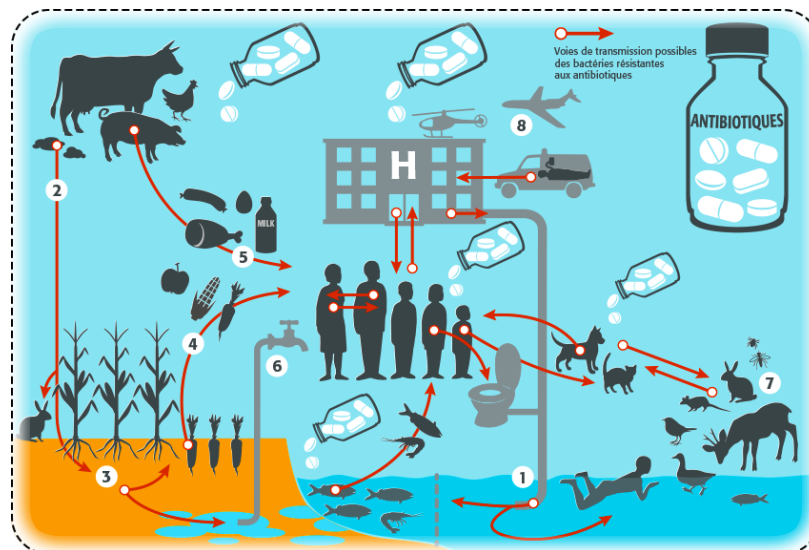


Doelstellingen van het project

Aanwezigheid nagaan van antibioticaresistente bacteriën in waterlopen

Om hier aan te voldoen:

- Een méthodologie op punt zetten
- Waterlopen en te analyseren afvalwater selecteren



- Keuze bacteriële soort te monitoren

Medische literatuur  selectie van *Escherichia coli*

- Keuze van te testen antibiotica (Ab)

Criteria:

- Toepassingsgebieden: Ab uitsluitend voor veterinair of humaan gebruik, gemengd gebruik
- Ab-klasse: maximale dekking van de Ab-klassen
- Verkoopvolumes: gegevens INAMI voor 2017 (Classificatie ATC/DDD)
- Referentie: EUCAST (The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing)

Voorbeeld: lijst van 20 meest voorschreven en terugbetaalde antibiotica door het RISIV in Belgische hospitalen in 2017 (bron: database pharmanet); in grijs: voor deze studie gekozen:

CODE ATC	ANTIBIOTIQUES	FAMILLE	QUANTITÉ VENDUE EN 2017 (KG)
J01CR05	PIPERACILLINE ET INHIBITEURS D'ENZYMES	PÉNICILLINES	5825
J01CR02	AMOXICILLINE ET INHIBITEURS D'ENZYMES	PÉNICILLINES	2709
J01DB04	CEFAZOLINE	CÉPHALOSPORINE 1G	1637
J01CF05	FLUCLOXACILLINE	PÉNICILLINES	758
J01DH02	MÉROPÉNÈME	CARBAPÉNÈME (BÉTA-LACTAMINE)	598
J01DD02	CEFTAZIDIME	CÉPHALOSPORINE 3G	496
J01DD04	CEFTRIAXONE	CÉPHALOSPORINE 3G	462
J01CE01	BENZYL PENICILLINE	PÉNICILLINES	392
J01CA04	AMOXICILLINE	PÉNICILLINES	392
J01CA17	TEMOCILLINE	PÉNICILLINES	314
J01MA02	CIPROFLOXACINE	FLUOROQUINONES	308
J01XA01	VANCOMYCINE	GLYCOPEPTIDES	307
J01CA01	AMPICILLINE	PÉNICILLINES	251
J01FF01	CLINDAMYCINE	LINCOSAMIDES	198
J01EE01	SULFAMETHOXAZOLE ET TRIMETHOPRIME	SULFAMIDÉS + DIAMINOPYRIMIDINES	190
J01DE01	CEFEPIME	CÉPHALOSPORINE 4G	183
J01XX01	FOSFOMYCINE	ACIDES PHOSPHONIQUES	177
J01DC02	CEFUROXIME	CÉPHALOSPORINE 2G	159
J01XD01	METRONIDAZOLE	IMIDAZOLÉS	156

RISIV:

Ab Belgisch

ziekenhuis

Ab Belgische officina

Ab Waalse officina

+

Belvet-sac rapport:

Diergeneeskundige Ab

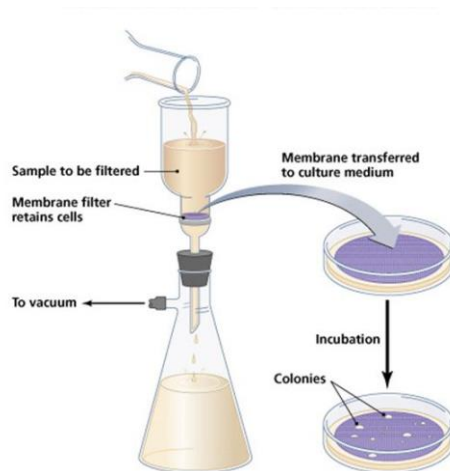
Lijst van de 12 gekozen antibiotica:

Toepassingsgebied	Antibioticum	Klasse
Uitsluitend diergeneeskundig	Florfenicol (FFC, 30 µg)	Phénicol
	Enrofloxacin (ENR, 5 µg)	Fluoroquinolone
Uitsluitend ziekenhuizen	Pipéracilline/Tazobactam (TZP, 30/6 µg)	Pénicilline (β-lactamine) + Inhibiteur de β-lactamase
	Ceftazidime (CAZ, 10 µg)	Céphalosporine 3 ^{ème} G (β-lactamine)
	Méropénème (MEM, 10 µg)	Carbapénème (β-lactamine)
	Ertapénème (ETP, 10 µg)	Carbapénème (β-lactamine)
Ziekenhuizen en huis	Céfuroxime (CXM, 30 µg)	Céphalosporine 2 ^{ème} G (β-lactamine)
	Ciprofloxacin (CIP, 5 µg)	Fluoroquinolone
Ziekenhuizen, huiselijk en diergeneeskundig	Gentamicine (surtout vétérinaire) (CN, 10 µg)	Aminoglycoside
	Ampicilline (AMP, 10 µg)	Pénicilline (β-lactamine)
	Amoxicilline/acide clavulanique (AMC, 20/10 µg)	Pénicilline (β-lactamine) + Inhibiteur de β-lactamase
	Sulfaméthoxazole/Triméthoprim (co-trimoxazole) (SXT, 23.75/1.25 µg)	Sulfamidés + diaminopyridine

- Uitvoering en validatie van referentietest voor antibioticaresistentie

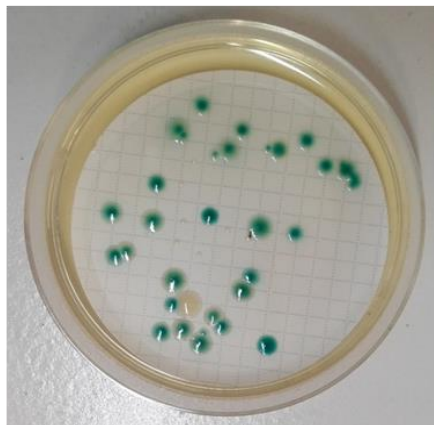
1) ISOLATIE VAN *E. COLI* STAM UIT WATERSTALEN

- ✓ 1^{ère} filtratie op memebraan: dilutie?, milieu TBX ($37 \pm 2^\circ\text{C}$ - $21 \pm 3\text{h}$)
- ✓ 2^{ème} filtratie op memebraan: 2 opeenvolgende diluties in milieu TBX en « TBX + AMX» ($37 \pm 2^\circ\text{C}$ - $21 \pm 3\text{h}$) :



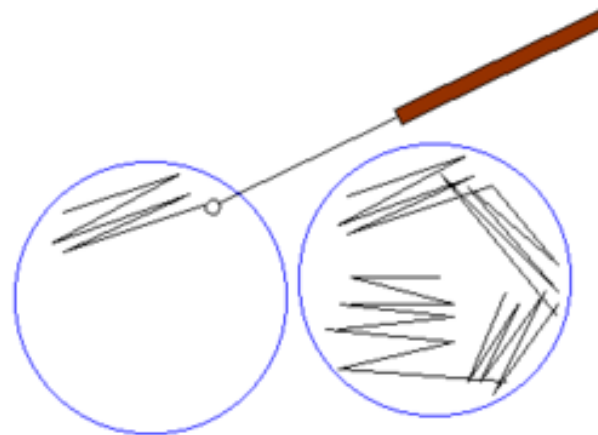
Source : <https://slideplayer.fr/slide/3696265/>

- ✓ Enten van maximum 10 karakteristieke *E. coli* stammen afkomstig van een petrischaal TBX en «TBX+AMX» door enten op milieu TBX ($37 \pm 2^\circ\text{C}$ - $21 \pm 3\text{h}$)



TBX of TBX+AMX

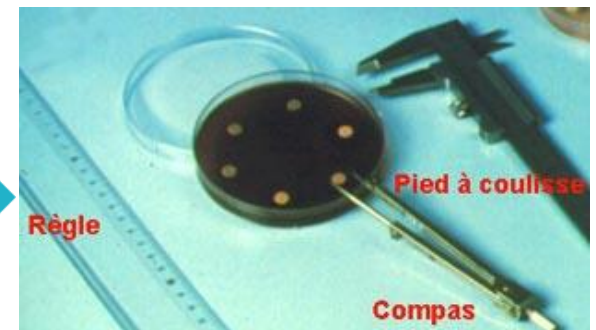
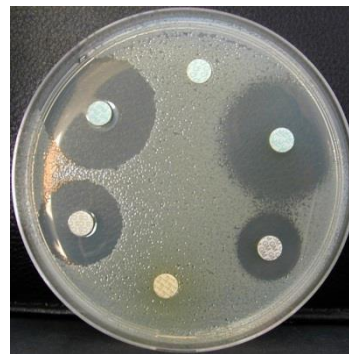
Max. 10 *E. coli*



TBX

2) DIFFUSIETEST OP AGAR (VOLGENS EUCAST)

- Inoculum bereiden (turbiditeit 0,5 McFarland zonder diergeneeskundige Ab)
- Inoculeren op Mueller-Hinton agar
- Antibioticadisks plaatsen
- Incubatie van Pétrischaaftjes ($35 \pm 2^\circ\text{C}$ - $20 \pm 4\text{h}$ voor *E. coli*)
- Aflezen na incubatie
- Inhibitiezone aflezen en indeling R, I, S
- Kwaliteitscontrole (stam ATTC 25922) → controlekaarten/Ab



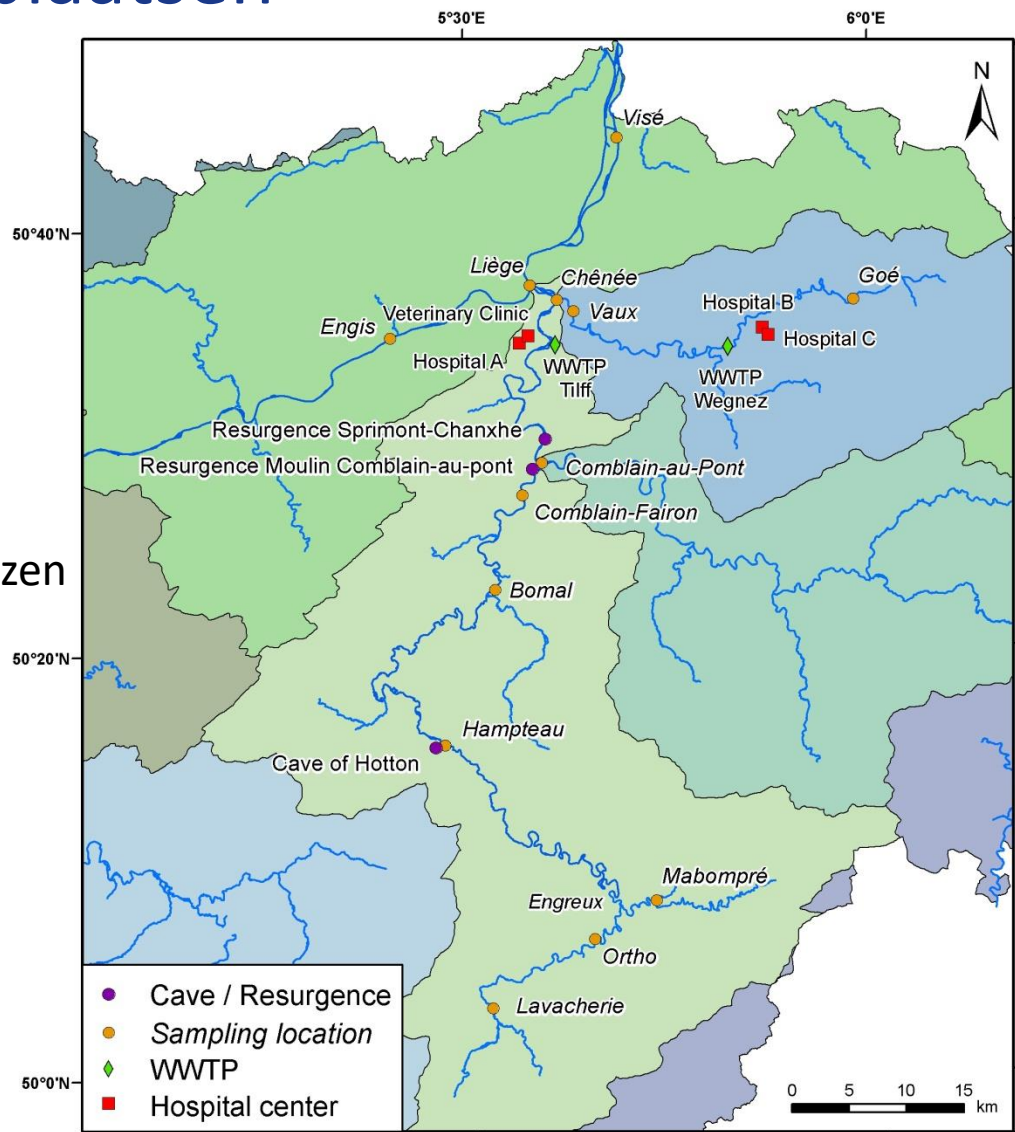
- ✓ Inhibitiezonediameters meten en indeling in S, I, R (volgens definitie van EUCAST sinds 01/2019):

DOMAINE D'UTILISATION	ANTIBIOTIQUE	CONTENU DU DISQUE (µg)	DIAMÈTRE D'INHIBITION (mm)		
			S ≥	R <	ATU
EXCLUSIVEMENT VÉTÉRINAIRE	FLORFÉNICOL	30	19	15	
	ENROFLOXACINE	5	19	19	
EXCLUSIVEMENT HOSPITALIER	PIPÉRACILLINE/TAZOBACTAM	30/6	20	17	17-19
	CEFTAZIDIME	10	22	19	
	MÉROPENÈME	10	22	16	
	ERTAPÉNÈME	10	25	22	
HOSPITALIER ET DOMESTIQUE	CÉFUROXIME	30	19	19	
	CIPROFLOXACINE	5	25	22	22-24
HOSPITALIER, DOMESTIQUE ET VÉTÉRINAIRE	GENTAMICINE (SURTOUT VÉTÉRINAIRE)	10	17	14	
	AMPICILLINE	10	14	14	
	AMOXICILLINE/ACIDE CLAVULANIQUE	20-10	19	19	19-20
	SULFAMÉTHOXAZOLE ET TRIMÉTHOPRIME (CO-TRIMOXAZOLE)	23,75-1,25	14	11	

• Staalnameplaatsen

24 staalnamepunten:

- 17 ESU
- 3 ESO
- 4 afvalwater ziekenhuizen



Staalname in de Ourthe stroomopwaarts van STEP in Tilff :



Staalname aan ziekenhuis B:



Staalname aan
ziekenhuis A:



Twee periodes van staalname (mei en oktober 2019) :

✓ **1^{ste} periode:**

- van 13 tot 22 mei 2019 (isolatie *E. coli*)
- 24 plaatsen van staalname
- 473 *Escherichia coli* stammen geïsoleerd
- analyses (antibiogrammen) werden gemaakt van 03 juni tot 9 augustus 2019 (10 weken)

✓ **2^{de} periode:**

- van 30 september tot 11 oktober 2019 (isolatie *E. coli*)
- 24 plaatsen van staalname (zelfde plaatsen als bij 1ste periode)
- 465 *Escherichia coli* stammen geïsoleerd
- analyses (antibiogrammen) werden gemaakt van 14 oktober tot 13 december 2019 (9 weken)

- Telling *E. coli* – 1^{ste} periode

Code	Code Station	Localisation	<i>E. coli</i> /100 ml		Résistance à l'AMX (%) = ("TBX+AMX"/TBX) x 100
			TBX	TBX+AMX	
A	3290	Engis	$3,4 \times 10^2$	$1,6 \times 10^2$	49
B	3294	Liège	$1,1 \times 10^3$	$3,4 \times 10^2$	30
C	3315	Visé	$1,1 \times 10^3$	$5,1 \times 10^2$	47
D	50109	Lavacherie	$6,9 \times 10^2$	$1,2 \times 10^2$	17
E	11211	Ortho	95	19	20
F	11221	Mabompré	$1,3 \times 10^2$	25	20
G	4271	Hampteau	$1,8 \times 10^2$	50	28
H	15006	Comblain-Fairon	$2,9 \times 10^2$	86	30
I	4325	Angleur	$1,2 \times 10^3$	$4,8 \times 10^2$	40
J	50049	Bomal	$8,7 \times 10^2$	$1,5 \times 10^2$	18
K	4430	Comblain-au-pont	$1,5 \times 10^3$	$3,0 \times 10^2$	20
L	4630	Vaux-sous-chèvremont	$6,0 \times 10^3$	$1,6 \times 10^3$	27
M	-	Hôpital A	$1,1 \times 10^7$	$9,4 \times 10^6$	88
N	-	Faculté vétérinaire	$5,4 \times 10^6$	$1,7 \times 10^6$	32
O	-	Amont STEP Tilff	$1,2 \times 10^4$	$3,5 \times 10^3$	29
P	-	Aval STEP Tilff	$1,3 \times 10^4$	$3,3 \times 10^3$	25
Q	-	Hôpital B	$7,5 \times 10^5$	$2,4 \times 10^5$	31
R	-	Hôpital C	$2,1 \times 10^6$	$5,5 \times 10^5$	26
S	-	Amont STEP Wegnez	$2,8 \times 10^4$	$8,5 \times 10^3$	31
T	-	Aval STEP Wegnez	$2,0 \times 10^4$	$4,3 \times 10^3$	22
U	4550	Goé	$2,7 \times 10^3$	$8,5 \times 10^2$	32
V	31318	Résurgence Sprimont-Chanxhe	$5,5 \times 10^2$	$1,7 \times 10^2$	31
W	31317	Résurgence Comblain-au-Pont	$1,6 \times 10^3$	$4,9 \times 10^2$	31
X	31506	Grotte d'Hotton	$4,4 \times 10^2$	95	22

Het aantal getelde *E. coli* zijn het hoogst in het afvalwater van ziekenhuizen.

Voor ziekenhuis A is er een resistentieprevalentie bij *E. coli* tegen AMX van 88%.

TBX resistente *E. coli* werden teruggevonden in alle 24 staalnameplaatsen behalve in Bomal.

- Telling *E. coli* – 2^{de} periode

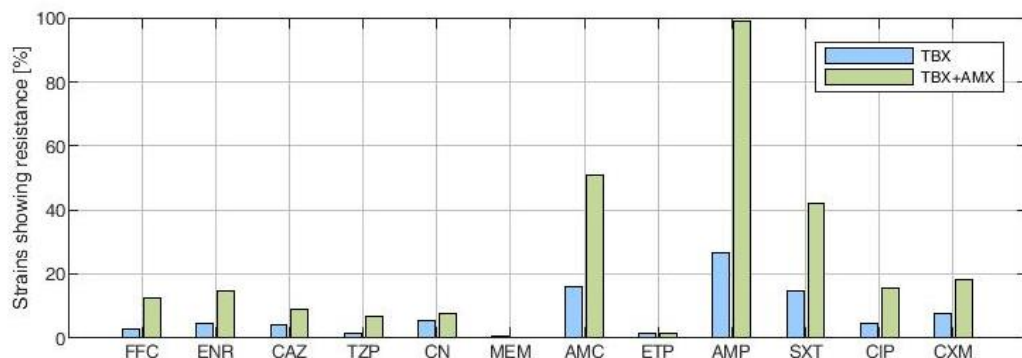
Code	Code station	Localisation	<i>E. coli</i> /100 ml		Résistance à l'AMX (%) = ("TBX+AMX"/TBX) x 100
			TBX	TBX+AMX	
A	3290	Engis	79	27	34
B	3294	Pont de Fragnée	6 x 10 ³	1,6 x 10 ³	27
C	3315	Visé	5,8 x 10 ²	1,8 x 10 ²	31
D	50109	Lavacherie	5,5 x 10 ³	8,2 x 10 ²	15
E	11211	Ortho	1,8 x 10 ³	2 x 10 ²	11
F	11221	Mabompré	3,1 x 10 ³	4,1 x 10 ²	13
G	4271	Hampteau	2,2 x 10 ³	5,2 x 10 ²	24
H	15006	Comblain-Fairon	5,5 x 10 ³	1,8 x 10 ³	33
I	4325	Angleur	6,3 x 10 ³	1,7 x 10 ³	28
J	50049	Bomal	4,2 x 10 ³	8,2 x 10 ²	20
K	4430	Comblain-au-pont	5,7 x 10 ³	1,5 x 10 ³	25
L	4630	Vaux-sous-chèvremont	9,5 x 10 ⁴	1,6 x 10 ⁴	17
M	-	Hôpital A	2,2 x 10 ⁶	1,8 x 10 ⁶	84
N	-	Faculté vétérinaire	3,3 x 10 ⁶	2,6 x 10 ⁶	78
O	-	Avant STEP Tilff	4,5 x 10 ³	1,2 x 10 ³	28
P	-	Après STEP Tilff	6,3 x 10 ³	1,5 x 10 ³	24
Q	-	Hôpital B	4,4 x 10 ⁶	7,8 x 10 ⁵	18
R	-	Hôpital C	1,2 x 10 ⁶	9,5 x 10 ⁵	77
S	-	Avant STEP Wegnez	2,8 x 10 ⁴	5,6 x 10 ³	20
T	-	Après STEP Wegnez	9,2 x 10 ³	3 x 10 ³	33
U	4550	Goé	4,2 x 10 ⁴	1,2 x 10 ⁴	28
V	31318	Résurgence Sprimont-Chanxhe	2,3 x 10 ³	7,7 x 10 ²	34
W	31317	Résurgence Comblain-au-Pont	68	3	4
X	31506	Grotte de Hotton	3,9 x 10 ²	62	16

Voor ziekenhuis A is de resistentieprevalentie tegen AMX bij *E. coli* 84%. Voor de faculteit diergeneeskunde is de prevalantie 78% en voor ziekenhuis C 77%.

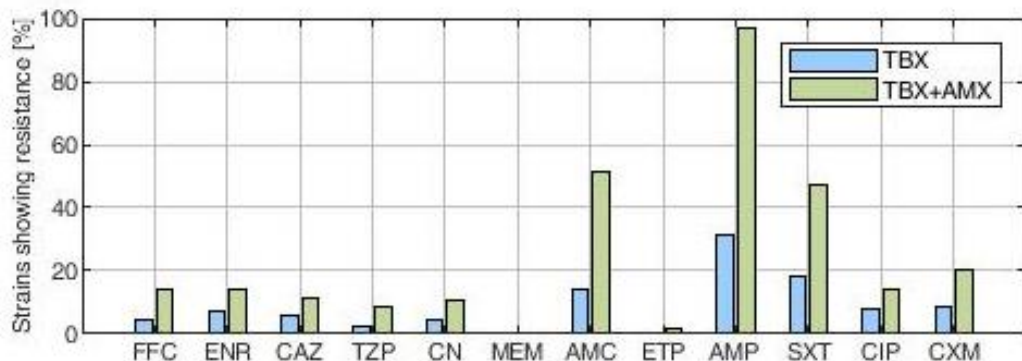
Er werden op alle 24 staalnameplaatsen TBX antibioticaresistente bacteriën teruggevonden behalve in Mabompré en stroomopwaarts van de STEP in Tilff.

- Resistentieniveau per antibioticum en cultuurmilieu

Campagne 1 :



Campagne 2 :



- Op **TBX** en **TBX+AMX** :
AMP > AMC > SXT
- Weinig resistente stammen tegen MEM en ETP (carbapenems)
- Resistentieniveau tegen ENR en CIP bijna gelijk

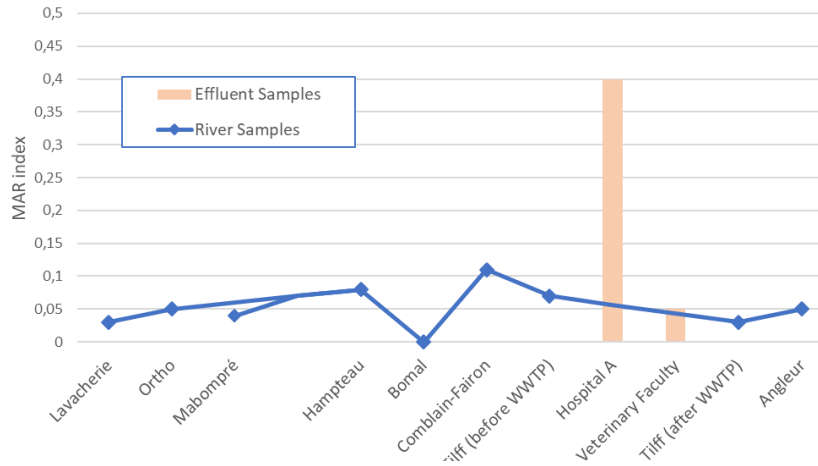
- Percentage stammen resistent aan minstens 1, 2 en 3 antibiotica per type milieu tijdens de 2 periodes van analyse

%age de souche résistantes	TBX			TBX+AMX		
	Campagne 1	Campagne 2	moyenne	Campagne 1	Campagne 2	moyenne
A au moins 1 antibiotique	32,2	33,3	32,7	100	99,6	99,8
A au moins 2 antibiotiques	23,8	25,5	24,6	74,8	76,6	75,7
A au moins 3 antibiotiques (multirésistantes)	13,8	17,6	15,7	39,7	46	42,8

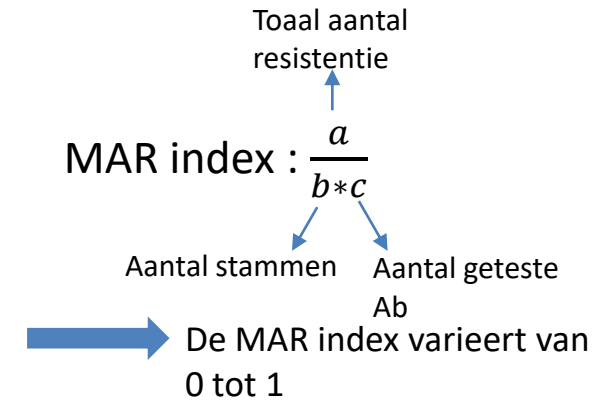
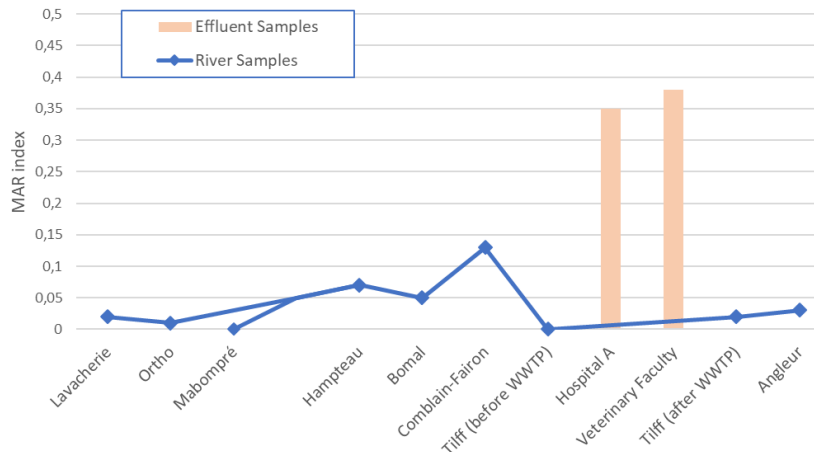
Resultaten

- Evolutie in multiresistentie (MAR) index langs de Ourthe

Periode 1 :



Periode 2 :



De grafiek toont dat de impact van de lozing van afvalwater van ziekenhuis A en van de faculteit diergeneeskunde niet duidelijk is, aangezien er geen duidelijke variatie is in antibioticaresistente *E. coli* in de Ourthe voor en na de STEP de Tilff.

- 938 *E. coli* stammenn werden geïsoleerd op een milieu TBX en TBX+AMX en getest op resistentie tegen 12 antibiotica
 - ➔ door AMX toe te voegen werden antibioticaresistente *E. coli* makkelijker gevonden
- Analyses tijdens twee periodes met elk 24 staalname plaatsen in de vallei van de Ourthe (+ Vesdre + Amblève + Meuse):
 - ➔ antibioticaresistente *E. coli* waren aanwezig op alle staalnameplaatsen
 - ➔ geen verschillen tussen seizoenen
- Tijdens de 2 périodes waren resistentieniveaus gelijkaardig;
 - ➔ AMP>AMC>SXT voor het milieu TBX en TBX+AMX
 - ➔ weinig resistentie tegen carbapenems (ETP en MEM)

- Methoden: genotypische testen en sequencerig om genen te kennen versus fenotype
- Andere te testen bacteriën (bv.: *Klebsiella pneumoniae*)
- Studie geografisch uitbreiden en meer types water (ondergronds water (putten), zwemwater (meren), ingang/uitgang STEP, modder STEP,...)
- Op reglementair niveau: nog geen drempelwaarden bepaald (wetgeving)

➔ Nieuwe lopende projecten ivm microbiologie bij ISSeP :

- Het project ESBL is gestart begin juli 2020 voor 2 jaar en beoogt het opsporen van ESBL-producerende *E. coli* in waterlopen in Wallonië, in samenwerking met de dienst bacteriologie van faculteit diergeneeskunde van Luik:
 - Fenotypische (antibiogrammen) en genotypische testen (PCR)
 - Sequencerig om resistoom te leren kennen
- Het project Antibio bug 2 is gestart in januari 2021 voor 1 jaar en beoogt het opsporen van antibioticaresistente *E. coli* in 9 Waalse badplaatsen

Dank voor uw aandacht!