



Miljøministeriet
Miljøstyrelsen

Varslingsværktøj til forebyggelse af spredning af antibiotikaresistens på hospitaler

MUDP rapport

Januar 2021

Udgiver: Miljøstyrelsen

Redaktion:

Claus Jørgensen, DHI A/S

Ulf Nielsen, DHI A/S

Bodil Mose Pedersen, DHI A/S

Figurer: [DHI A/S]

ISBN: 978-87-7038-267-0

Miljøstyrelsen offentliggør rapporter og indlæg vedrørende forsknings- og udviklingsprojekter inden for miljøsektoren, som er finansieret af Miljøstyrelsen. Det skal bemærkes, at en sådan offentliggørelse ikke nødvendigvis betyder, at det pågældende indlæg giver udtryk for Miljøstyrelsens synspunkter. Offentliggørelsen betyder imidlertid, at Miljøstyrelsen finder, at indholdet udgør et væsentligt indlæg i debatten omkring den danske miljøpolitik.

Må citeres med kildeangivelse

Indhold

1.	Forord	5
2.	Sammenfatning	6
3.	Indledning	9
4.	Antibiotikaresistens	10
5.	Metoder	12
5.1	Prøvetagning af spildevand	12
5.2	Patientdata og kliniske isolater	13
5.3	Metoder til kvantifikation af resistens i spildevand.	14
5.3.1	Dyrkningsbaserede metoder	14
5.3.2	Sekventering	14
6.	Resultater	16
6.1	Patientdata og kliniske isolater	16
6.2	VRE/VVE	18
6.2.1	Genfinding af kliniske isolater i spildevandet	18
6.2.2	Korrelation imellem koncentration i spildevandet og isolerede patienter	20
6.3	CPE	24
6.3.1	Genfinding af kliniske isolater i spildevandet	24
6.3.2	Korrelation imellem koncentration i spildevandet og antallet af isolerede patienter	24
6.4	Cefotaxim-resistente <i>E. coli</i>	27
6.5	Metagonomsekventering	28
6.6	Benchmarking imellem hospitaler	30
7.	Diskussion og konklusion	33
7.1	Diskussion	33
7.2	Konklusion	36
8.	Digital platform	37
8.1	Metodebeskrivelser	37
8.2	Resultatpræsentation	37
8.2.1	Tabelleret og visuel præsentation af resultater	37
8.2.2	Etablering af observations- og alarmgrænser	37
8.2.3	Resistensgener	38
8.3	Varsling og aktion	39
8.4	Overvågning af flere hospitaler	39
9.	Referencer	40
	Bilag 1.Prøveoversigt	42

Bilag 1.1	Prøvetagning Herlev og Hillerød hospitaler	42
Bilag 1.2	Afdelinger, Herlev og Hillerød Hospitaler	45
Bilag 1.3	Prøvetagning Slagelse, Thisted, Aalborg og Hjørring hospitaler	46
Bilag 2.Usikkerhedsanalyser, Herlev		47
Bilag 2.1	Enterokokker og VRE	47
Bilag 3.Variation i analyseresultater imellem laboranter		51

1. Forord

Denne rapport handler om antibiotikaresistens, et af tidens helt store globale sundhedsproblemer, og giver et forslag til, hvordan problemet kan reduceres i Danmark og i resten af verden.

Projektets grundlag er et længere samarbejde imellem DHI A/S og Afdeling for Klinisk Mikrobiologi (KMA), Laboratorium på Herlev og Gentofte Hospital om antibiotikaresistens i spildevandet fra Herlev Hospital.

Projektgruppen har bestået af:

Ulf Nielsen, DHI

Claus Jørgensen DHI

Bodil Mose Petersen, DHI

Hanne Wiese Hallberg, KMA

Lene Nielsen, KMA

Dennis Schrøder Hansen, KMA

Projektet er gennemført med tilskud fra Miljøteknologisk Udviklings- og Demonstrationsprogram (MUDP).

2. Sammenfatning

Antibiotikaresistens er en af de største globale udfordringer, idet det fjerner grundstenen i behandling af infektionssygdomme. Det er anslået, at antibiotikaresistens er årsag til, at der årligt er 700.000 mennesker, der dør, og at dette tal vil stige til 10.000.000 i 2050. Antibiotikaresistens forventes at påvirke opnåelse af FN's verdensmål for bæredygtighed kraftigt i negativ retning.

Mange resistensegenskaber forekom hos bakterier i naturen, inden vi begyndte at bruge antibiotika. Efter at vi begyndte at anvende antibiotika, er det sandsynligt, at bakterier med resistente egenskaber fik en fordel, de blev spredt yderligere, og resistensen blev således overført til patogene bakterier hos mennesker og dyr.

Når de resistente patogener først er i tarmen hos mennesker eller dyr, og de behandles, sker en yderligere selektion og spredning f.eks. på hospitaler, i landbruget samt via vand og fødevarer. Fra mennesker spredes antibiotikaresistens via spildevandet tilbage til miljøet.

Der er for nyligt kommet stærke advarsler og anbefalinger fra IAGC (UN Interagency Coordination Group on AMR) om, at der skal handles nu, hvis problemet skal løses. IAGC advokerer kraftigt for en "One Health" model, der indeholder initiativer både hos mennesker, dyr og i miljøet.

Hospitalerne er en vigtig del af spredningsvejen for antibiotikaresistens. Det er også på hospitalerne, at problemerne er mest synlige, fordi hospitalserhvervede infektioner med resistente patogener i alvorlig grad truer lægernes mulighed for at behandle patienterne. Det er desuden her, at forbruget af de mest kritiske antibiotika er højest, hvorfor risikoen for udvikling af resistens og smitte imellem følsomme patienter er størst på hospitaler. Derfor er der et behov for at kunne detektere udbrud af infektioner og forekomst af resistente patogener så tidligt som muligt, så der kan indføres passende foranstaltninger til at hindre spredning.

Hvis man undgår udbrud på hospitaler, vil man også mindske spredningen af resistente egenskaber i miljøet og bidrage til at mindske puljen af resistente gener i naturen.

Formålet med dette projekt har været at udvikle et varslingsværktøj til forebyggelse af spredning af antibiotikaresistens på hospitaler og i det omgivende miljø. Værktøjet er baseret på periodisk måling af antibiotikaresistente bakterier i hospitalsspildevand. Målingerne knyttes til en varslingsprocedure, som skal sætte hospitalet i stand til at intervenere tidligt. Projektet er blevet gennemført i tæt samarbejde med Klinisk Mikrobiologisk Afdeling på Herlev Hospital.

De mest kritiske resistente bakterier er carbapenem resistente *Acinetobacter*, *Pseudomonas* og Enterobakterier. Vancomycin-resistens hos Enterokokker er også prioriteret højt. I dette projekt har fokus i særlig grad været på Carbapenemase Producerende Enterobakterier (CPE) og Vancomycin Resistente Enterokokker (VRE). Det skyldes, at disse bakterier både prioriteres højt af WHO og de danske hospitaler samtidigt med, at Enterobakterier og Enterokokker er fækale og kan monitoreres via spildevand.

I projektet har vi udtaget ugentlige flowproportionale prøver fra indløbet til det renseanlæg, der renser spildevandet fra Herlev Hospital, og stikprøver fra kloakker fra Nordsjællands Hospital, Hillerød. Vi har anvendt både traditionelle dyrkningsbaserede metoder og DNA-sekventering. De dyrkningsbaserede metoder er blevet anvendt til at kvantificere resistente og følsomme Enterokokker og Enterobakterier, så vi har været i stand til at bestemme både koncentrationen

og andelen af resistente Enterokokker og Enterobakterier. DNA-sekventering er anvendt til at karakterisere isolater fra spildevandet og sammenligne dem med kliniske isolater fra patienterne.

Projektets grundlæggende antagelse er, at det er muligt at genfinde resistente bakterier fra patienter i spildevandet fra hospitalerne. For VRE viste resultaterne af sekventeringen, at de fleste af de VRE'er, der er fundet i spildevandet, er identiske med VRE-isolater, som stammer fra patienterne fra samme periode. Der er ikke gennemført sekventering af CPE.

Dette viser, at projektets grundlæggende antagelse - i det mindste for VRE - er opfyldt.

Hvis alle patienter, der er koloniseret med VRE eller CPE, er isoleret, og de afgiver lige mange resistente bakterier, bør der være en lineær sammenhæng imellem koncentrationen af (eller andelen af) de resistente bakterier i spildevandet og antallet af isolerede patienter. Vi har ikke kunnet påvise en lineær sammenhæng imellem koncentrationen af hverken VRE eller CPE i spildevandet og antallet af VRE- og CRO-isolerede patienter på Herlev Hospital, hvor vi har lange analyseserier. De to vigtigste forudsætninger for en lineær sammenhæng, der ikke er opfyldt, er formentlig, at der går tid fra en koloniseret patient indlægges, til patienten isoleres (eller at patienten ikke når at blive isoleret inden udskrivning), og at andelen af VRE og CPE i fæces varierer imellem patienter og falder med tiden. En visuel vurdering af resultaterne viser dog, at der ofte forekommer høje koncentrationer i forbindelse med de registrerede udbrud.

Vi har beregnet aktionsgrænser for koncentrationen af VRE og CPE på baggrund af den tilfældige analytiske variation. Anvendelse af observations- og alarmgrænser giver - på trods af den manglende lineære sammenhæng - mulighed for tidlig varsling. Resultaterne viser, at vi i nogle tilfælde ville kunne have varslet, inden der blev observeret udbrud på Herlev Hospital. I andre tilfælde har vi ikke målinger inden udbruddet, men målingerne under udbruddet giver formodning om, at vi ville have kunnet varsle. Kun et CPE-udbrud ville ikke være blevet varslet, men det overskred dog observationsgrænsen.

Den gennemsnitlige andel af VRE og CPE i spildevandet på et hospital kan anvendes til at vurdere, om hospitalet er koloniseret. Sammenligningen af VRE og CPE og antal isolerede patienter på Herlev Hospital og Nordsjællands Hospital viser, at de gennemsnitlige andele af VRE og CPE stemmer overens med andelen af senge, der er optaget af isolerede patienter. Når vi yderligere inddrager tidligere resultater fra fire andre hospitaler, kan vi se, at der er overensstemmelse imellem forekomsten af resistente VRE og antallet af kliniske prøver (pr. 100.000 indbyggere), der på regionsbasis indsendes til Statens Serum Institut. Vi har på den baggrund identificeret en tærskelværdi imellem et svagt og moderat koloniseret hospital til at ligge omkring 0,3% VRE og 0,05% for CPE.

Sekventering af VRE-isolater fra spildevandet og metagenom sekventering ved DNA-ekstraktion direkte fra spildevandet ved hjælp af Minlon fra Oxford Nano Technologies kan anvendes til at detektere resistensgener direkte fra spildevandet. Resultaterne kan give mere detaljeret information om, hvilke typer af resistens der er tale om. Sekventering af VRE- og CPE-isolater giver udover resistens også information om, hvilke bakterier der bærer resistensen. Sekventering af DNA fra spildevandet giver en taksonomisk karakteristik af, hvilke bakterieslægter og bakteriearter der er dominerende i spildevandet, og som muligvis kan anvendes til andre typer af varsling, f.eks. *Arcobacter*. Resultaterne underbygger, at der er forskelle i fordelingen af resistensgener i spildevandet imellem hospitalerne.

Der er udarbejdet et forslag til en digital platform for et varslingssystem. Platformen skal indeholde data om forekomst af VRE og CPE i spildevandet sammen med eventuelle resultater fra DNA-analyser. Der opstilles observations- og alarmgrænser, som udløser en besked til relevante personer på hospitalet. Grænserne kan være koblet til procedurer, der gør hospitaler i stand til at reagere hurtigt. Da der er et stort flow af patienter imellem hospitalerne, kan der

med fordel laves et fælles system, så en alarm på et hospital kan sendes videre til andre hospitaler, der modtager koloniserede patienter.

3. Indledning

Antibiotikaresistens er internationalt anerkendt som en af de største globale udfordringer, idet det fjerner grundstenen i behandling af infektionssygdomme /1/. Det er anslået, at antibiotikaresistens er årsag til, at der årligt dør 700.000 mennesker, og at dette tal vil stige til 10.000.000 i 2050. De økonomiske tab indtil 2050 kan løbe op svimlende 100 trillioner US\$, hvis der ikke gøres noget /2/.

Set i forhold til FN's verdensmål for bæredygtighed forventes antibiotikaresistens at have en kraftig negativ indflydelse på mulighederne for at opnå målene. Det drejer sig især om målene for fattigdom, økonomisk vækst, ulighed, sundhed, fødevarerproduktion og miljø /3/.

Mange resistensegenskaber forekom hos bakterier i naturen, inden vi begyndte at bruge antibiotika. Efter at vi begyndte at anvende antibiotika, er det sandsynligt, at bakterier med resistente egenskaber fik en fordel, idet de blev spredt yderligere, og resistensen blev overført til patogene bakterier hos mennesker og dyr. Andre resistente egenskaber er sandsynligvis opstået efter udviklingen og anvendelse af nye antibiotika. De resistente egenskaber er båret på genetiske elementer, enten som en del af bakteriernes kromosomer eller på mobile elementer, f.eks. plasmider, der kan overføres horisontalt imellem bakterier af samme art eller imellem arter. Når de resistente patogener først er i tarmen hos mennesker eller dyr, og de behandles, sker en yderligere selektion og spredning f.eks. på hospitaler, i landbruget, via vand og fødevarer. Fra mennesker spredes antibiotikaresistens via spildevandet tilbage til naturen /4/.

Der er for nyligt kommet stærke advarsler og anbefalinger fra IAGC (UN Interagency Coordination Group on AMR) om, at der skal handles nu, hvis problemet skal løses. IAGC advokerer kraftigt for en "One Health" model, der indeholder initiativer på hele kredsløbet beskrevet ovenfor /6/.

Hospitalerne er en vigtig del af spredningsvejen for antibiotikaresistens. Det er også på hospitalerne, at problemerne er mest synlige, fordi hospitalserhvervede infektioner med resistente patogener i alvorlig grad truer lægernes mulighed for at behandle patienterne. Det er også her, at forbruget af de mest kritiske antibiotika er højest. Derfor er risikoen for udvikling af kritisk resistens og smitte imellem følsomme patienter størst på hospitaler. Der er således et behov for at kunne detektere udbrud af infektioner og forekomst af resistente patogener så tidligt som muligt, så der kan indføres passende foranstaltninger til at hindre spredning.

Formålet med dette projekt har været at udvikle et varslingsværktøj til forebyggelse af spredning af antibiotikaresistens på hospitaler og i det omgivende miljø. Værktøjet er baseret på periodisk måling af antibiotikaresistente bakterier i hospitalsspildevand. Målingerne knyttes til en varslingsprocedure, som sætter hospitalet i stand til at intervenere tidligt.

Hvis man undgår udbrud på hospitaler, vil man også mindske spredningen af resistente egenskaber i miljøet og i et eller andet omfang bidrage til at mindske puljen af resistente gener i naturen.

4. Antibiotikaresistens

Antibiotikaresistens hos bakterier kan defineres som evnen til at modstå effekten af antibiotika. Bakterierne har udviklet forskellige resistensmekanismer for de forskellige antibiotika. Nedenfor er beskrevet baggrunden for udvælgelse og beskrivelse af de resistenstyper, som projektet fokuserer på.

WHO /7/ har gennemført en risikovurdering af, hvilke resistenser der er de mest kritiske. De har opstillet tre prioritetsgrupper. Første prioritet (kritisk) er ¹bl.a. carbapenem- og 3. generation cephalosporinresistens hos Enterobakterier, herunder *Klebsiella pneumoniae* og *Escherichia coli*. Anden prioritet (høj) er ²bl.a. vancomycinresistens hos *Enterococcus faecium*.

I projektet fokuseres derfor på resistens overfor vancomycin hos Enterokokker (vancomycin-resistente Enterokokker, VRE, variable vancomycin-resistente Enterokokker, VVE) og resistens over for betalaktam antibiotika repræsenteret ved carbapenemresistens hos *E. coli* og coliforme bakterier (CPE) og 3. generations cephalosporinresistens hos *E. coli* (CEF-EC). Enterokokker og coliforme bakterier er hovedsageligt fækale og vil kunne genfindes i spildevandet.

Vancomycin er et glycopeptid antibiotikum (ATC kode: J01XA01 og A07AA09). Vancomycin hæmmer dannelse af cellevæggen hos grampositive bakterier. Det sker ved, at vancomycin binder sig til et pentapeptid, der indgår i syntesen af cellevæggen. Når vancomycin er bundet til pentapeptidet, kan det ikke indgå i cellevæggen. Dermed hæmmes dannelse af cellevæggen. Resistensen opstår ved, at bakterien ændrer sit pentapeptid, så vancomycins binding til pentapeptidet mindskes. Ændringen kræver mindst 7 forskellige enzymer. Generne til disse enzymer ligger i operons, hvoraf de vigtigste er VanA og VanB. Vancomycinresistens kan overføres horisontalt, f.eks. imellem Enterokokker og imellem Enterokokker og Stafylokokker /8/.

Der findes en variabel modifikation af VanA, som indeholder et genetisk element, der hæmmer aktivering af VanA. Dette genetiske element kan fraselekteres ved tilstedeværelse af vancomycin. Variable vancomycin-resistente Enterokokker (VVE) er følsomme for vancomycin og vokser derfor normalt ikke på medier med vancomycin inden for den normale analysetid, men de kan ændre sig til at være resistente efter længere tids eksponering, f.eks. i forbindelse med en vancomycin-behandling /9/. Problemet med VVE er, at den ofte ikke detekteres med almindelige dyrkningsbaserede metoder.

Betalaktam-antibiotika består af penicilliner (ATC J01C) og andre Betalaktamer (ATC J01D). Betalaktamer hæmmer dannelse af cellevæggen hos bakterier ved at binde sig til "Penicillin Binding Proteins" (PBP). PBP'erne er vigtige for syntesen af cellevæggen. Resistens over for β -laktam antibiotika opstår ved, at bakterierne danner β -laktamaser, som er enzymer, der kan hydrolysere β -laktamringen i β -laktam antibiotika. Når β -laktamringen er hydrolyseret, inaktiveres β -laktam antibiotikummet. Bush 2018 /10/ har opgjort, at der findes mere end 2700 forskellige β -laktamaser. Nogle β -laktamaser er i stand til at hydrolysere 3. generations cephalosporiner (J01DD) og carbapenemer (J01DH). Eksempler på β -laktamaser er TEM, KPC, OXA og

¹ Øvrige er carbapenemresistens hos *Acinetobacter baumannii* og *Pseudomonas aeruginosa*

² Også resistenser hos *Staphylococcus aureus*, *Helicobacter pylori*, *Campylobacter*, *Salmonella* spp. og *Neisseria gonorrhoeae*

NDM. De gener, der koder for disse, kan overføres horisontalt imellem gramnegative bakterier, hovedsageligt på plasmider, der er små ringformede DNA-stykker. /10/

Endvidere findes AmpC β -lactamaser, som giver resistens mod penicilliner, cephalosporiner, caphamyciner og monobactamer. AmpC er hovedsageligt kromosomal. AmpC findes hovedsageligt i "SPACE bugs": *Serratia*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Citrobacter* og *Enterobacter*. AmpC anses for at være et mindre problem end KPC, OXA og NDM.

5. Metoder

5.1 Prøvetagning af spildevand

Prøvetagningens omfang fremgår af Tabel 4-1 og Bilag 1.

I 2018 blev der udtaget prøver 42 gange. På Herlev Hospital blev prøverne udtaget flowproportionalt over cirka 24 timer ved tilløbet til hospitalets renseanlæg, som indeholder al spildevand fra hospitalet. Prøvetageren blev startet om formiddagen og prøven hentet den følgende formiddag på de angivne prøvetagningsdatoer (Bilag 1.1). De flowproportionale prøver havde et volumen på ca. 10 L. Prøven blev opbevaret i køleskab i løbet af prøvetagningen. Efter udtagningen blev prøven vippet og vendt ca. 10 gange inden udtagning af en delprøve på ca. 250 ml. Tilløbet til renseanlægget indeholder spildevand fra hele Herlev Hospital. På Nordsjællands Hospital blev prøverne udtaget som ca. 300 ml stikprøver ved hjælp af en teleskobstang med steriliseret (alkohol) bægerglas. Prøverne fra Nordsjællands Hospital blev enten taget i Brønd 11 eller i Brønd 52. Det fremgår af Bilag 1.2, hvilke afdelinger der leder spildevand til brøndene. I perioden fra 2014 til 2017, inden starten af dette projekt, blev der endvidere udtaget 33 prøver på Herlev Hospital.

De flowproportionale prøver er med få undtagelser udtaget fra mandag til tirsdag og analyseret tirsdag. Stikprøverne er med få undtagelser udtaget tirsdag. Prøvetagning på den samme dag er gennemført for at undgå systematiske ugentlige variationer med henblik på at kunne undersøge variationen over længere perioder.

Prøverne til Herlev og Nordsjællands hospitaler blev leveret på laboratoriet inden for en time efter prøvetagning og opbevaret på køl inden igangsætning af analyserne, som blev udført samme dag som prøvetagningen.

Den 6. september samt den 15. november, 2016 er der herudover udtaget 3 stikprøver fra forskellige brønde med spildevand fra RHN Thisted, 3 prøver på RHN Hjørring og 2 prøver på AUH Syd. Der er yderligere udtaget 2 prøver på AUH Syd den 14. februar 2017, og endelig er der udtaget 4 stikprøver fra forskellige brønde ved Slagelse Sygehus den 17. maj og den 30. august, 2016 samt 4 prøver 24. januar 2017. Prøverne fra Nordjylland er transporteret til laboratoriet i køletaske og analyseret dagen efter. Prøverne fra Slagelse er transporteret i køletaske og analyseret samme dag.

Tabel 4-1 viser en oversigt over de udtagne prøver.

Table 4-1. Oversigt over prøver, der indgår i projektet

Hospital	Antal prøver	Prøvetagningsperiode	Lokalitet	Prøvetagningsmetode
Herlev Hospital	10	28-10-2014 - 13-1-2015	Renseanlæg	Flow integreret
Herlev Hospital	2	23-9-2015 – 21-10-2015	Renseanlæg	Flow integreret
Herlev Hospital	10	11-5-2016 – 13-9-2016	Renseanlæg	Flow integreret
Herlev Hospital	11	07-02-2017 – 09-05-2017	Renseanlæg	Flow integreret
Herlev Hospital	26	23-01-2018 – 17-07-2018	Renseanlæg	Flow integreret
Herlev Hospital	16	30-8-2018 – 18-12-2018	Renseanlæg	Flow integreret
Hillerød Hospital	5	17-4-2018 – 15-5-2018	Brønd 11	Stikprøve
Hillerød Hospital	9	23-5-2018 – 17-7-2018	Brønd 52	Stikprøve
Thisted Hospital	6	06-09 and 15-11 2016	Tre brønde	Stikprøve
Hjørring Hospital	6	06-09 and 15-11 2016	Tre brønde	Stikprøve
Ålborg South Hospital	6	06-09, 15-11 2016 and 14-02-2017	To brønde	Stikprøve
Slagelse Hospital	12	17-05, 30-08 2016, 24-01-2017	Fire brønde	Stikprøve

5.2 Patientdata og kliniske isolater

Når der udtages patientprøver af blod og urin, undersøges de for VRE/VVE og CPE, hvis det vurderes at være klinisk relevant. Desuden undersøges fæcesprøver i forbindelse med screeningsundersøgelser på Herlev Hospital. Isolater af Enterokokker analyseres med PCR for at detektere både VRE og VVE. CPE analyseres ved dyrkningsmetoder. Positive resultater rapporteres til SSI, som vedligeholder en dansk landsdækkende mikrobiologidatabase over mikrobiologiske undersøgelsesresultater.

Hvis en patient diagnosticeres som VRE/VVE- eller CPE-positiv på Herlev Hospital og på Nordsjællands Hospital, Hillerød, isoleres patienten. Desuden screenes patientens naboer (screeningsprøver). Hvis en af naboerne er positive, screenes hele afdelingen. Hvis flere patienter i afdelingen er positive, screenes afdelingen, indtil alle er negative.

VRE/VVE- og CPE-positive patienter isoleres for at undgå spredning til andre patienter. Isolationen sker ved, at patienten ligger på enestue, og at personale og besøgende tager engangskittel på, inden de går ind på stuen, og af igen på vej ud. Patienter anses for at være VRE-positive indtil 6 mdr. efter den seneste positive prøve.

Registreringen af antallet af VRE/VVE/CPO-isolerede patienter på Herlev Hospital og Nordsjællands Hospital er foregået ved, at antallet af isolerede patienter er talt på daglig basis med undtagelse af weekender og enkelte andre dage. Herlev Hospital har stillet data vedrørende antallet af isolerede patienter til rådighed for projektet /15/. På Herlev Hospital er registreringen begyndt den 20-10-2016. På Nordsjællands Hospital er registreringen begyndt den 1-1-2018.

Herlev Hospital, Klinisk Mikrobiologisk Afdeling, har stillet data vedrørende antallet af positive VRE/VVE/CPE-prøver til rådighed for projektet /15/. SSI /17/ har stillet data vedrørende antal positive kliniske prøver på regionsplan til rådighed for projektet. Data fra SSI indeholder kun kliniske isolater; ikke data fra screeninger.

5.3 Metoder til kvantifikation af resistens i spildevand.

Der er blevet gennemført bestemmelse af koncentrationen af Enterokokker, *E. coli* og coliforme bakterier, vancomycin-resistente Enterokokker (VRE) og variable vancomycin-resistente Enterokokker (VVE), Meropenem-resistente Enterobakterier (CPE) og 3. gen. Cephalosporin-resistente *E. coli* (CEF-EC). Det er således både muligt at angive koncentrationen og andelen af de resistente bakterier. Der er desuden gennemført karakterisering af udvalgte bakterielle isolater fra spildevand og anonymiserede isolater fra patienter.

5.3.1 Dyrkningsbaserede metoder

Vancomycin-resistente Enterokokker (VRE) og variable vancomycin-resistente Enterokokker (VVE)

Koncentrationen af Enterokokker blev bestemt som det mest sandsynlige antal (MPN) med Enterolert Quanti-Trays (IDEXX) efter producentens anvisning. Fortyndinger af prøven blev anvendt for at opnå koncentrationer, der lå inden for det metodens analytiske område. For at detektere VRE og VVE blev der tilsat vancomycin og cefotaxim til Enterolert mediet. Sidstnævnte blev tilsat for at undertrykke vækst og fluorescens af gram-negative bakterier.

I forbindelse med de tidlige undersøgelser blev det konstateret, at næsten alle positive brønde i Enterolert Quanti-Trays indeholdt VRE. En yderligere undersøgelse viste, at 14 ud af 14 Enterokokker, der var isoleret fra positive Enterolert Quanti-Trays, var VRE.

En undersøgelse af 12 VVE isolater fra patienter på Herlev Hospital blev podet i Enterolert flasker. Ni af de 12 isolater gav fluorescens inden for 24 timer \pm 1 time. I resten af rapporten vil vi antage, at Enterolert både detekterer VRE og VVE, og benævne dem VRE.

Vi konkluderer, at Enterolert med tilsætning af vancomycin og cefotaxim er velegnet til bestemmelse af VRE, og at en overvejende del af VVE bestemmes med analysen.

Meropenem-resistente Enterobakterier (CPE)

Koncentrationen af coliforme bakterier blev bestemt ved indstøbning af spildevand eller fortyndinger af spildevand på Chromocult® Coliform Agar (CCA) fra Merck (2016) eller Brilliance agar (BRA) fra Oxoid (2017 og 2018). Årsagen til skiftet af agar var, at CCA ikke var tilgængelig i en periode. Agar agar blev fremstillet ifølge producenternes anvisninger. Agar agar blev afkølet og blandet med prøven. CPE blev bestemt ved at Agar agar blev afkølet og tilsat Meropenem til bestemmelse af CPE. Agarpladerne blev inkuberet ved 36 °C \pm 2 °C i 24 timer \pm 1 time. Violette kolonier blev tolket som *E. coli*, lyserøde kolonier som coliforme bakterier (andre end *E. coli*).

Metoden indebærer en risiko for falske positive resultater, herunder "SPACE bugs" (se på side 10). Der er udvalgt 16 CPE isolater fra BRA agar, som er blevet analyseret med MALDI-ToF på KMA, Herlev. Ud af de 16 isolater var 14 Enterobakterier. Heraf lignede 13 OXA-48 og 1 NDM.

3. gen. Cephalosporin-resistente Enterobakterier (CEF_EC)

Bestemmelse af resistens imod 3. generations cephalosopriner har været udført som for CPE, men med tilsætning af cefotaxim, som en repræsentant for 3. generations cephalosopriner, til agaren. For at undgå "SPACE bugs" og AmpC har vi kun medtaget resultater fra *E. coli*, dvs. violette eller mørkt blå kolonier. Der er ikke lavet undersøgelser af graden af falske positive.

5.3.2 Sekventering

Sekventering med Illumina på KMA, Herlev Hospital

Genomisk DNA fra 14 VRE-isolater blev ekstraheret, fragmenteret og forberedt til sekventering. Efter sekventering blev reads samlet, og relevante gener blev kvalitetssikret og identificeret ved sammenligning med databaser for resistens, virulens og plasmider (ResFinder 2.1, VirulenceFinder 1.5 and PlasmidFinder 1.3).

Sekventering med Minion, Oxford Nano Technologies, på DHI

Ni VRE-isolater blev sekventeret med Minion fra Oxford Nanopore Technologies /11/. Isolaterne blev dyrket og vasket. Kulturen blev ekstraheret og forberedt iflg. Nanopore Protokol for 1D Native barcoding genomic. Den forberedte DNA blev sekventeret på en Spot On Flow Cell. Data blev analyseret via Nanopores databaser: QC og Barcoding, WIMP (What's In My Pot) og AMRA Card.

Desuden blev der ekstraheret DNA direkte fra spildevandsprøver udtaget på Herlev Hospital den 3/5 og den 7/6 2019 samt på Slagelse Sygehus den 3/5 2019. Data blev analyseret via Nanopores databaser på samme måde som VRE-isolaterne.

6. Resultater

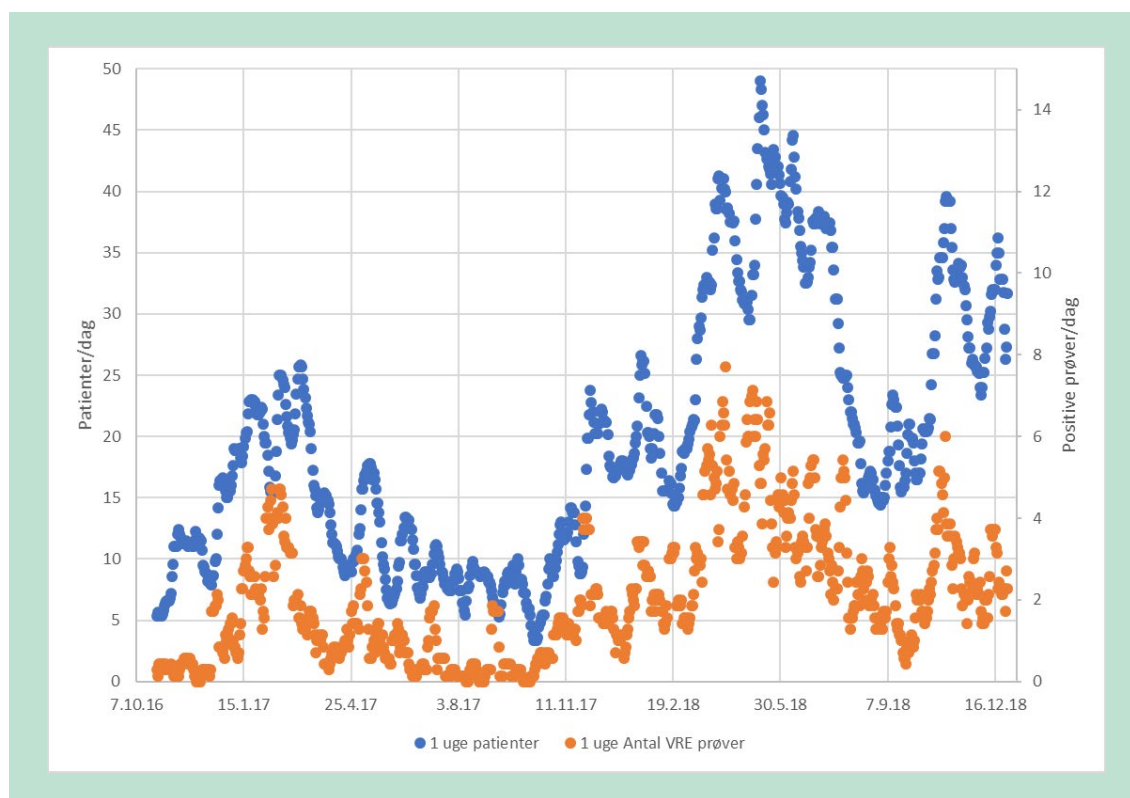
6.1 Patientdata og kliniske isolater

Registreringen af antallet af VRE-isolerede patienter på Herlev Sygehus foregår ved, at antallet af isolerede patienter tælles på daglig basis med undtagelse af weekender og enkelte andre dage. Figur 5-1 viser det daglige antal isolerede VRE-patienter bestemt som gennemsnit over den seneste uge. I 2017 var antallet højest om vinteren (cirka 25 patienter/dag) og lavest om sommeren (5 til 10 patienter/dag). Fra slutningen af februar 2018 steg antallet af VRE-isolationer til omkring 45 patienter/dag. Fra slutningen af juli 2018 faldt antallet til 2017 vinterniveauet (15 – 20 patienter/dag) for at begynde at stige igen i oktober. Det højeste antal registrerede VRE-isolerede patienter var 52 patienter/dag med et gennemsnit på 19,7 patienter/dag. Det ses, at antallet af kliniske isolater og antallet af isolerede patienter følger hinanden, hvilket var forventeligt, da det er detektion af VRE, der udløser isolation.

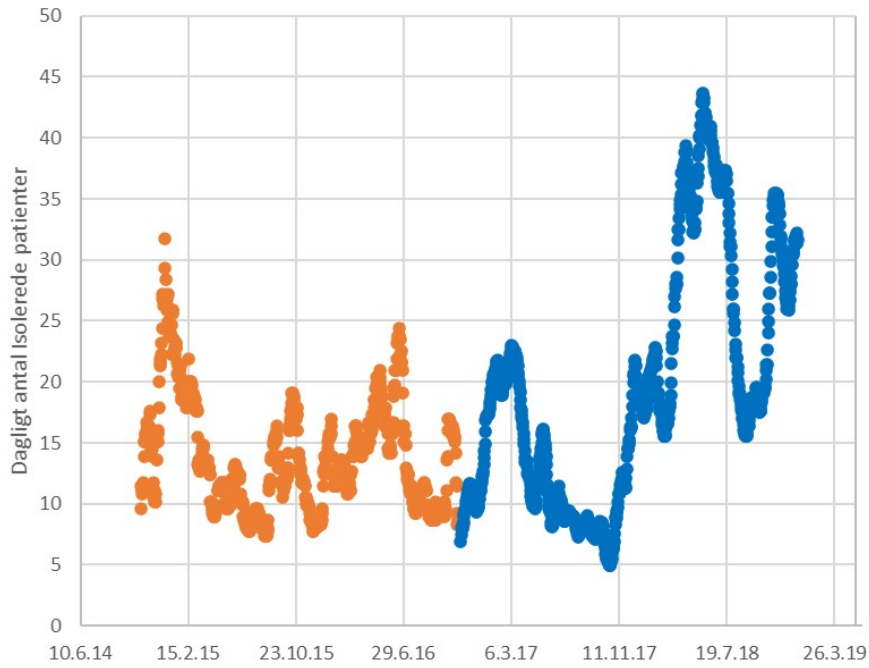
Lineær regression imellem antallet af positive prøver og antallet af isolerede VRE-patienter har vist, at den bedste lineære sammenhæng ($R^2 = 0,8578$) fås for de løbende 4 ugers gennemsnit:

$$VRE \text{ Patienter} = 0,1289 \times \text{Antal VRE prøver} - 0,4954$$

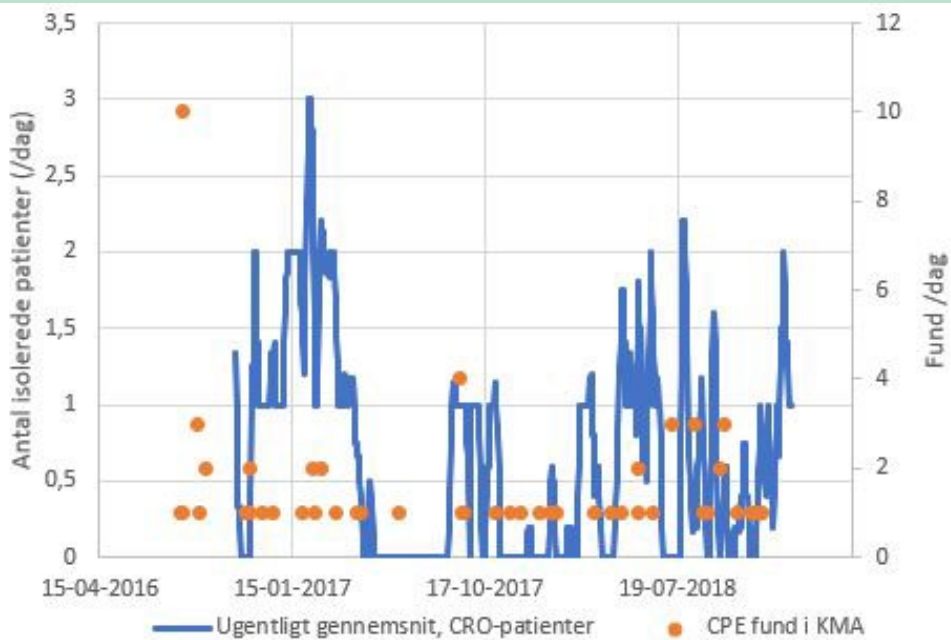
Denne sammenhæng har været anvendt til at estimere antallet af patienter, der var isoleret, inden registreringen af isolerede patienter begyndte (Figur 5-2).



Figur 5-1. Løbende ugentligt gennemsnit af VRE-/VVE-isolerede patienter og gennemsnitligt antal VRE-positive prøver over den seneste uge på Klinisk Mikrobiologisk Afdeling på Herlev Hospital. For patienterne indgår dage uden registrering ikke i beregningen. For antal prøver indgår dage uden positive prøver i beregningen.



Figur 5-2. Løbende antal VRE-isolerede patienter. Registreret (blå) og ekstrapoleret fra antallet af VRE-positive prøver modtaget på KMA, Herlev Hospital (Orange).



Figur 5-3. Ugentligt gennemsnit af CPE isolerede patienter sammenlignet med daglige fund af CPE på Herlev Hospital.

Antallet af CPE isolerede patienter (ugentligt gennemsnit) og de daglige fund af CPE er vist i Figur 5-3. Der er fundet langt færre CPE'er end VRE'er. Der blev fundet 20 CPE'er i 2017 og 30 CPE'er i 2018. De sporadiske CPE-fund betyder, at der er færre isolerede patienter, og at sammenhængen ikke er tydelig, som den er for VRE. Der er forhøjede antal CPE-isolationer i starten af 2017, i efteråret 2017, og hen over sommeren 2018.

6.2 VRE/VVE

6.2.1 Genfinding af kliniske isolater i spildevandet

Illumina sekventeringen af kliniske VRE isolater og spildevandsisolater viste, at der er overensstemmelse imellem de fleste VRE spildevandsisolater og de kliniske VRE isolater, og det konkluderes, at de kliniske isolater genfindes i spildevandet (data ikke vist).

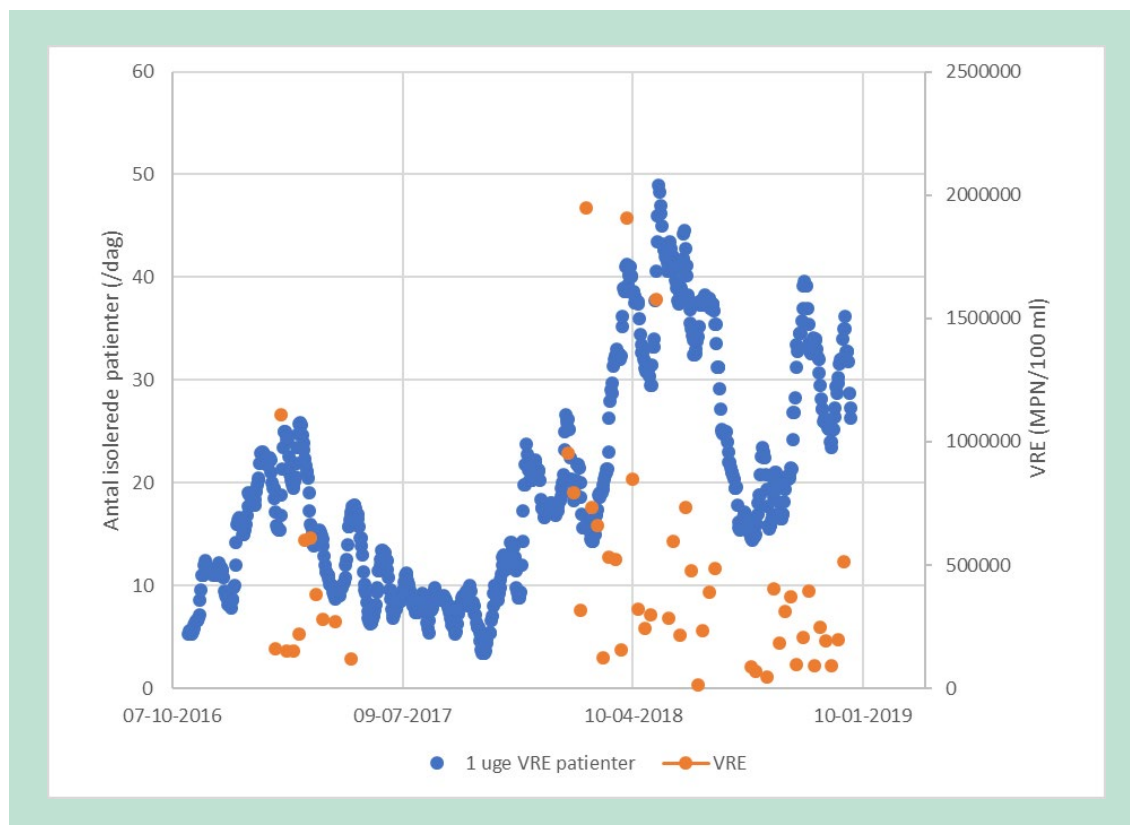
Tabel 5-1. Karakteriseringen af 9 VRE isoleret fra spildevand fra Herlev Hospital med Minion, Oxford Nanopore Technologies.

Isolate	Isolations- dato	Prelim ID	ID, Minion	¹ Minion %	Resistens Minion	Resistens Illumia
122	28-6-2018	<i>E. faecium/faecalis</i>	<i>E. faecium</i>	99%	vanB	VanB
124	28-6-2018	<i>E. gallinarum/casseliflavus</i>	<i>Gallinarum casseliflavusfae- cium</i>	24% 12% 9%	vanC	VanB
125	28-6-2018	<i>E. faecium/faecalis</i>	<i>E. faecium</i>	98%	vanB	VanB
129	2-7-2018	<i>E. faecium/faecalis</i>	<i>E. faecium</i>	98%	vanB+vanA	VanB
130	2-7-2018	<i>E. faecium/faecalis</i>	<i>E. faecium</i>	97%	vanB	VanB
132	5-7-2018	<i>E. faecium/faecalis</i>	<i>E. faecium</i>	96%	vanA	VanA
140	20-7-2018	<i>E. faecium/faecalis</i>	<i>E. faecium</i>	98%	For få reads	VanA
141	20-7-2018	<i>E. faecium/faecalis</i>	<i>E. faecium</i>	96%	vanA	VanA
143	20-7-2018	<i>E. faecium/faecalis</i>	<i>E. faecium</i>	97%/98%	vanA	VanA

¹Andel af klassificerede reads der er henført til denne art.

Resultaterne fra karakterisering af 9 VRE-isolater fra spildevandet fra Herlev Hospital vjh. af Minion er vist i Tabel 5-1. Der ses god sammenhæng med den præliminære identifikation (på Chrom Agar) og Minion identifikationen. Desuden er der god overensstemmelse med de foreløbige resultater fra Illumina sekventeringen, idet adskillelsen imellem VanA og VanB er ens.

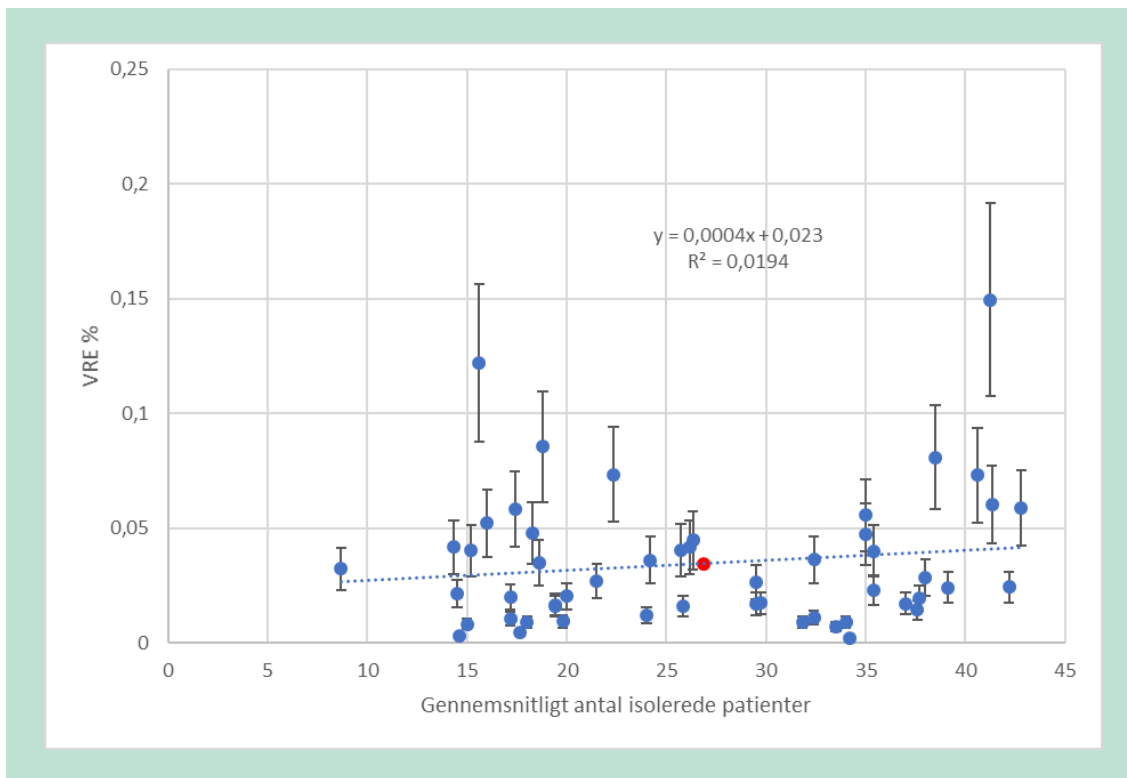
6.2.2 Korrelation imellem koncentration i spildevandet og isolerede patienter



Figur 5-4. Udvikling i målt koncentration af VRE i spildevandet fra Herlev Hospital og løbende ugentlige gennemsnit af antallet af isolerede patienter/dag på Herlev Hospital for analyser gennemført i 2017 og 2018.

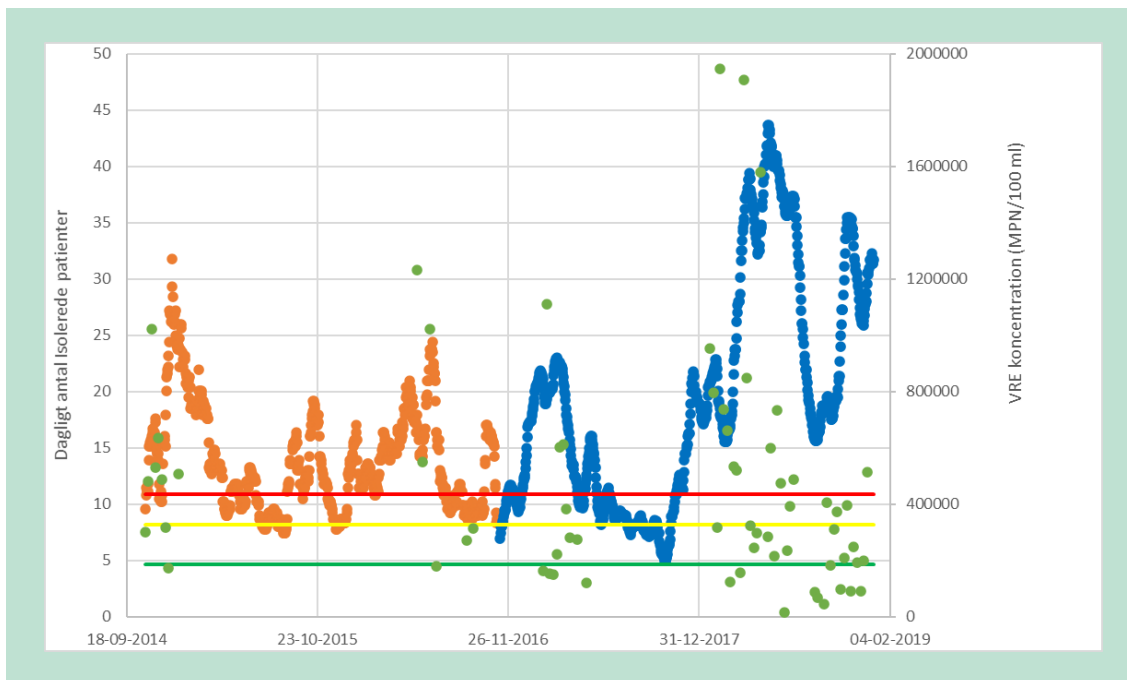
Figur 5-4 **Error! Reference source not found.** viser koncentrationen af VRE i spildevandet og det løbende ugentlige gennemsnit af antallet af isolerede patienter i 2017 og 2018. Den gennemsnitlige koncentration (geometrisk) var 300.000 VRE/100 ml. Det gennemsnitlige antal isolerede patienter var 20 patienter/dag.

Andelen af VRE varierede imellem cirka 1% og 6% og lå i gennemsnit (geometrisk) på 2,4%.



Figur 5-5. Scatterplot af relation imellem det gennemsnitlige (den forudgående uge) antal isolerede patienter og andelen af VRE. Regressionsformlen er angivet. Usikkerheden er angivet som 1 x standard afvigelse (s = 27%). Den røde plet er gennemsnittet af de øvrige punkter. Data 7/2 2017 til 18/12 2018. N = 52.

Figur 5-5 **Error! Reference source not found.** viser den observerede sammenhæng imellem koncentrationen af VRE og andelen af VRE i spildevandet fra Herlev Hospital og det gennemsnitlige antal isolerede patienter (over den seneste uge) på Herlev Hospital. Der ses en meget svag positiv korrelation for den procentvise VRE-andel, men der er ikke en lineær sammenhæng. Sammenligningen imellem koncentrationen af VRE og antal isolerede patienter giver ikke yderligere information (data ikke vist).



Figur 5-6. Dagligt antal af isolerede patienter (blå og orange punkter) sammenlignet med koncentration af VRE i spildevandet fra Herlev Hospital (grønne punkter). Orange punkter er ekstrapoleret fra antallet af kliniske isolater fra KMA (se afsnit 5.1). De vandrette linjer er aktionsgrænser udledt i afsnit 7.2.2.

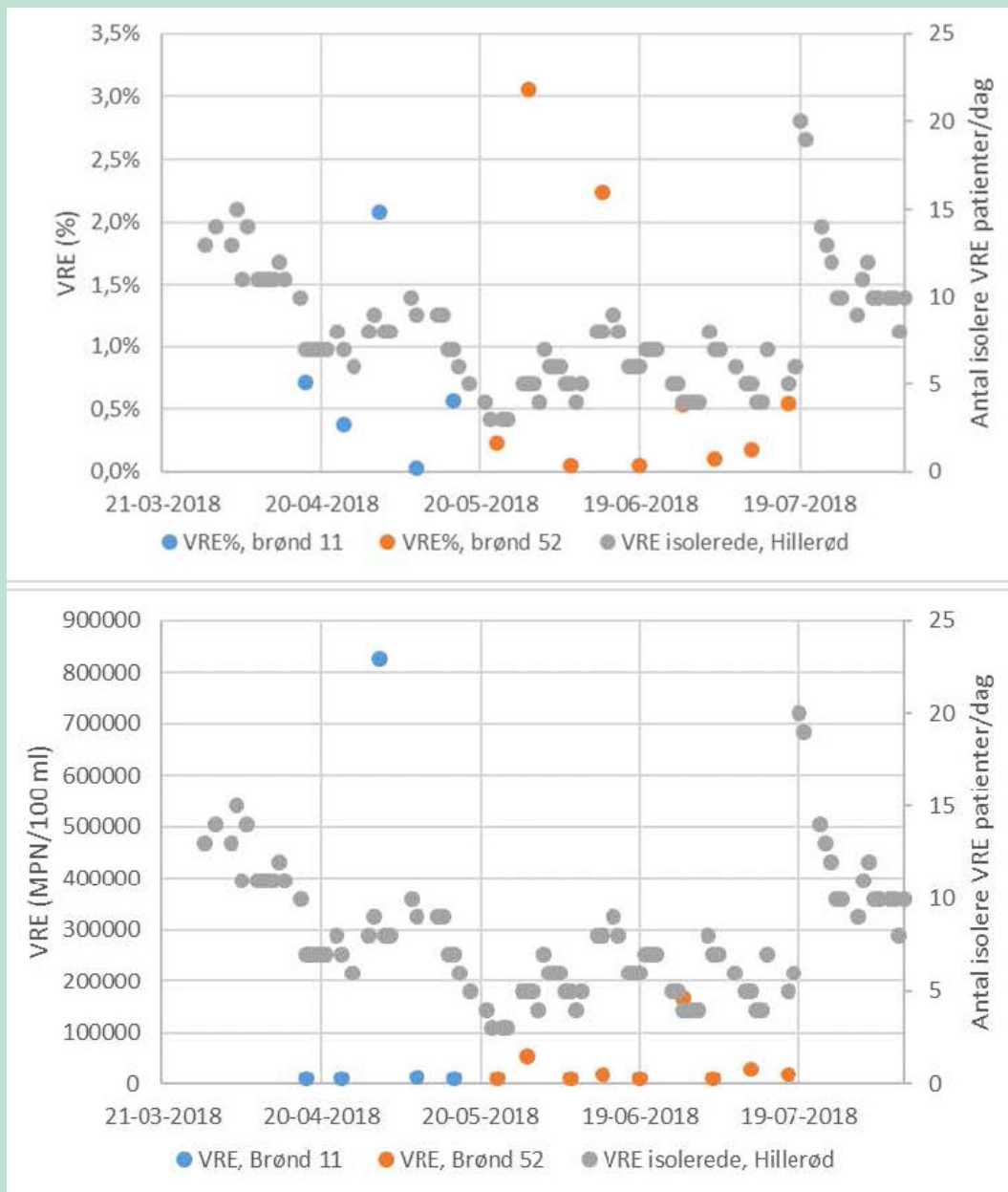
På Figur 5-6 er alle resultater (okt. 2014 til dec. 2018) fra bestemmelse af VRE i spildevandet vist sammen med antallet af indlagte patienter og aktionsgrænser udledt i afsnit 7.2.2.

Ved en detaljeret gennemgang af resultaterne ses det, at:

- Målingen 1/11 2014 ville have givet alarm inden udbruddet i 2014.
- Der var målinger over alarmgrænsen i maj og juni 2016 under udbruddet i første halvdel af 2016.
- Der var målinger over alarmgrænsen under udbruddet i februar og marts 2017.
- Der var målinger over alarmgrænsen under udbruddet i januar til juli 2018.
- Der var ingen målinger over alarmgrænsen i starten af udbruddet i november 2018, men 3 målinger over observationsgrænsen.

Resultaterne viser altså, at der på trods af den manglende lineære sammenhæng imellem antallet af indlagte patienter og koncentrationen af VRE i spildevandet ville kunne være givet varsel inden udbruddene i 2014 og november 2018. For de øvrige udbrud har vi ingen forudgående målinger, men målinger over alarmgrænsen under udbruddet. Havde vi haft målinger inden udbruddene, kunne vi muligvis have varslet, inden de blev registreret på hospitalet.

Aktionsgrænser på baggrund af andelen af VRE gav ikke yderligere informationer, der kunne anvendes til varsling.



Figur 5-7. Udvikling i koncentrationen (nederst) og andelen (øverst) af VRE i spildevandet fra Nordsjællands Hospital, Hillerød i 2018 og antallet af isolerede patienter/dag på Nordsjællands Hospital, Hillerød. Prøver udtaget i Brønd 11 i starten af perioden og i Brønd 52 i slutningen. Se Bilag 1.2 for information om, hvilke afdelinger der bidrager til spildevandet i de to brønde.

Figur 5-7 viser resultaterne af overvågningen af VRE i spildevandet fra Nordsjællands Hospital, Hillerød. Den gennemsnitlige koncentration (geometrisk) var 23.000 VRE/100 ml, og den gennemsnitlige (geometriske) andel var 0,3 %. Det gennemsnitlige antal isolerede patienter var 6,2 patienter/dag. Det højeste antal var 21 patienter/dag (26/2-2018).

Prøverne fra Hillerød Hospital er udtaget fra 2 forskellige brønde, der modtager spildevand fra forskellige afdelinger. De isolerede patienter ligger hovedsageligt på Infektionsmedicinsk Afdeling og Intensiv Afdeling, der leder spildevand til brønd 52. Der har dog tidligere været observeret udbrud på Kirurgisk Afdeling, der leder spildevand til brønd 11 /15/. Den store stigning i antallet af isolerede patienter fra 6 patienter/dag den 18/7 til 20 patienter/dag den 19/7 er

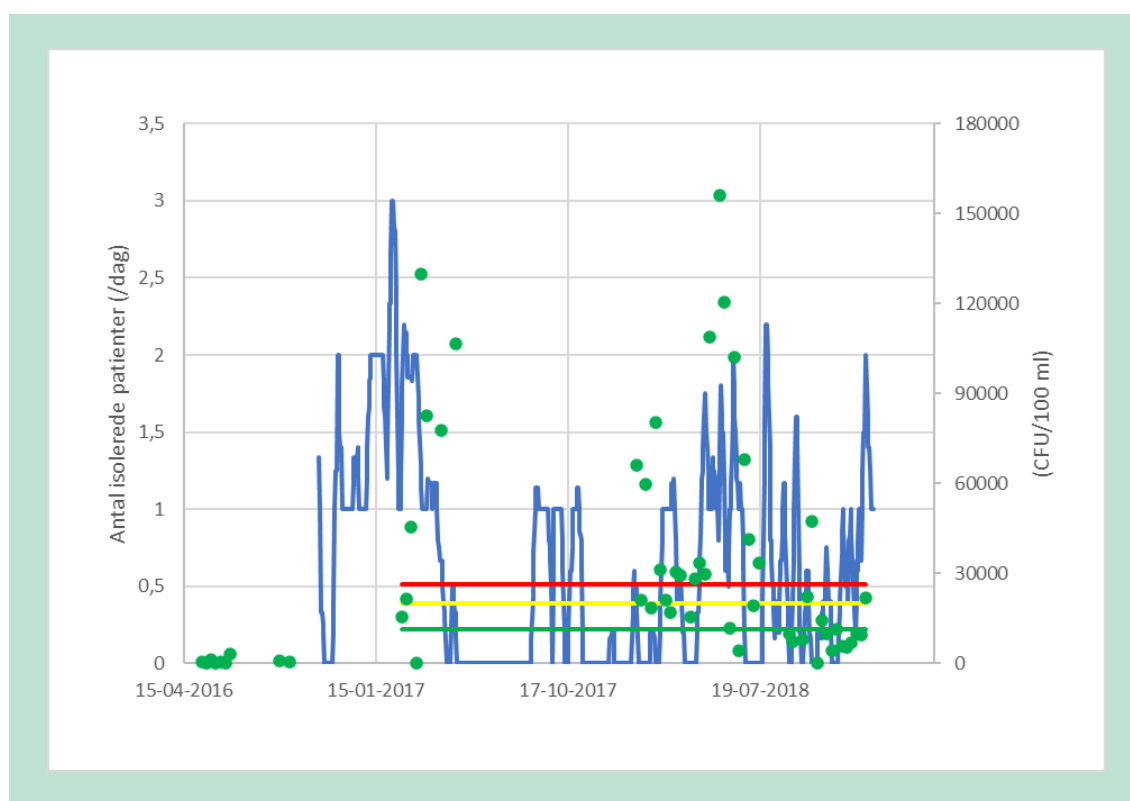
sandsynligvis resultatet af en screening, der fra den ene dag til den anden har medført isoleringen. Dvs. at der sandsynligvis i perioden op til den 18/7 har været et mørketal af VRE-inficerede patienter. Det antages, at de isolerede patienter lå på afdelingerne, der leder spildevand til Brønd 52. Der er en tendens til en stigning i andelen af VRE i perioden op til den 17/7, men stigningen kan lige så godt være tilfældig. Sammenligningen imellem koncentrationen af VRE og antal isolerede patienter giver ikke yderligere information (data ikke vist).

6.3 CPE

6.3.1 Genfindning af kliniske isolater i spildevandet

Der er endnu ikke gennemført sammenlignende sekventering af CPE isoleret fra patienter og CPE isoleret fra spildevand, men den fenotypiske metode (Se afsnit 4.3.1), tyder på at der også er overensstemmelse imellem patient- og spildevandsisolater.

6.3.2 Korrelation imellem koncentration i spildevandet og antallet af isolerede patienter



Figur 5-8. Dagligt antal af isolerede patienter (blå linje) sammenlignet med koncentration af CPE i spildevandet fra Herlev Hospital (grønne punkter). De vandrette linjer er aktionsgrænser udledt i afsnit 7.2.2.

Figur 5-8 viser koncentrationen af meropenem resistente coliforme bakterier (CPE) i spildevandet samt det løbende ugentlige gennemsnit af antallet af CRO isolerede patienter i 2017 og 2018. Den gennemsnitlige (geometriske) koncentration var 20.000 CPE/100 ml. Det gennemsnitlige antal isolerede patienter var 0,75 patienter/dag. Den gennemsnitlige andel af CPE var 0,2% (data ikke vist). CRO-patienterne indeholder både CPE-koloniserede patienter og patienter, der er koloniseret med non-Enterobacteriaceae, f.eks. *Acinetobacter baumannii*. Vi kan ikke skelne mellem patienter, der er koloniseret med CPE, og patienter, der er koloniseret med

carbapenemase-producerende non-*Enterobacteriaceae*. Vi ved dog, at alle de 7 CRO positive³ prøver fra prøvetagningsperioden i 2017 var CPE'er, og at 29 ud af 33 CRO positive³ prøver i 2018 var CPE. Derfor anser vi CRO-patienter for at være repræsentative for CPE-patienter i de perioder, hvor der blev gennemført spildevandsanalyser.

Den lineære korrelation imellem koncentrationen af CPE i spildevandet og antallet af isolerede patienter er vist i Figur 5-9. Der ses en svag positiv tendens, men der er ikke lineær sammenhæng. Hvis man plottes andelen af resistente imod antallet af CRO-patienter, er der en negativ tendens (data ikke vist).

På Figur 5-8 er resultater fra bestemmelse af CPE i spildevandet vist sammen med antallet af indlagte patienter og aktionsgrænser udledt i afsnit 7.2.2.

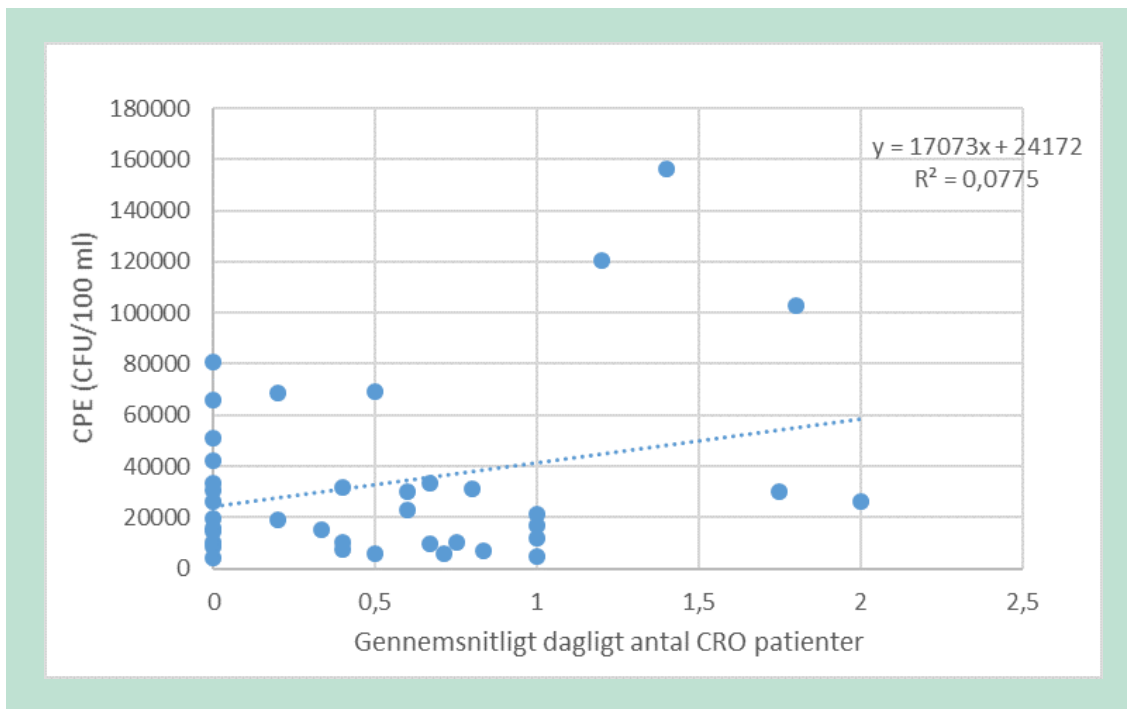
Ved en detaljeret gennemgang af resultaterne ses det, at:

- Målingerne i januar 2017 gav høje værdier samtidigt med, at der var et udbrud.
- Fra januar til oktober 2018 var der mange målinger over alarmgrænsen, som falder sammen med det vedvarende udbrud i 2018. Tre af disse forekom, inden udbruddet tog fart i marts, og ville have givet varsel.
- Udbruddet i december er ikke modsvaret af en høj koncentration i spildevandet.

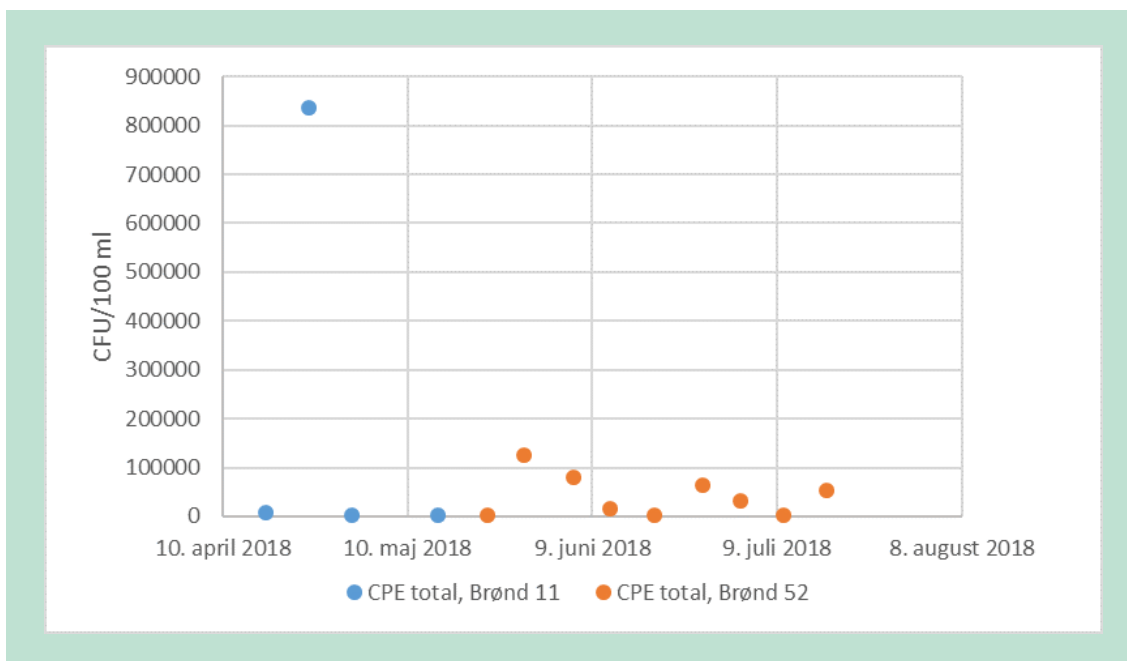
Resultaterne viser altså, at der på trods af den manglende lineære sammenhæng imellem antallet af indlagte patienter og koncentrationen af CPE i spildevandet ville kunne være givet varsel inden udbruddet i 2018. Derimod kunne der ikke være givet varsel for udbruddet i december 2018. Det skal tages med i betragtning, at de registrerede udbrud har mellem 1 og 3 patienter.

Aktionsgrænser på baggrund af andelen af CPE gav ikke yderligere informationer, der kunne anvendes til varsling.

³ Inkluderer både Resistente (R) og Intermediært (I) resistente prøver.



Figur 5-9. Scatterplot af sammenhængen imellem det gennemsnitlige (den forudgående uge) antal CRO-isolerede patienter og koncentrationen af CPE på Herlev Hospital. Data fra 31/1 til 18/12 2018. N = 38.

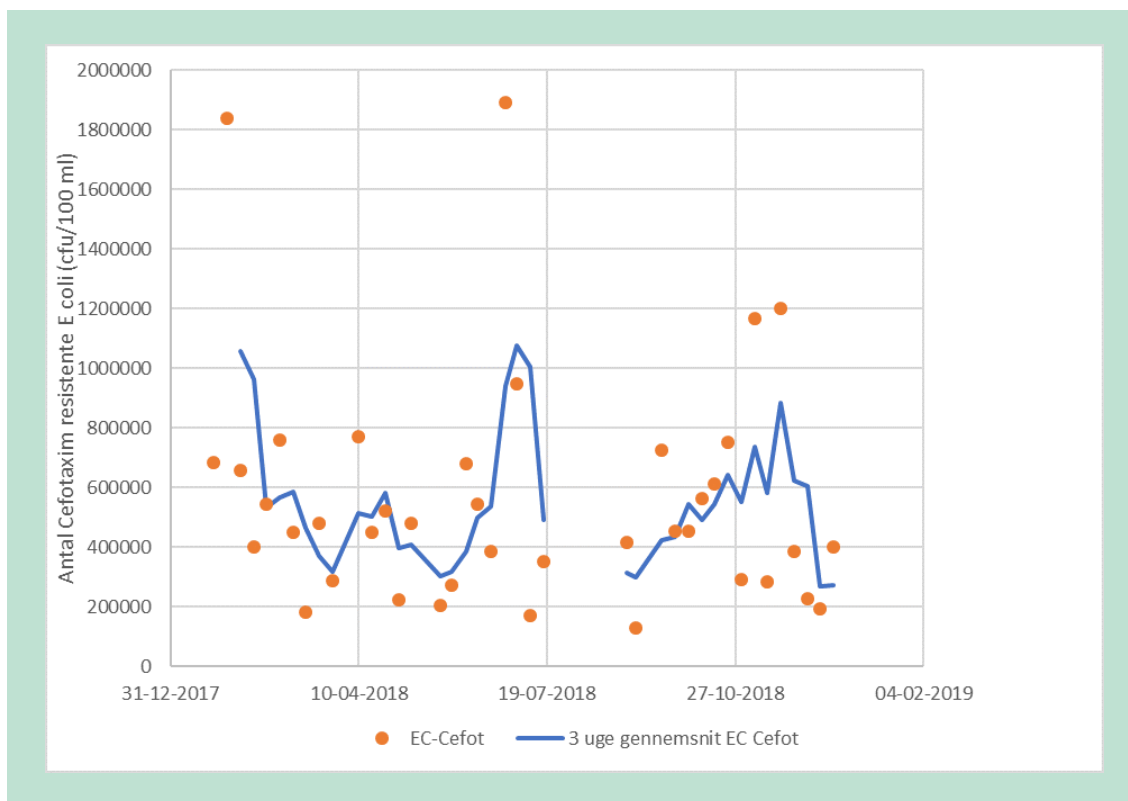


Figur 5-10. Udvikling i målt koncentration af Meropenem resistente coliforme bakterier i spildevandet fra Hillerød Hospital.

Koncentrationen af CPE i spildevandet fra Hillerød Hospital er vist i Figur 5-10. Det geometriske gennemsnit er 16.000 CFU/100 ml. Det geometriske gennemsnit af andelen af CPE er 0,07%. Der var i gennemsnit 0,32 CRO-patienter/dag indlagt på Hospital Nord, dvs. både Hillerød og Frederiksund Hospital, hvoraf langt de fleste antages at være på Hillerød Hospital

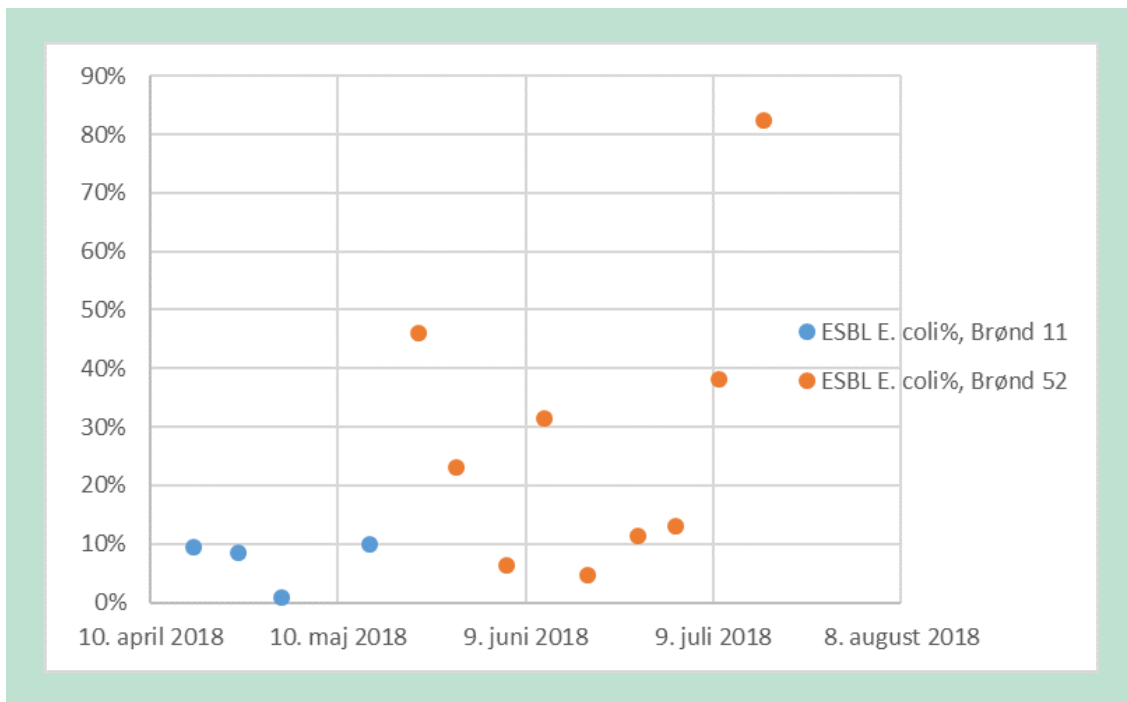
/15/. Det højeste antal var 2 patienter/dag. Der er ikke en tydelig sammenhæng imellem koncentrationen eller andelen af CPE'er og antallet af indlagte patienter. Den 24. april, hvor der blev detekteret et højt antal CPE'er, var dog den periode, hvor der var flest isolerede CRO-patienter. Prøverne fra Hillerød Hospital er udtaget fra 2 forskellige brønde, der modtager spildevand fra forskellige afdelinger. Det er uklart, hvilke afdelinger der huser de isolerede patienter, men som for VRE og VVE er det sandsynligt, at de ligger på afdelinger, der udleder spildevand til brønd 52.

6.4 Cefotaxim-resistente *E. coli*



Figur 5-11. Udvikling i målt koncentration af cefotaxim-resistente *E. coli* i spildevandet fra Herlev Hospital vist som ugentlige målinger og deres løbende gennemsnit (over de foregående 3 uger)

Koncentrationen af cefotaxim-resistente *E. coli* i spildevandet fra Herlev Hospital i 2018 er vist i Figur 5-11. Den gennemsnitlige (geometriske) koncentration er 460.000 CFU/100 ml. Den gennemsnitlige (geometriske) andel er 13% CFU/100 ml.



Figur 5-12. Udvikling i målt koncentration af Cefotaxim-resistente *E. coli* i spildevandet fra Hillerød Hospital vist som ugentlige målinger.

Koncentrationen af cefotaxim-resistente *E. coli* i spildevandet fra Hillerød Hospital i 2018 er vist i Figur 5-12. Den gennemsnitlige (geometriske) koncentration er 130.000 CFU/100 ml. Den gennemsnitlige (geometriske) andel er 13% CFU/100 ml. Prøverne fra Hillerød Hospital er udtaget fra 2 forskellige brønde, der modtager spildevand fra forskellige afdelinger. Der er en tendens til, at der er flere cefotaxim-resistente *E. coli* i spildevandet i brønd 52 end i brønd 11. Hvis fordelingen af placeringen af patienter, der er koloniseret med cefotaxim-resistente *E. coli*, er den samme som for VRE-patienter, kan dette forklare forskellen.

6.5 Metagonomsekventering

Der blev gennemført metagenomanalyse af 2 spildevandsprøver fra Herlev Hospital og 1 prøve fra Slagelse Sygehus ved hjælp af Minion.

Valget af high precision basecalling medførte en meget lang basecalling tid. Basecalling blev stoppet efter 31 dage. Sekvensdata blev analyseret både som taksonomisk fordeling og som fordeling af resistensgener.

På slægts(genus)niveau var det interessant, at der især blev fundet mange *Acrobacter* alignments i spildevandet fra Herlev Hospital den 7/6 (15%), mens andelen i Herlev den 3/5 og i Slagelse var ca. 1%. *Enterococcus* og *Escherichia* lå som regel uden for top-10.

Blandt *E. coli* blev der i alle prøver fundet få alignments af mange forskellige patogene typer (eksempelvis O157). Der blev også fundet en del *Klebsiella pneumoniae*. For *Campylobacter* var *C. jejuni* og *C. lari* dominerende.

Tablet 5-2. Oversigt over resistens-DNA-analyse og incidens af carbapenemase-relaterede reads (OXA og GES) og VAN resistensreads (reads/100.000 analyserede reads) i spildevandsprøver fra Slagelse Sygehus og Herlev Hospital. Et read er et stykke DNA der er sekventeret. Et alignment er et read, der passer sammen med en sekvens i CARD databasen.

	Herlev 3/5-2019	Herlev 7/6-2019	Slagelse 3/5 2019
Totalt antal analyserede reads	353775	111926	214574
¹ Total alignments	7358	3291	3623
² Total antal Card Genes	346	281	261
³ Cardgene incidence	98	251	122
OXA	82	127	68
GES	0,8	0,9	5,1
VanA	5,1	17,0	< 0,5
VanB	0,3	0,9	3,3

¹Antal resistens-relaterede reads, hvor der er fundet match med sekvenser i CARD databasen /20/.

²Antal forskellige gener, hvor der er fundet match med sekvenser i CARD databasen.

³Antal resistens alignments pr. 100.000 analyserede reads.

Undersøgelsen viser, at der er en meget lille andel af reads med de eftersøgte resistensgener, hvor nøjagtigheden af sekventeringen er høj (> 88%).

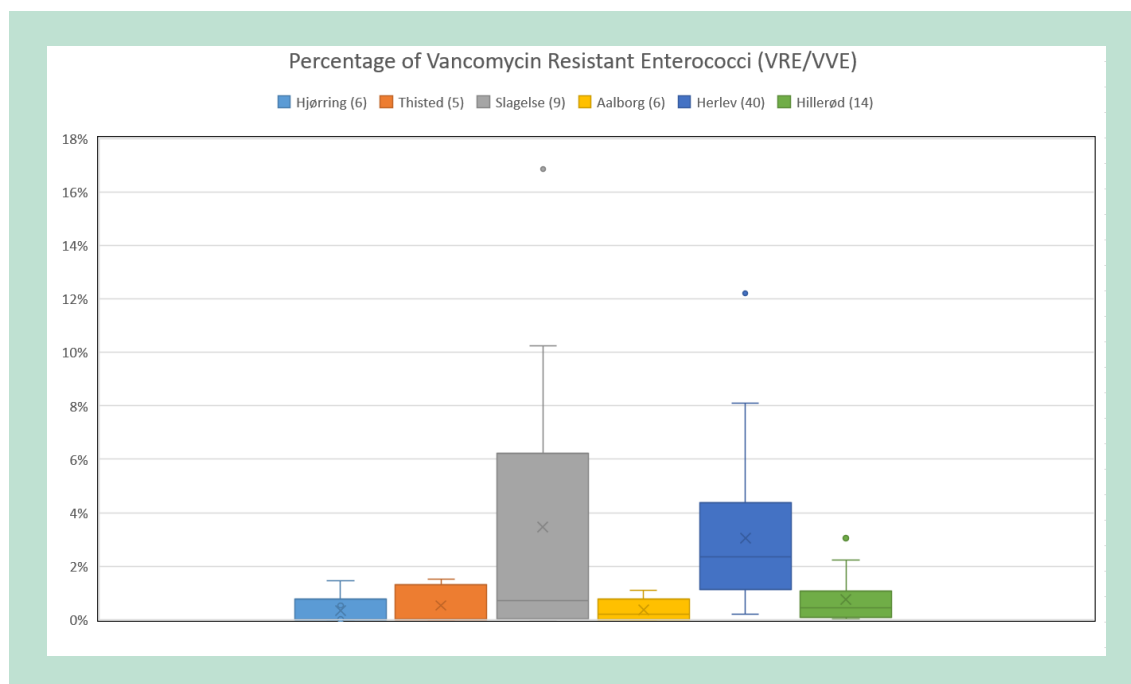
Tablet 5-2 viser de overordnede data for resistensundersøgelsen og for forekomsten af carbapenemase (OXA og GES) og Van-relaterede reads. OXA er de hyppigst forekommende. Af disse var den hyppigst forekommende OXA-368, der giver resistens over for Oxacilin (J01CF04) /21/, som er en β -lactamase-resistent penicillin. OXA-368 er tidligere fundet på plasmider (Class 3 operon) hos en multiresistent *Aeromonas allosaccharophila* isoleret fra aktivt slam /22/. Tchuente et al 2016 /22/ konkluderede, at class 3 operons sjældent forekommer i kliniske sammenhænge, men at de kan have betydning for spredning af resistens, hvilket nu ser ud til at være tilfældet på både Herlev Hospital og Slagelse Sygehus.

Den næst hyppigste var OXA-58, som koder for en carbapenemase, som og først blev fundet hos *Acinetobacter baumannii* /24/. Oxa-58 er også fundet hos *Acinetobacter nosocomialis*, *Klebsiella pneumoniae*, og *Proteus mirabilis* /25/.

Der er fundet 1 read/100.000 med oxa-24 (95% nøjagtighed) i Slagelse. Der er ikke fundet OXA-48. Der blev fundet 1 KPC-6 i Herlev den 7/6-19. Der blev ikke fundet andre gener, der koder for carbapenemaser.

Incidensen for Van er størst i Herlev den 7/6. I Slagelse er der kun fundet VanB, mens VanA er den hyppigste i Herlev.

6.6 Benchmarking imellem hospitaler



Figur 5-13. Boksdiagram over fordelingen af resultater til bestemmelse af andelen af resistente bakterier. Resultaterne er opdelt i kvartiler. Den farvede boks indeholder 50% af resultaterne. Knurhårene (de lodrette streger) indeholder henholdsvis de højeste og de laveste 25% af resultaterne (ekskl. outliers). X er middelværdien. Den vandrette streg i boksen er medianen. De fritliggende punkter, over eller under de lodrette streger, er outliers (statistisk set forskellige fra de andre). Antallet af prøver fra hvert hospital er angivet i parentes.

Tablet 5-3. Antal prøver og antal prøver med positive fund af CPE på de 6 undersøgte hospitaler.

	Antal prøver	Antal positive prøver	% positive prøver
Herlev Hospital (2018)	40	40	100 %
Hillerød	12	12	100 %
Slagelse Sygehus	9	5	56 %
RHN Thisted	6	0	0 %
RHN Hjørring	6	2	33 %
Aalborg UH Syd	6	1	17 %

Tabel 5-4. Geometrisk gennemsnit af resultater fra 2018 fra Hillerød Hospital og Herlev Hospital. For de øvrige hospitaler er resultater fra 2016 og 2017. Andelen af isolerede patienter er beregnet under antagelse af, at der er 950 senge på Herlev Hospital /16/ og 630 senge på Nordsjællands Hospital (Hillerrød og Frederiksbund). Gennemsnit er beregnet med halv påvisningsgrænse, hvis resultatet er under påvisningsgrænsen, og med øvre grænse, hvis resultatet er > øvre grænse.

Pr. 100 ml eller %	VRE Geometrisk middel	Max.	CPE Geometrisk middel	Max.	CEF resist. Geometrisk middel	Max.
Hillerød	23.000	830.000	16.000	840.000	1.300.000	18.000.000
Herlev	290.000	1.900.000	22.000	160.000	460.000	1.900.000
Hjørring	2.800	>24.000	32	220	890.000	20.000.000
Thisted	390	>24.000	<22	<40	7.000	84.000
Aalborg	1.000	>24.000	<20	<20	36.000	3.100.000
Slagelse	4.800	160.000	30	1300	*62.000	760.000
Hillerød	0,3 %	3,1 %	0,07%	2,2 %	13 %	82 %
Herlev	2,2 %	12 %	0,2 %	1,1 %	13 %	47 %
Hjørring	0,03%	>1,5%	0,0001%	0,02%	13%	100%
Thisted	0,03%	>1,5%	<0,006%	< 0,04%	9,3%	192%
Aalborg	0,1%	>1,1%	<0,11%	<0,08%	3,2%	10%
Slagelse	² 0,3%	17%	0,001%	0,02%	¹ 16%	243%

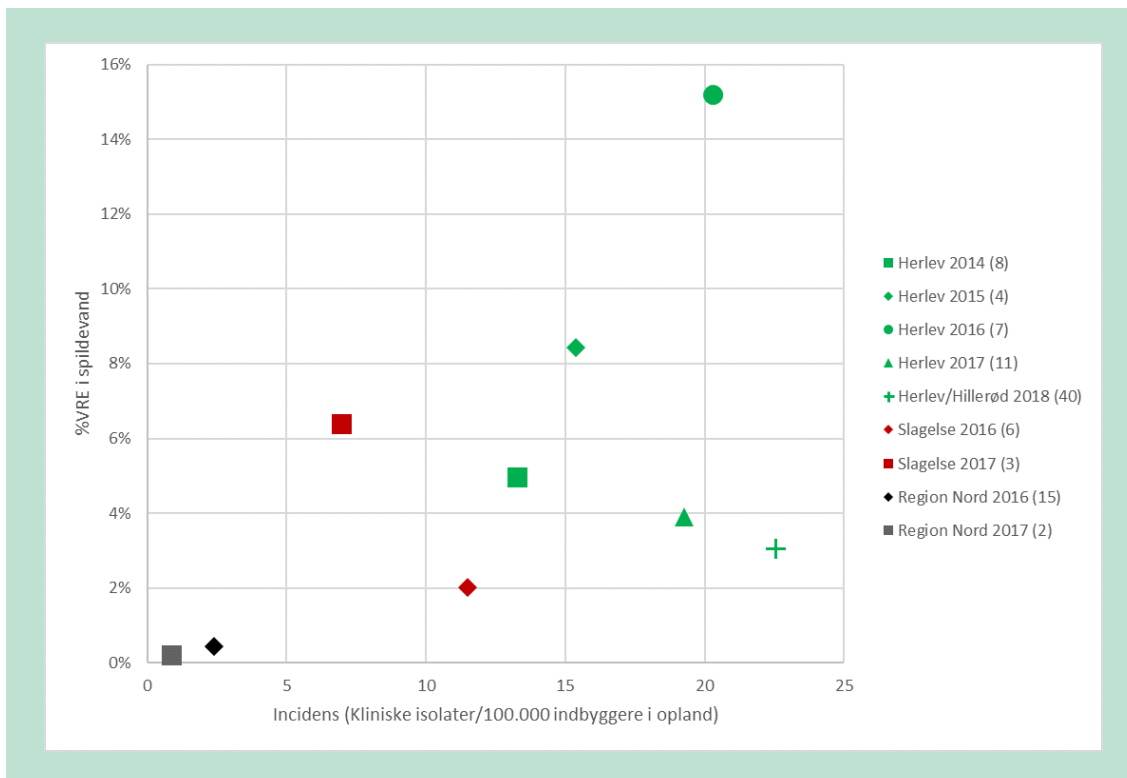
%	VRE-patienter	CRO-patienter
Hillerød	0,9 %	0,05%
Herlev	3,0%	0,06%

¹En høj outlier fra Slagelse er taget ud.

²To høje værdier, resten lave.

Fordelingen af den procentvise andel af VRE og CPE på de 6 undersøgte hospitaler er vist på Figur 5-13, Tabel 5-3 og Tabel 5-4. For VRE og CPE ser Herlev og Hillerød Hospitaler ud til at skille sig ud fra de andre ved at have både en højere koncentration og en større andel. For CEF-resistente enterobakterier er koncentrationen også høj i Hjørring, ligesom andelen er stor i Slagelse. Det skal dog tages med i betragtning, at der er stor forskel i antallet af prøver.

På Figur 5-14 er andelen af VRE vist som funktion af, hvor mange kliniske isolater SSI /17/ har modtaget fra Region Hovedstaden, Region Sjælland og Region Nord, der dækker de hospitaler, som er med i undersøgelsen. Antallet af kliniske isolater er normaliseret i forhold til antallet af indbyggere i hver region for at gøre dem sammenlignelige. Der ses en ret tydelig tendens til, at jo højere incidens, jo højere er andelen af VRE i spildevandet. Der skal gøres opmærksom på, at incidenstillene indeholder data fra hele regionen, mens spildevandsdata stammer fra enkelte hospitaler i regionen. Der er f.eks. data fra Rigshospitalet i incidensdata fra Region Hovedstaden, men kun spildevandsdata fra Herlev og Hillerød. Desuden skal der gøres opmærksom på, at der i Region Hovedstaden er mere fokus på VRE end i Region Sjælland og i Region Nord, hvorfor det må antages, at man her finder flere VRE'er.



Figur 5-14. Incidens af kliniske VRE-/VVE-isolater fra hospitalernes undersøgelse af patientprøver, som er sendt til SSI, sammenlignet med resultaterne af spildevandsanalyser fordelt på år. Antal analyser i hvert punkt er angivet i parentes. Spildevandsdata fra Region Nord indeholder Thisted, Hjørring og Aalborg Syd. Incidensdata er fordelt på regioner, dvs. Region Hovedstaden for Herlev og Hillerød, Region Sjælland for Slagelse /17/.

7. Diskussion og konklusion

7.1 Diskussion

Projektets grundlæggende antagelse er, at resistente bakterier fra patienterne kan genfindes i spildevandet.

For VRE viste resultaterne af sekventeringen, at næsten alle de VRE'er, der er isoleret fra spildevandet og karakteriseret ved DNA-sekventering, er identiske med VRE isolater, som stammer fra patienterne fra samme periode.

Dette viser, at projektets grundlæggende antagelse er opfyldt for VRE. Der foreligger ikke tilsvarende data for CPE.

Testen af 12 VVE'er viste, at Enterolert-metoden gav positivt resultat for 9 af de 12. Vi anser derfor metoden for at medtage både VRE og VVE. I det følgende har vi benævnt VRE+VVE som VRE.

Hvis man antager, at alle VRE- og CRO-inficerede patienter er isolerede, at de afgiver samme antal, at ingen andre (personale og besøgende) er inficeret, og at der er et ensartet henfald i kloakledningen, forventer vi, at der er en lineær sammenhæng mellem antallet af isolerede patienter og koncentrationen samt mellem antallet af isolerede patienter og andelen af resistente bakterier i spildevandet.

En visuel vurdering af Figur 5-4 indikerer, at der er forhøjede VRE-koncentrationer i forbindelse med udbruddene i starten af 2017 og i 2018. Figuren indikerer også, at forekomsten af VRE og det ugentlige gennemsnitlige antal af patienter/dag ikke korrelerer tydeligt. Der er da også kun en svag lineær sammenhæng (Figur 5-5). Det samme gør sig gældende for CPE (Figur 5-8 og Figur 5-9).

Den lineære model forklarer derfor kun en lille del af variationen i data. Det betyder enten, at forudsætningerne for den lineære model ikke er opfyldt, eller at variationen af VRE i spildevandet skyldes andre faktorer. Andre faktorer kan være variation mellem laboranter, analytisk usikkerhed og prøvetagning.

Den relative analytiske usikkerhed (standardafvigelsen) på analysen for andelen af VRE er beregnet til 27% (Bilag 3). Det betyder, at vi for det enkelte måleresultat ikke kan regne med at kunne påvise en stigning eller et fald under ca. 50%. Derimod burde vi kunne se ændringer, der sker over længere tid, og forskelle på gennemsnit imellem hospitaler, da den tilfældige variation mindskes med antallet af prøver.

Der er gennemført en analyse af laboranternes indflydelse på resultaterne ved at sammenligne deres gennemsnitlige resultater og variationen imellem dobbeltbestemmelserne. Der er en gennemsnitlig forskel på 0,5% point mellem laboranterne. Derfor kan det antages, at forskellen mellem laboranter kun forklarer en mindre del af variationen (Se Bilag 2).

Det konkluderes, at VRE'er fra patienterne kan genfindes i spildevandet, men at kun en mindre del af den observerede variation i koncentrationen af VRE i spildevandet kan forklares med variationen i antallet af VRE-isolerede patienter eller med analytisk variation. Resten af variationen må findes i, at forudsætningen for den lineære model ikke er opfyldt. Dvs. at den observerede variation hovedsageligt må skyldes en eller flere af følgende forhold:

- Ikke alle VRE-koloniserede patienter bliver isoleret, og at der er et ukendt og varierende mørketal for VRE-inficerede patienter.
- Udskillelsen fra isolerede patienter varierer.
- Besøgende og medarbejdere bidrager med VRE til spildevandet, og bidraget samvarierer ikke med antallet af isolerede patienter.
- Der sker varierende ændringer i koncentration og eller andelen af resistente bakterier i kloakken.

Da det kun er patienter, hvor det giver klinisk mening at undersøge for VRE, der bliver undersøgt, kan der godt være koloniserede patienter, som ikke isoleres, eller der kan gå tid, før de isoleres. Desuden er det ikke sikkert, at et udbrud detekteres ved screening, da nabopatienter ikke nødvendigvis er blandt de smittede. Dvs. at der kan gå tid, før et udbrud registreres. Vi vil derfor forvente, at der vil være en forudgående forhøjet forekomst i spildevandet ved et udbrud. Det er muligvis det, vi observerer i forbindelse med VRE-udbruddet i 2018 (Figur 5-4).

Patienter holdes isoleret i 6 måneder efter den seneste positive prøve. Hvis patienten udskrives og indlægges igen inden for 6 måneder, fortsættes isoleringen. Dette skyldes, at man forventer, at VRE efterhånden udkonkurreres og udskilles helt eller delvist i løbet af de 6 måneder. Derfor må vi antage, at andelen af VRE reduceres med tiden hos den enkelte isolerede. Patienter, der ligger længe eller genindlægges, vil derfor bidrage mindre med VRE til spildevandet. Man vil således forvente, at koncentrationen eller andelen af resistens falder hurtigere end antallet af isolerede patienter efter et udbrud.

Vi har ingen indikationer af, hvordan bidraget fra medarbejdere og besøgende varierer. Vi må antage, at bidraget fra besøgende er lavt, da de er på hospitalet i kort tid. Og hvis medarbejdere smittes af patienterne eller omvendt, vil bidraget fra medarbejdere samvariere med patienterne. Endelig er der ingen grund til at antage, at forholdene i kloakken varierer over året, da temperatur, som kan indvirke på henfaldet, ikke varierer væsentligt.

Vi har beregnet observations- og alarmgrænser ud fra den analytiske variation for både VRE og CPE. Resultater, der ligger højere end gennemsnittet set over den foregående periode, skyldes derfor andre forhold end den tilfældige variation. En analyse af Figur 5-6 og Figur 5-8 viser, at der enten er resultater over alarmgrænsen, inden der registreres udbrud på Herlev Hospital, eller at vi ser resultater over alarmgrænsen under udbruddet (i de tilfælde, hvor vi ikke har målinger inden de registrerede udbrud). For VRE ville der kunne være givet varsel inden udbruddene i 2014 og november 2018. For de øvrige udbrud, hvor vi ikke har målinger inden udbruddet, var der resultater over alarmgrænsen under udbruddet. Havde vi haft målinger inden udbruddene, kunne vi muligvis have varslet, inden de blev registreret på hospitalet. For CPE ville vi have kunnet give varsel inden udbruddet i 2018. Derimod kunne der ikke være givet varsel for udbruddet i december 2018.

Hvis man antager, at alle Enterokokker hos VRE-isolerede patienter er VRE, og at alle coliforme bakterier hos CRO-patienter er CPE'er, skal andelen af VRE'er og CPE'er i spildevandet være den samme som de isolerede patienters andel af det samlede antal patienter. Det er en rimelig antagelse for patienter der er under behandling med henholdsvis vancomycin og meropenem. Tabel 5-4 sammenligner andelen af senge, der er optaget af isolerede patienter, og andelen af VRE og CPE på Herlev Hospital og Nordsjællands Hospital, Hillerød. Det ses, at der i gennemsnit er nogenlunde overensstemmelse mellem andelen af VRE og CPE og andelen af senge, der er optaget af isolerede patienter. Resultatet viser tydeligt, at vi kan skelne imellem hospitaler med høj og lav andel af isolerede patienter.

Vi har tidligere undersøgelser fra fire andre hospitaler, hvor vi kan se, at resultaterne varierer imellem hospitalerne. Forskellene på middelværdierne for andelen af resistente VRE, CEF og CPE imellem hospitalerne er vist i Tabel 5-4. For VRE er andelen højest på Slagelse Sygehus,

samt på Herlev og Hillerød hospitaler. For CPE er det Herlev Hospital og Nordsjællands Hospital, Hillerød, der ligger højest. Forskellen i andelen af VRE imellem de seks hospitaler ses også i Figur 5-14, hvor der er sammenlignet med, hvor mange kliniske VRE isolater SSI har modtaget fra de fem regioner. Her ses det, at hospitalerne i Nordjylland ikke kun har lav VRE-koncentration i spildevandet, men også kun finder få VRE'er hos patienterne. Samlet viser vores resultater, at gennemsnitlige koncentrationer af VRE i spildevandet er et godt mål for, om et hospital er "koloniseret" og altså har et problem.

Grænsen for, om et hospital er koloniseret med VRE eller CPE, kan uddrages fra Tabel 5-4. For VRE ligger grænsen formentlig imellem Hillerød/Slagelse og Nordjylland, dvs. ca. 0,3%. For CPE er alle prøver fra Herlev og Hillerød positive, mens der er negative prøver fra spildevandet i Nordjylland og Slagelse. Koloniseringsgrænsen for CPE er derfor under Hillerød, dvs. ca. 0,05%.

Metagenom-sekventeringen af spildevandet vha. Minion viste, at forekomsten af reads med gener, der koder for resistens, er lav. Den højeste incidens var 50 reads/100.000 reads. Det betyder, at der skal analyseres mange reads for at detektere resistens. Resultaterne giver mulighed for at beregne CARD gene incidensen, der kan tolkes som et overordnet tal for resistensdetektion. Tabel 5-2 viser, at CARD gene incidensen er højest den 7/6 i Herlev. Det er dog uklart, om vi kan anvende CARD gene incidensen kvantitativt.

OXA-incidensen er nogenlunde ens i de 3 prøver; dog med enkelte forskelle. OXA-58 er lidt lavere i Slagelse end i Herlev. OXA-129 er højest i Slagelse, og OXA-347 er højest i Herlev den 7/6. Det er muligt, at man kan anvende udvalgte OXA incidenser til at udtale sig om deres forekomst.

OXA er gener, der koder for β -laktamaser, hvoraf mange er carbapenemaser. Queenan and Bush (2007) /22/ konkluderer i et review, at mindst 37 af 102 OXA typer koder for carbapenemaser. Subfamilierne er OXA23, 24, 48, 50, 51, 55, 58, 60, 62. Subfamilierne har yderligere medlemmer. Vi har især fundet OXA 58. En yderligere identifikation af, hvilke OXA-typer der er relateret til carbapenemaser, kan formentlig sikre, at MGS kan give vigtige informationer til en eventuel overvågning. Det samme gør sig formentlig gældende for de øvrige carbapenemasegener.

Der er fundet færre VAN gener end OXA gener. Dette strider umiddelbart imod, at vi finder flere VRE'er end CPE'er, men det skyldes formentlig, at de fleste OXA gener ikke er carbapenemaser, og at mange af dem ligger hos Non-Enterobacterier, f.eks. *Acinetobacter baumannii*.

Som for OXA indikerer resultaterne fra VAN, at det er muligt at skelne imellem prøver og hospitaler. Det ser f.eks. ud til at VanB er dominerende i Slagelse.

Metagenom-sekventeringen indikerede, at der var mange *Arcobacter* i spildevandet på Herlev Hospital den 7/6. *Arcobacter* udgør ofte en stor del af bakterier i spildevand /19/, så det er ikke usædvanligt at finde dem. *Arcobacter* er fundet i mange miljøer og er muligvis i stand til at overleve og vokse i naturen /19/. *A. butzleri* minder om *Campylobacter* og blev erkendt som en vigtig årsag til diarré i 2006 /18/. Den store forskel, der ses imellem den 3/5 og 7/6, kan tyde på, at der var et udbrud med *Arcobacter sp.* L og *A. butzleri* på Herlev Hospital den 7/6.

7.2 Konklusion

Projektets grundlæggende antagelse er, at det er muligt at genfinde resistente bakterier fra patienter i spildevandet fra hospitalerne. For VRE viste resultaterne af sekventeringen, at de fleste af de VRE'er, der er isoleret i spildevandet, er identiske med VRE-isolater, som stammer fra patienterne fra samme periode. Vi har ikke sekventeringsdata for CPE, men de fenotypiske metoder tyder på, at der også er overensstemmelse imellem patient- og spildevandsisolater.

Vi har ikke kunnet påvise en lineær sammenhæng mellem koncentrationen af hverken VRE eller CPE i spildevandet med antallet af VRE- og CRO-isolerede patienter. Årsagen er, at forudsætningerne for den lineære model ikke er opfyldt. De to vigtigste forudsætninger, der ikke er opfyldt, er formentlig, at der går tid, fra en koloniseret patient indlægges, til patienten isoleres (eller at patienten ikke når at blive isoleret inden udskrivning), og at andelen af VRE og CPE i fæces varierer imellem patienter og over tid.

Anvendelse af aktionsgrænser på baggrund af den tilfældige analytiske variation giver - på trods af den manglende lineære sammenhæng - mulighed for tidlig varsling. Resultaterne viser, at vi i nogle tilfælde ville have kunnet varsle, inden der blev observeret udbrud på Herlev Hospital. I andre tilfælde har vi ingen målinger inden udbruddet, men målingerne under udbruddet giver formodning om, at vi ville have kunnet varsle. Kun ét CPE-udbrud ville ikke være blevet varslet.

Den gennemsnitlige andel af VRE og CPE i spildevandet på et hospital kan anvendes til at vurdere, om hospitalet er koloniseret. Sammenligningen af VRE og CPE og antal isolerede patienter på Herlev Hospital og Nordsjællands Hospital viser, at de gennemsnitlige andele af VRE og CPE stemmer overens med andelen af senge, der er optaget af isolerede patienter. Når vi yderligere inddrager tidligere resultater fra fire andre hospitaler, kan vi se, at der er overensstemmelse imellem forekomsten af resistente VRE og antallet (pr. 100.000 indbyggere) af kliniske prøver, der på regionsbasis indsendes til Statens Serum Institut. Vi har på den baggrund identificeret en tærskelværdi mellem et svagt og moderat koloniseret hospital til at ligge på 0,3% for VRE og 0,05% for CPE.

Sekventering af VRE-isolater fra spildevandet og metagenom-sekventering ved DNA-ekstraktion direkte fra spildevandet vha. Minion fra Oxford Nano Technologies kan anvendes til at detektere resistensgener direkte fra spildevandet. Resultaterne kan give mere detaljeret information om, hvilke typer af resistens der er tale om. Sekventering af isolater giver udover resistens også information om, hvilke bakterier der bærer resistensen. Sekventering af DNA fra spildevandet giver en taksonomisk karakteristik af, hvilke af de bakterieslægter og bakteriearter, der er dominerende i spildevandet, og som muligvis kan anvendes til andre typer af varsling, f.eks. *Arcobater*. Resultaterne underbygger, at der er forskelle i fordelingen imellem hospitalerne af hvilke resistensgener, der forekommer i spildevandet.

8. Digital platform

Den digitale platform til varsling af resistens på hospitaler skal være tilgængelig for relevante personer på hospitalet.

8.1 Metodebeskrivelser

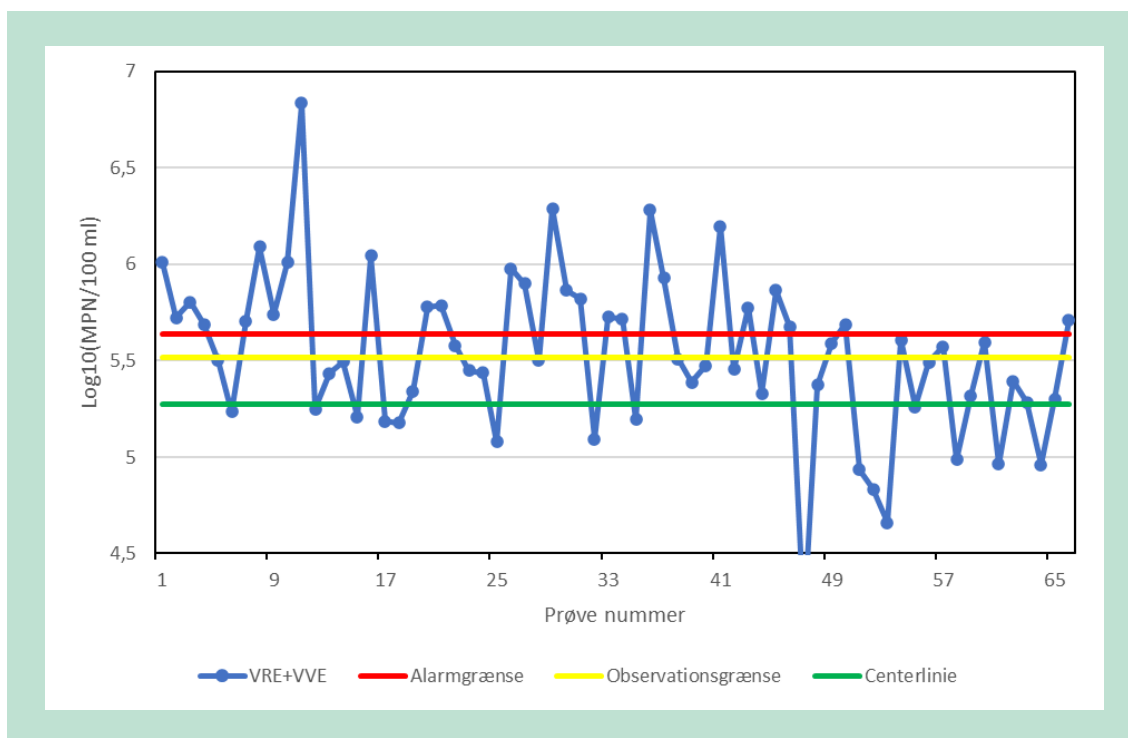
Den digitale platform skal indeholde korte metodebeskrivelser for at give brugeren en bedre mulighed for at vurdere resultaterne. Metoderne skal inkludere både analytiske metoder og metoder til beregning af aktionsgrænser.

8.2 Resultatpræsentation

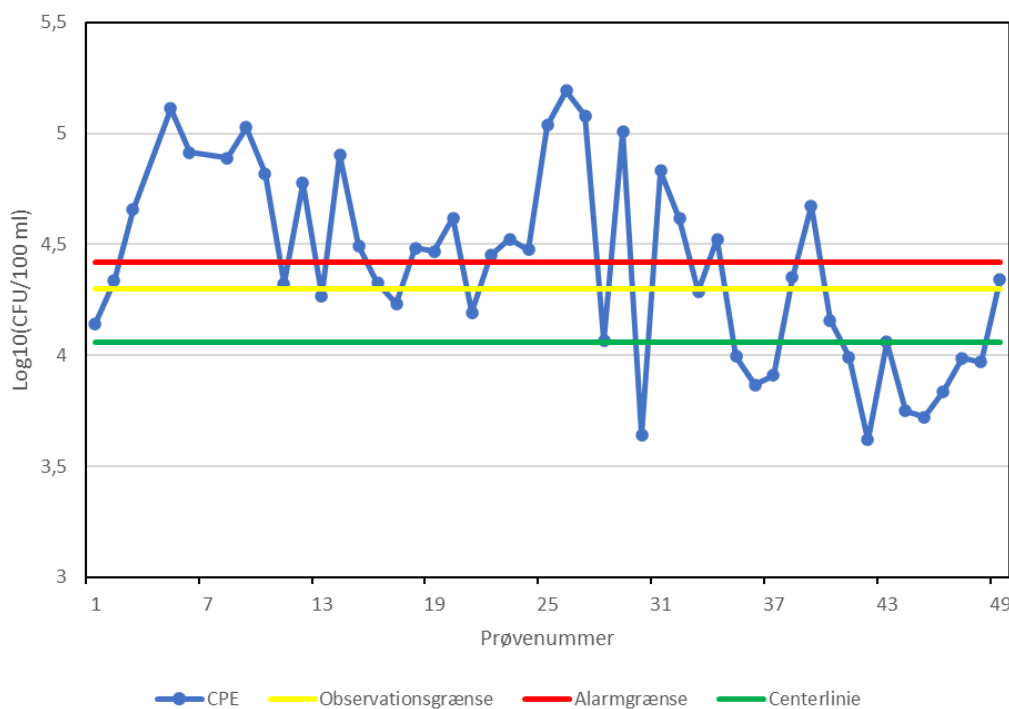
8.2.1 Tabelleret og visuel præsentation af resultater

Resultaterne for resistensmålingerne skal være tilgængelige i tabelform og i form af grafer med den tidlige udvikling. Tabellen skal indeholde prøvenummer, så der kan skabes relation til X-kortet (se afsnit 7.2.2).

8.2.2 Etablering af observations- og alarmgrænser



FIGUR 7-1. X-kort med aktionsgrænser bestemt på grundlag af dobbelte bestemmelser af koncentrationen af VRE i spildevandet fra Herlev Hospital.



FIGUR 7-2. X-kort med aktionsgrænser bestemt på grundlag af bestemmelser af koncentrationen af CPE i spildevandet fra Herlev Hospital.

Projektets hypotese er, at man kan overvåge forekomsten af resistens på et hospital ved at måle resistens i prøver fra spildevandet og give et varsel, hvis der detekteres stigninger.

Error! Reference source not found. og **Error! Reference source not found.** viser resultaterne (geometrisk gennemsnit af dobbeltbestemmelser) af målinger af koncentrationen af VRE og CPE i spildevandet fra Herlev Hospital. Figurerne viser også forslag til etablering af observations- og alarmgrænser på baggrund af målingerne. Observationsgrænsen og alarmgrænsen er beregnet som det geometriske gennemsnit af koncentrationen + 2 henholdsvis 3 gange den gennemsnitlige variationsbredde. Variationsbredden for den enkelte analyse er forskellen imellem dobbeltbestemmelserne (Log₁₀) og beskriver analysens tilfældige variation. Den gennemsnitlige koncentration er beregnet ved en iterativ proces, hvor målinger, der er højere end alarmgrænsen, er fjernet, indtil alle ligger under alarmgrænsen. De målinger, der ligger over alarmgrænsen, anses for at være forskellige fra gennemsnittet af andre end tilfældige årsager. Dvs. at en måling, der ligger over alarmgrænsen, er signifikant højere end gennemsnittet og antages at være et tegn på, at der er en forhøjet koncentration, som f.eks. kan skyldes, at der er flere koloniserede patienter.

8.2.3 Resistensgener

Resultater fra evt. DNA-analyser (sekventering eller PCR) skal vises sammen med resultaterne af de kvantitative dyrkningsbaserede analyser. Resultaterne fra analyse af isolerede VRE'er/CPE'er skal angives som art resistenstype. Afhængigt af tilgængelighed bør der desuden angives et link til sekvens af isolater for at give hospitalet mulighed for præcist at identificere, hvilken stamme og resistens, der er tale om, samt muliggøre en målrettet søgning på hospitalet og en sammenligning med analyser af kliniske isolater.

Data fra metagenom sekventering kan vises.

8.3 Varsling og aktion

Når observations- eller alarmgrænsen overskrides, skal den digitale platform give besked til relevante personer på hospitalet sammen med et link, så resultatet kan ses med det samme. Det skal fremgå af platformen, hvem der skal modtage beskeden.

Der kan etableres procedurer, der beskriver, hvilke handlinger eller principperne for hvilke handlinger der skal sættes i værk, hvis observations- eller alarmgrænsen overskrides. Det vil være op til det enkelte hospital at afgøre dette.

Når observationsgrænsen overskrides, kan handlingen f.eks. være, at man på hospitalets klinisk-mikrobiologiske laboratorium øger opmærksomheden på den pågældende resistens og eventuelt øger andelen af de indkomne prøver, der analyseres for resistens. Dette vil øge sandsynligheden for at finde positive prøver og gør det muligt at igangsætte screening på et tidligere tidspunkt. En anden handling kan være, at det laboratorium, der gennemfører overvågningen, starter isolering til brug for senere sekventering i tilfælde af, at alarmgrænsen overskrides.

Når alarmgrænsen overskrides, kan handlingen f.eks. være at kriterierne for hvilke prøver, der udtages, sænkes, så der bliver taget flere prøver og gennemført flere analyser. Dette vil øge sandsynligheden for at finde positive prøver yderligere, og igangsætte screening på et tidligere tidspunkt. Desuden at det laboratorium, der gennemfører overvågningen, gennemfører sekventering.

8.4 Overvågning af flere hospitaler

Der er store bevægelser af patienter imellem hospitalerne, som kan bringe VRE/CPE og andre resistente patogener fra det ene hospital til det andet. Derfor vil man kunne opnå fordele ved at koordinere overvågningen af flere hospitaler.

De forskelle, vi ser imellem hospitaler, kan anvendes til benchmarking af hospitaler, men kan også anvendes til at varsle fra et hospital til et andet. Varslingen kan derfor udvides til at omfatte hospitaler, der modtager mange patienter fra det hospital, hvor en alarmgrænse er nået.

Overvågning kan koordineres med SSI, der koordinerer overvågningen af resistens i kliniske isolater i DANMAP.

9. Referencer

- /1/. WHO 2015. Global action plan on antimicrobial resistance. <https://www.who.int/antimicrobial-resistance/publications/global-action-plan/en/>
- /2/. O'Neill, J. 2016. Tackling Drug-resistant Infections Globally: Final Report and recommendations. Review on Antimicrobial Resistance. https://amr-review.org/sites/default/files/160518_Final%20paper_with%20cover.pdf
- /3/. van der Heijden, M. et al. (2019). When the Drugs Don't Work. Antibiotic Resistance as a Global Development Problem. ReAct and Dag Hammarskjöld Foundation. Uppsala, Sweden. ISBN 978-91-985372-0-8
- /4/. Bengtsson-Palme, J., Kristiansson, E., Larsson, D. G. J. 2018. Environmental factors influencing the development and spread of antibiotic resistance. *FEMS Microbiology Reviews*. 42,1,68-80. DOI: 10.1093/femsre/fux053
- /5/. ReAct.org 2019. When the drugs don't work. Antibiotic Resistance as a Global Development Problem. <https://www.reactgroup.org/wp-content/uploads/2019/02/When-the-Drugs-Don%E2%80%99t-Work-Antibiotic-Resistance-as-a-Global-Development-Problem-Feb-2019.pdf>
- /6/. IAGC 2019. No Time to Wait: Securing the future from drug-resistant infections. Report to the Secretary-General of the United Nations. <https://www.who.int/antimicrobial-resistance/interagency-coordination-group/final-report/en/>
- /7/. WHO 2017. Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. <http://www.who.int/medicines/publications/global-priority-list-antibiotic-resistant-bacteria/en/>. Downloaded 5-11-2018.
- /8/. Hollenbeck, BL. og Rice, LB. 2012. Intrinsic and acquired resistance mechanisms in enterococcus. *Virulence*. 3,5,421, DOI: 10.4161/viru.21282
- /9/. Sivertsen et al. 2016. A Silenced vanA Gene Cluster on a Transferable Plasmid Caused an Outbreak of Vancomycin-Variable Enterococci. *Antimicrob Agents Chemother*. 60,7,4119. DOI:10.1128/aac.00286-16
- /10/. Bush, K. 2018. Past and Present Perspectives on β -Lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 62, 10. DOI: 10.1128/aac.01076-18
- /11/. Oxford Nanopore Technologies <https://nanoporetech.com/>
- /12/. SSI 2017. ESBL producerende bakterier. SSIs sygdomsleksikon. <https://www.ssi.dk/Service/Sygdomsleksikon/E/ESBL.aspx>. Opdateret 9/8-2017
- /13/. BEK nr 974 af 27/06/2018. Bekendtgørelse om kvalitetskrav til miljømålinger. Bilag 2.
- /14/. Lund, U.O., Jensen, V. and Andersen, K. (1997) Internal quality control in environmental laboratories. Manual. Report by VKI.
- /15/. Pers comm. 2019 Lene Nielsen og Dennis Schrøder Hansen, KMA, Herlev Hospital
- /16/. <https://www.herlevhospital.dk/om-hospitalet/Organisation/Sider/Noegletal.aspx> 3. juni 2019
- /17/. Hammerum, AM. og Hasman, H. 2019. SSI. Pers com.
- /18/. Prouzet-Mauléon, V., Labadi, L., Bouges, N., Ménard, A., & Mégraud, F. (2006). *Arcobacter butzleri*: underestimated enteropathogen. *Emerging infectious diseases*, 12(2), 307–309. doi:10.3201/eid1202.050570
- /19/. Fisher, J. C., Levican, A., Figueras, M. J., & McLellan, S. L. (2014). Population dynamics and ecology of *Arcobacter* in sewage. *Frontiers in microbiology*, 5, 525. doi:10.3389/fmicb.2014.00525
- /20/. The Comprehensive Antibiotic Resistance Database. <https://card.mcmaster.ca/home>
- /21/. <https://card.mcmaster.ca/ontology/37955>

- /22/. Queenan, A. M., & Bush, K. (2007). Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. *Clinical microbiology reviews*, 20(3), 440–458. doi:10.1128/CMR.00001-07
- /23/. Simo Tchuinte PL, et al. 2016.: Characterisation of class 3 integrons with oxacillinase gene cassettes in hospital sewage and sludge samples from France and Luxembourg. *Int. J. Antimicrob. Agents* 48,4,431-434.
<https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2016.06.018>
- /24/. Poirel, L., et al. (2005). "OXA-58, a novel class D {beta}-lactamase involved in resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii*." *Antimicrob Agents Chemother* 49(1): 202-208.
- /25/. <https://card.mcmaster.ca/ontology/38011>

Bilag 1. Prøveoversigt

Bilag 1.1 Prøvetagning Herlev og Hillerød hospitaler

Table B1.1. Prøvetagningsoversigt for udtagning af spildevandsprøver til resistensbestemmelse fra Herlev Hospital og Nordsjællands Hospital – Hillerød. F = Flowproportional, S = Stikprøve

Uge- dag	Dato	Uge	Herlev Hospital Renseanlæg indløb	Nordsjællands Hospital - Hillerød Brønd 11	Nordsjællands Hospital - Hillerød Brønd 52
Ti	28. okt 2014	44	F		
Ti	4. nov 2014	45	F		
Ti	11. nov 2014	46	F		
Ti	18. nov 2014	47	F		
Ti	25. nov 2014	48	F		
Ti	2. dec 2014	49	F		
Ti	9. dec 2014	50	F		
Ti	16. dec 2014	51	F		
Ti	6. jan. 2015	2	F		
Ti	13. jan. 2015	3	F		
On	23. sept. 2015	39	F		
On	21. okt. 2015	43	F		
On	11. maj 2016	19	F		
On	18. maj 2016	20	F		
Ti	24. maj 2016	21	F		
Ti	31. maj 2016	22	F		
Ti	7. juni 2016	23	F		
Ti	14. juni 2016	24	F		
Ti	21. juni 2016	25	F		
Ti	28. juni 2016	26	F		
Ti	30. aug. 2016	35	F		
Ti	13. sept. 2016	37	F		
Ti	07. feb. 2017	6	F		
Ti	14. feb. 2017	7	F		
Ti	21. feb. 2017	8	F		
Ti	28. feb. 2017	9	F		
Ti	07. marts 2017	10	F		
Ti	14. marts 2017	11	F		
Ti	21. marts 2017	12	F		
Ti	28. marts 2017	13	F		
Ti	04. april 2017	14	F		
On	19. april 2017	16	F		

Uge- dag	Dato	Uge	Herlev Hospital Renseanlæg indløb	Nordsjællands Hospital - Hillerød Brønd 11	Nordsjællands Hospital - Hillerød Brønd 52
Ti	09. maj 2017	19	F		
Ti	23. jan. 2018	4	F		
Ti	30. jan. 2018	5	F		
Ti	6. feb. 2018	6	F		
Ti	13. feb. 2018	7	F		
Ti	20. feb. 2018	8	F		
Ti	27. feb. 2018	9	F		
Ti	6. marts 2018	10	F		
Ti	13. marts 2018	11	F		
Ti	20. marts 2018	12	F		
Ti	27. marts 2018	13	F		
Ti	3. april 2018	14	F		
Ti	10. april 2018	15	F		
Ti	17. april 2018	16	F	S	
Ti	24. april 2018	17	F	S	
Ti	1. maj 2018	18	F	S	
Ti	8. maj 2018	19	F	S	
Ti	15. maj 2018	20		S	
On	23. maj 2018	21	F		S
Ti	29. maj 2018	22	F		S
On	6. juni 2018	23	F		S
Ti	12. juni 2018	24	F		S
Ti	19. juni 2018	25	F		S
On	27. juni 2018	26	F		S
Ti	3. juli 2018	27	F		S
Ti	10. juli 2018	28	F		S
Ti	17. juli 2018	29	F		S
To	30. aug.2018	35	F		
Ti	4. sep 2018	36	F		
Ti	18. sep 2018	38	F		
Ti	25. sep 2018	39	F		
Ti	2. okt 2018	40	F		
Ti	9. okt 2018	41	F		
Ti	16. okt 2018	42	F		
Ti	23. okt 2018	43	F		
Ti	30. okt 2018	44	F		
Ti	6. nov 2018	45	F		
Ti	13. nov 2018	46	F		
Ti	20. nov 2018	47	F		
Ti	27. nov 2018	48	F		

Uge- dag	Dato	Uge	Herlev Hospital Renseanlæg indløb	Nordsjællands Hospital - Hillerød Brønd 11	Nordsjællands Hospital - Hillerød Brønd 52
Ti	4. dec 2018	49	F		
Ti	11. dec 2018	50	F		
Ti	18. dec 2018	51	F		

Bilag 1.2 Afdelinger, Herlev og Hillerød Hospitaler

Prøverne fra Herlev Hospital repræsenterer spildevandet fra hele hospitalet.

Prøverne fra Hillerød Hospital repræsenterer spildevandet fra dele af hospitalet, som fremgår af Tabel B1.2.1

Tabel B1.2. Oversigt over afdelinger på Nordsjællands Hospital – Hillerød, Fra bygning 01 og 15 afledes spildevand til Brønd 11, og fra bygning 06, 07 og 08 afledes spildevand til Brønd 52.

Brønd 11		Brønd 52 (Bk. 58,17)		
Bygning 01	Bygning 15	Bygning 06	Bygning 07	Bygning 08
Ortopæd. sekr. 0171, 0172	Ortopædkir. Afd. O1551	Neurologisk N06671	Nefrol. Amb.	Neurologisk N0871
Kirurgisk Afd. K0161, Dagkir. 0162	G15543 Barselsgang, H1541 Børneafd. Neonatal	Ortopæd kirurgisk O 0651/62	Ortopæd. Amb.	Onkologisk E0861
Kirurgisk Afd. K0151, Ortopædkir. Afd. O0152	Børneafd. H1531	Endokrin Amb. H0652	Kardio. Amb.	Hæmodialyse O0851
Kirurgisk Afd. K0141, Barselsgang G0142	Børneafd. H1521 Amb.+ modtagelse	Endokrin. forskning H0652	Ergoterapi	
Akutmodt. For gravide G0131, Opvågning Z0132	Børneafd. H1511	Infektionsmedicinsk S0651	Gigt Amb.	
Gyn. Obs. G0121, Gyn Amb. 0122		Lungemedicinsk S0655	LIA Amb.	
Gyn. Sek. 0111, Amb for gravide 0112		Kardiologisk Afs. H0641	Fysioterapi	Nefrologisk-Endokrino. H0842
		Intensiv Z0633	Centraldepot	
		ØNH C0632		ØNH 0832 Audiologisk Afs. 0831
		Mødestedet+ LIA Amb. 0621		Øjenafd. 0821
		K-Amb 0622		
		Med. Gas. 0622		
		Central arkiv, linned depot, Sygehusapotek		Garderobe

Bilag 1.3 Prøvetagning Slagelse, Thisted, Aalborg og Hjørring hospitaler

Der er den 6. september samt den 15. november, 2016 udtaget 3 stikprøver fra forskellige brønde med spildevand fra RHN Thisted, 3 prøver på RHN Hjørring, 2 prøver på AUH Syd. To prøver er udtaget på AaUH Syd den 14. februar 2017. Endelig er der udtaget 4 stikprøver fra brønde ved Slagelse Sygehus den 17. maj og 30. august, 2016 samt 4 prøver den 24. januar 2017. Prøverne fra Nordjylland er transporteret til i laboratoriet i køletaske og analyseret dagen efter.

Lokaliteter fremgår af tabel B1.3 herunder.

Prøverne fra Slagelse er transporteret i køletaske og analyseret samme dag.

Tabel B1.3. Prøvetagningslokaliteter og oprindelsesafdelinger.

Lokalitet	Prøvetagningspunkt	Beskrivelse
RHN Thisted	Brønd 2 (215900F)	Fælleskloak, spildevand fra kirurgi og røntgen
RHN Thisted	Brønd 4 (215906F)	Fælleskloak, spildevand fra medicinsk afdeling
RHN Thisted	Brønd 5 (215090F)	Spildevandskloak, spildevand fra akutmodtagelsen
RHN Hjørring	Brønd 2	Fælleskloak, børneafdeling og behandlingsbygning
RHN Hjørring	Brønd 3	Fælleskloak, akutmodtagelse og patientbygning
RHN Hjørring	Brønd 4	Fælleskloak, Medicinsk sengeafsnit
AAUH Syd	Brønd 1 (901 – Hobrovej)	Både fælles- og separatkloakeret, senge og behandlingsbygning
AAUH Syd	Brønd 2 (902 - Mølleparkvej)	Separatkloakeret, sengeafdelinger og onkologisk ambulatorium
Slagelse Sygehus, Fælledvej	Fælledvej 4A, brønd nr. S523360. Lavt flow	
Slagelse Sygehus, Parkvej øst	Parkeringsplads ved stadion. Brønd nr. S523083. Flow fra øst til vest. Prøven blev taget ved indløbet i brønden, dvs. i øst	
Slagelse Sygehus, Parkvej vest	Parkeringsplads ved stadion. Brønd nr. F523730. Hovedflow fra øst til vest. Prøven blev taget i tilløbet fra hospitalet, med indløb fra nord.	

Bilag 2. Usikkerhedsanalyser, Herlev

Der er bestemt usikkerhed på analyserne udført på Herlev Hospital på baggrund af dobbeltbestemmelser iflg. Bekendtgørelse om kvalitetskrav til miljømålinger /13/. Ved at analysere par af identiske prøver samtidig kan man få et udtryk for den analytiske variation ved at vurdere forskellen imellem de parvise resultater. Bekendtgørelsen stiller krav til, hvor stor standardafvigelsen (af alle logaritmerede resultater) må være.

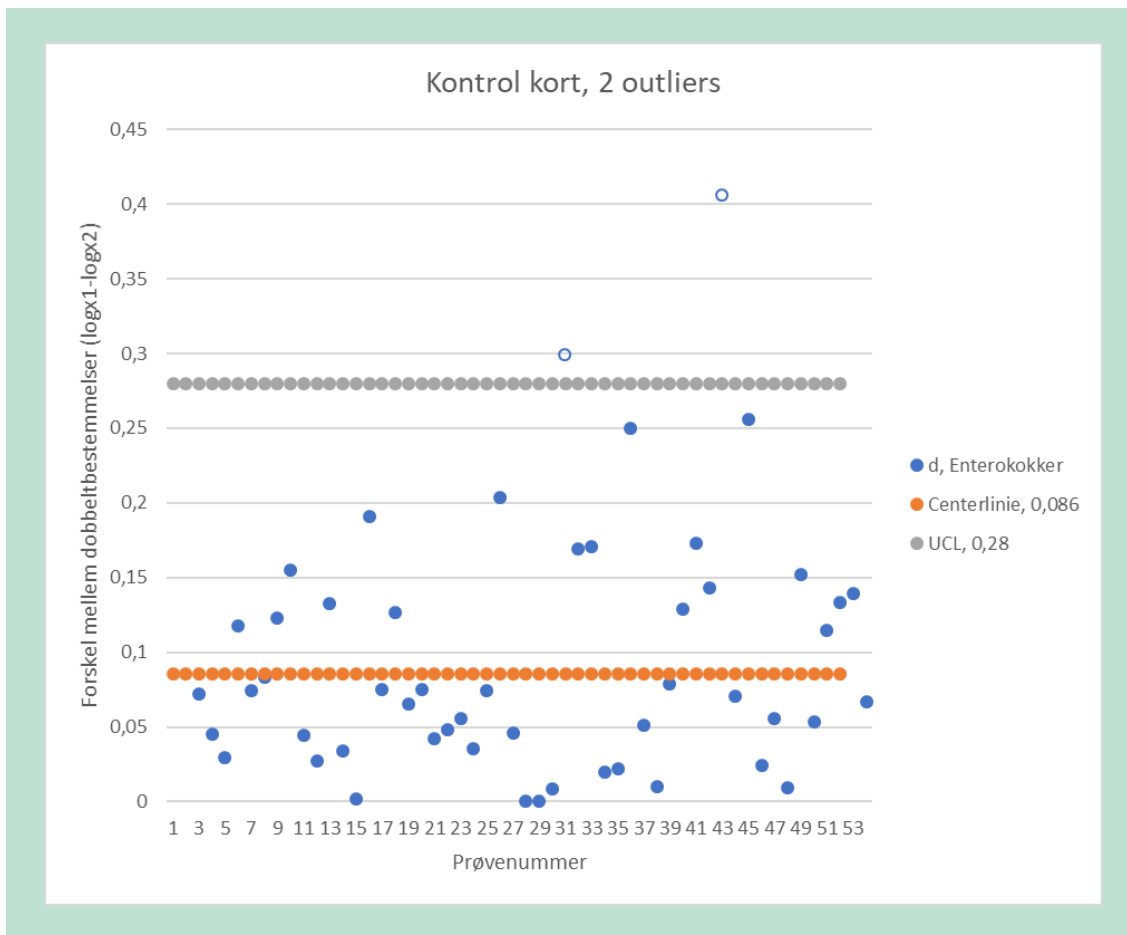
Dobbeltbestemmelser kan også anvendes til at opstille kontrolkort (r-kort) for analyserne /14/. Kontrolkortet anvendes til at undersøge, om resultaterne af de parvise analyser holder sig inden for laboratoriets historiske analytiske præcision (eksklusive bias). Ved eksklusion af outliers fås endvidere et bedre estimat af præcisionen udtrykt som standardafvigelsen af de logaritmerede resultater.

Vi har vurderet alle analyserne i forhold til Bekendtgørelsens krav og konstrueret r-kort for både resistente og ikke resistente bakterier.

Vi har desuden etableret r-kort for andelen af resistente bakterier i forhold til ikke resistente bakterier.

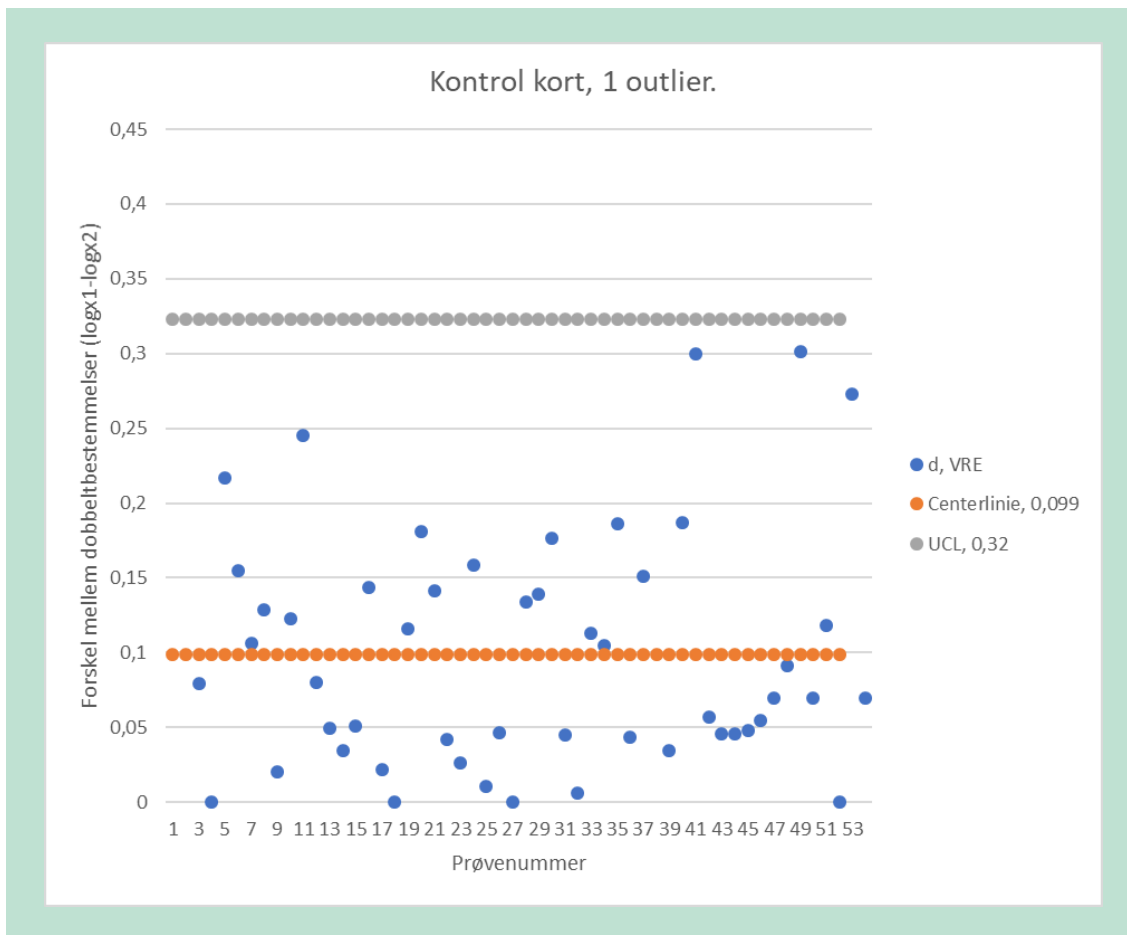
Bilag 2.1 Enterokokker og VRE

Vores bestemmelse af både Enterokokker og VRE overholder Bekendtgørelsens krav til den analytiske variation.



FIGUR B2-1. r-kort for bestemmelse af Enterokokker.

For Enterokokker blev der identificeret to outliers, som er ekskluderet fra beregningen. Centerlinjen er gennemsnittet af forskellen mellem de parvise bestemmelser, 0,086. Den øvre kontrolgrænse (UCL, 0,28) er den højeste acceptable forskel. Hvis forskellen er $> 0,28$ på to af hinanden følgende prøver, skal den analytiske procedure gennemgås.



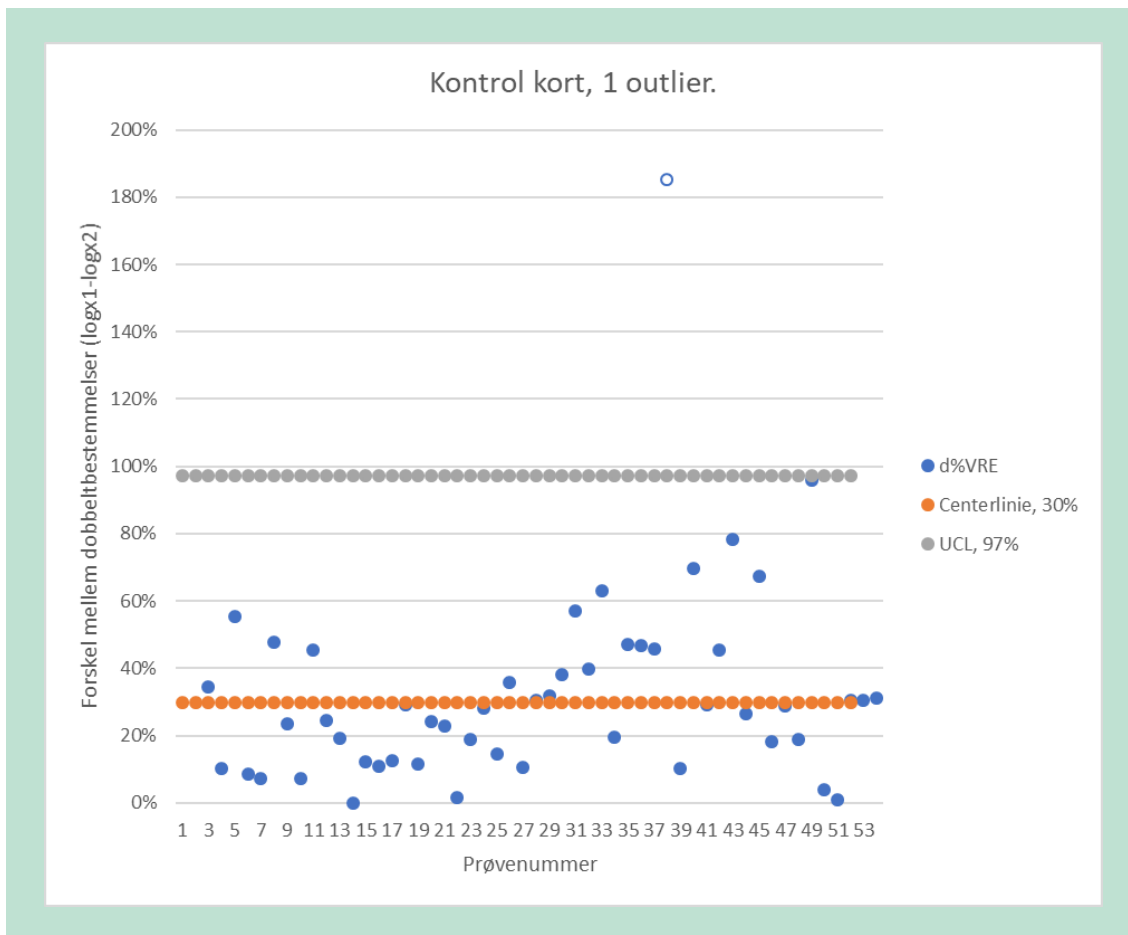
FIGUR B2-2. r-kort for bestemmelse af VRE. Der blev identificeret en outlier, som ligger uden for figuren, og som er ekskluderet fra beregningen.

Den gennemsnitlige forskel imellem de parvise analyser var lidt højere for VRE end for Enterokokker, hvilket formentlig skyldes, at koncentrationerne er lavere.

På baggrund af r-kortene er standardafvigelseerne inden for dagen af de logaritmerede resultater bestemt til s_{ent} 0,146 og s_{VRE} til 0,157, iflg. /14/. Læg mærke til, at den logaritmerede standardafvigelse resulterer i et skævt interval på en ikke-logaritmisk skala.

r-kortet for andelen af VRE i forhold til Enterokokker er vist i FIGUR B2-3. Denne beregning er lavet på de ikke logtransformerede data. Centerlinjen ligger på 30% og den øvre kontrolgrænse på 97%. Den beregnede relative standardafvigelse (CV) på bestemmelse af andelen af VRE er beregnet til 27%.

Som regel er forudsætningen for statistiske beregninger som disse, at data er normalt (eller lognormalt) fordelte. Inspektion af histogrammerne for forskellene imellem de parvise analyser viste, at denne forudsætning ikke er opfyldt.



FIGUR B2-3. r-kort for bestemmelse af andelen af VRE i forhold til Enterokokker. Der blev identificeret en outlier, som er ekskluderet fra beregningen.

Bilag 3. Variation i analyseresultater imellem laboranter

Variation af udsæd og aflæsning imellem laboranter målt som gennemsnit af Enterokokker, gennemsnit af VRE, gennemsnit af andel VRE og gennemsnit af forskel imellem dobbeltbestemmelser

	Gennemsnit Enterokokker	Gennemsnit VRE	%VRE	Gennemsnitlig forskel mellem dobbeltbestemmelser	
	pr. 100 ml	pr. 100 ml	%	%	n
Udsæd					
Laborant 1	1,48E+07	4,25E+05	2,9%	24%	21
Laborant 2	1,62E+07	3,03E+05	2,4%	33%	23
Aflæsning					
Laborant 1	1,65E+07	4,24E+05	3,1%	26%	18
Laborant 2	1,45E+07	3,12E+05	2,5%	32%	22

Varslingsværktøj til forebyggelse af spredning af antibiotikaresistens på hospitaler

Formålet med dette projekt har været at udvikle et varslingsværktøj til forebyggelse af spredning af antibiotikaresistens på hospitaler og i det omgivende miljø. Værktøjet er baseret på periodisk måling af antibiotikaresistente bakterier i hospitalsspildevand. Hospitalerne er en vigtig del af spredningsvejen for antibiotikaresistens. Det er også på hospitalerne, at problemerne er mest synlige, fordi hospitalserhvervede infektioner med resistente patogener i alvorlig grad truer lægernes mulighed for at behandle patienterne. Hvis man undgår udbrud på hospitaler, vil man også mindske spredningen af resistente egenskaber i miljøet og bidrage til at mindske puljen af resistente gener i naturen.

Projektets grundlæggende antagelse er, at det er muligt at genfinde resistente bakterier fra patienter i spildevandet fra hospitalerne. For Vancomycin Resistente Enterokokker (VRE) viste resultaterne af sekventeringen, at de fleste af de VRE'er, der er isoleret i spildevandet, er identiske med VRE-isolater, som stammer fra patienterne fra samme periode. Projektet har ikke sekventeringsdata for Carbapenemase Producerende Enterobakterier (CPE), men de fenotypiske metoder tyder på, at der også her er overensstemmelse imellem patient- og spildevandsisolater



Miljøstyrelsen
Tolderlundsvej 5 5
5000 Odense C

www.mst.dk