

Projectnummer: 872.498.01
Projecttitel: BO-VTEC
BAS-code: BO-08-003-041

Projectleider: E. Franz

Rapport 2009.004

mei 2009

Verocytotoxine-producerende *E.coli* **risicofactoren en update Nederland**

E. Franz, J.A. van der Goot¹, F.J. van der Wal¹ en D. Döpfer¹

Business Unit: Veiligheid & Gezondheid
Cluster: Databanken, Risicoschatting & Ketenmanagement

RIKILT - Instituut voor Voedselveiligheid
Wageningen Universiteit en Researchcentrum
Bornsesteeg 45, 6708 PD Wageningen
Postbus 230, 6700 AE Wageningen
Tel 0317 480 256
Fax 0317 417 717
Internet: www.rikilt.wur.nl

¹Centraal Veterinair Instituut
Wageningen Universiteit en Researchcentrum
Houtribweg 39, 8221 RA Lelystad
Postbus 65, 8200 AB Lelystad
Tel 0320 238 800
Fax 0320 238 668
Internet: www.cvi.wur.nl

Copyright 2009, RIKILT - Instituut voor Voedselveiligheid.

Het is de opdrachtgever toegestaan dit rapport integraal openbaar te maken en ter inzage te geven aan derden. Zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van RIKILT - Instituut voor Voedselveiligheid is het niet toegestaan:

- a) *dit door RIKILT - Instituut voor Voedselveiligheid uitgebracht rapport gedeeltelijk te publiceren of op andere wijze gedeeltelijk openbaar te maken;*
- b) *dit door RIKILT - Instituut voor Voedselveiligheid uitgebracht rapport, c.q. de naam van het rapport of RIKILT - Instituut voor Voedselveiligheid, geheel of gedeeltelijk te doen gebruiken ten behoeve van het instellen van claims, voor het voeren van gerechtelijke procedures, voor reclame of antireclame en ten behoeve van werving in meer algemene zin;*
- c) *de naam van RIKILT - Instituut voor Voedselveiligheid te gebruiken in andere zin dan als auteur van dit rapport.*

Het onderzoek beschreven in dit rapport is gefinancierd door: Ministerie van Landbouw, Natuur en Voedselkwaliteit, onderzoeksthema Voedselveiligheid, subthema Microbiologisch veilig.

Verzendlijst:

- Ministerie van Landbouw, Natuur en Voedselkwaliteit (Martin Hennecken, Eric Pierey)
- Ministerie van Volksgezondheid, Welzijn en Sport (Inge Stoelhorst, Arie Ottevanger)
- Voedsel en Waren Autoriteit BuR (Rob van Oosterom, Wim Ooms, Benno ter Kuile)
- Voedsel en Waren Autoriteit regio Oost (Annet Heuvelink, Enne de Boer)
- Voedsel en Waren Autoriteit regio Noordwest (Aarieke de Jong)
- CVI (Jeanet van de Goot, Fimme van der Wal, Kitty Maassen)
- Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu (Yvonne van Duynhoven, Ingrid Friesema, Wilfrid van Pelt, Frans van Leusden)
- Plant Research International, Wageningen UR (Leo van Overbeek)
- Radboud University Nijmegen Medical Center, Department of Pediatric Nephrology (Nicole van de Kar)

<p>Bij de totstandkoming van dit rapport is de grootst mogelijke zorgvuldigheid betracht. Tenzij vooraf schriftelijk anders overeengekomen aanvaardt RIKILT - Instituut voor Voedselveiligheid geen aansprakelijkheid voor schadeclaims die worden uitgebracht n.a.v. de inhoud van dit rapport.</p>
--

Samenvatting

Verocytotoxine-producerende *E. coli* (VTEC) is een groep pathogenen die ernstige ziekteverschijnselen bij de mens kan veroorzaken. VTEC heeft een duidelijk zoönotisch karakter met rundvee als belangrijkste reservoir. Het meest bekende serotype VTEC is *E. coli* O157:H7. Langjarige monitoring naar de prevalentie van *E. coli* O157:H7 in Nederland laat zien dat dit serotype endemisch is in de Nederlandse rundveestapel. Opvallend is de hoge prevalentie onder rosékalveren.

De basis incidentie van *geregistreeerde* humane VTEC O157 infecties in Nederland ligt op 0.26 gevallen per 100,000 inwoners per jaar (43 gevallen per jaar). Dit is ruim beneden het Europees langjarig gemiddelde. Door een uitbraak gerelateerd aan voorverpakte gesneden sla was de incidentie in Nederland voor 2007 min of meer gelijk aan het Europees gemiddelde voor dat jaar (0.6 versus 0.5 gevallen per 100,000 inwoners). Het *werkelijke* aantal VTEC O157 infecties wordt een factor 45-50 hoger ingeschat.

Het lijkt dat de sporadische VTEC O157 infecties voornamelijk het gevolg zijn van direct contact met landbouwhuisdieren en mest, terwijl uitbraken met name gerelateerd zijn aan besmet voedsel (fillet americain in 2005 en gesneden sla in 2007).

Diagnostische resultaten uit Nederland en andere Europese landen laten zien dat non-O157 VTEC serotypen relatief steeds vaker geassocieerd worden met klinische cases en uitbraken. Echter, de surveillance van non-O157 VTEC in Nederland is nog niet voldoende. Kennis hierover zou sterk bijdragen aan een volledig beeld van de VTEC problematiek in Nederland.

Rundvleesproducten zijn in het algemeen de belangrijkste oorzaak van voedselgerelateerde VTEC (O157) infecties. Alhoewel een combinatie van interventie maatregelen op het rundveebedrijf de VTEC last in de rundveestapel kan verlagen, zijn interventies op slachthuisniveau het meest kosteneffectief en realistisch. Echter, vanwege de relatief lage ziekte incidentie onder de bevolking is er geen directe aanleiding voor grootschalige interventiestrategieën om de basis incidentie te verlagen. Momenteel vind er geen decontaminatie van karkassen en/of vlees plaats in de slachthuizen. Gedurende de laatste jaren is er internationaal een toename in het aantal uitbraken van VTEC voedselvergiftigingen gerelateerd aan de consumptie van verse groenten. Wat betreft de potentiële besmetting van groenten is het voorkómen van besmetting in de primaire productie belangrijk aangezien er geen decontaminatie plaatsvindt na de oogst en geen verhitting voor consumptie.

De aanbevelingen die in rapport worden gedaan centreren zich rondom de volgende punten:

- 1) surveillance naar non-O157 serotypen,
- 2) het (vroegtijdig) signaleren van nieuwe transmissieroutes,
- 3) het (vroegtijdig) signaleren van risicovolle condities in de voedselproductieketen
- 4) onderzoek naar de selectie en/of ontwikkeling van VTEC stressresistentie en/of verhoogde virulentie in de voedselproductieketen.

Inhoudsopgave

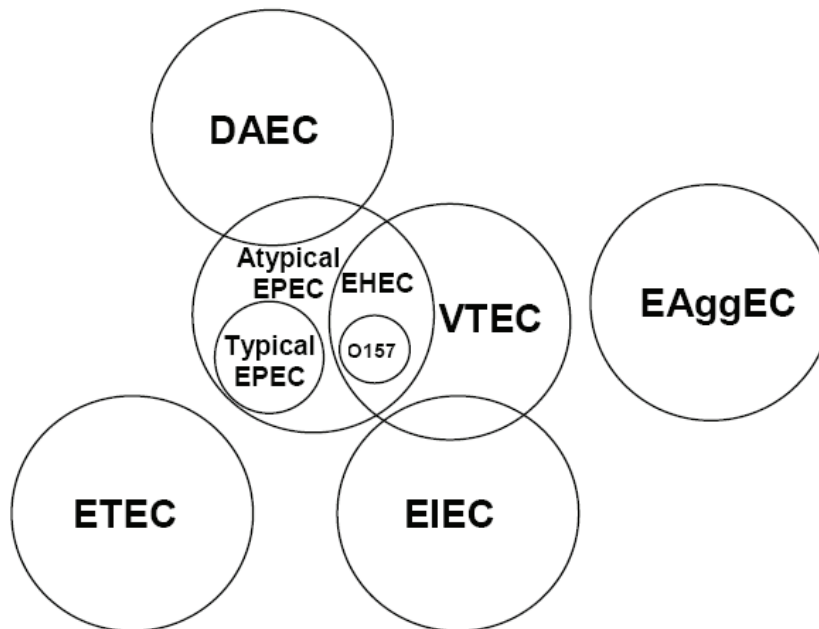
Samenvatting	3
Inhoudsopgave.....	5
1 Introductie	7
1.1 Pathogene <i>Escherichia coli</i>	7
1.2 Verocytotoxine-producerende <i>E. coli</i> (VTEC).....	7
1.2.1 Virulentiefactoren.....	8
1.3 Doelstelling onderzoek	9
2 Resultaten.....	10
2.1 VTEC in de Europees rundvee	10
2.2 VTEC in de Nederlandse veestapel	10
2.2.1 Rundvee.....	11
2.2.2 Overige landbouwhuisdieren.....	12
2.2.3 Non-O157 VTEC serotypen.....	12
2.3 VTEC onder de Europese bevolking	13
2.3.1 Periode 2000 tot en met 2005.....	13
2.3.2 Periode 2006 en 2007	13
2.4 VTEC onder de Nederlandse bevolking	16
2.4.1 Incidentie van VTEC O157	16
2.4.2 Risicofactoren voor VTEC O157 infecties.....	19
2.4.3 Ziekte last door VTEC O157.....	20
2.4.4 Klinische profielen van VTEC in Nederland.....	21
2.5 Risicobeheersing van VTEC in Nederland.....	23
2.6 VTEC onderzoek in Nederland	27
2.7 VTEC in de rundvleesproductieketen.....	28
2.7.1 Risicofactoren voor VTEC besmetting in de rundvleesproductieketen.....	28
2.7.2 Interventiestrategieën	29
2.7.3 Kosteneffectiviteit van interventiestrategieën	30
2.8 VTEC in de productieketen van groenten	31
2.8.1 Verse groenten als bron voor VTEC infecties: internationaal	31
2.8.2 Verse groenten als bron voor VTEC infecties: Nederland	32
2.8.3 Besmetting van groenten met VTEC.....	33
2.8.4 Risicofactoren voor besmetting in de primaire productiefase	34
2.8.4.1 Besmetting van groenten in biologische versus gangbare productie	34
2.8.4.2 Problematiek indicator organismen	35
2.8.4.3 Mest en bodemmanagement	35
2.8.5 Post-harvest risicofactoren	37
2.8.5.1 Temperatuur	37
2.8.5.2 Post-harvest decontaminatie	38
2.8.5.3 Kruisbesmetting gedurende verwerking	38
2.8.5.4 Verpakking met "modified atmosphere"	39

3	Discussie en conclusies	40
4	Aanbevelingen	43
5	Literatuur.....	45

1 Introductie

1.1 Pathogene *Escherichia coli*

Escherichia coli is normaliter een nuttige algemene bewoner van het darmstelsel van zoogdieren. Echter, bepaalde *E. coli* stammen hebben zich ontwikkeld tot pathogenen die serieuze klinische verschijnselen bij de mens kunnen veroorzaken. Op basis van de pathogenese, diagnostiek en klinische symptomen kunnen er zes zogenaamde pathogroepen worden onderscheiden (EPEC, EIEC, ETEC, EHEC, EAEC of EAggEC en DAEC). De enterohaemorrhagische *E. coli* (EHEC) is een sterk met humane infectie geassocieerde subgroep van de Verocytotoxine producerende *E. coli* (VTEC) (Figuur 1). De EHEC groep is de enige pathogroep met een duidelijk zoönotisch karakter, met rundvee als het belangrijkste reservoir.



Figuur. 1. Vendiagram van de verschillende *E. coli* (patho)-groepen: Verocytotoxigenic *E. coli* (VTEC), Enterotoxigenic *E. coli* (ETEC), Enteroinvasive *E. coli* (EIEC), Enteropathogenic *E. coli* (EPEC), Enteroaggregative *E. coli* (EAggEC) en Diffusely adherent *E. coli* (DAEC) (Donnenberg, 2002). *E. coli* O157 is het meest bekende VTEC serotype.

1.2 Verocytotoxine-producerende *E. coli* (VTEC)

VTEC werd voor het eerst beschreven in 1977 en zijn genoemd naar het cytotoxische effect van de toxines die ze produceren op zogenoemde Verocellen (epitheelcellen uit de nieren van de Afrikaanse groene aap) (Konowalchuk et al., 1977). Epidemiologisch onderzoek in de jaren tachtig legde het verband tussen VTEC infecties en hemorragische colitis (HC, ernstige bloederige diarree) en het hemolytisch-uremisch syndroom (HUS) (Karmali, 1989). HUS treft met name jonge kinderen en wordt gekarakteriseerd door bloedarmoede, tekort aan bloedplaatjes en acuut falen van nierfuncties.

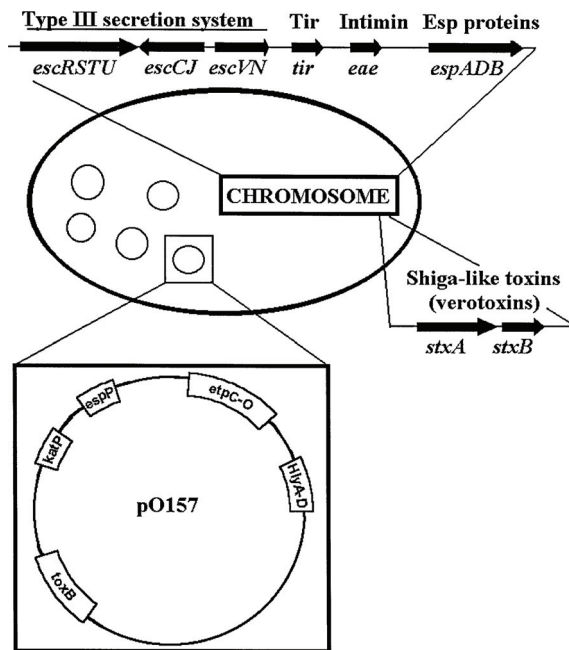
Het meeste bekende/onderzochte VTEC serotype is *E. coli* O157:H7, dat in 1983 voor het eerst werd geïdentificeerd als de oorzaak van HC en HUS (Riley et al., 1983). Echter, VTEC is een zeer diverse groep met meer dan 200 verschillende serotypen, waarvan er meer dan 100 zijn geassocieerd met klinische symptomen (Bettelheim, 2007).

1.2.1 Virulentiefactoren

De mogelijkheid van VTEC om Verocytotoxine te produceren wordt beschouwd als een van de belangrijkste virulentiefactoren. Er bestaan twee Verocytotoxines (VT1 en VT2), beiden gecodeerd door genen (vt1 en vt2) die gelegen zijn op bacteriofaag DNA dat geïntegreerd is in het bacteriële genoom en waarvan de expressie onder controle staat van zogenaamde vt-fagen (Kaper et al., 2004) (Figuur 2). Deze vt-fagen kunnen ook de horizontale overdracht van Verotoxine-coderende genen faciliteren (O'Brien et al., 1984).

Naast de productie van Verocytotoxine zijn er vele andere virulentiefactoren aanwezig, zoals intimine (zorgt voor hechting van de bacterie aan darmepitheel) en hemolysine (zorgt voor het lyseren van cellen) (Figuur 2). Een uitgebreide beschrijving van VTEC pathogenese en virulentiefactoren valt buiten het inhoudelijke kader van dit rapport. We verwijzen de lezer hiervoor naar een aantal excellente reviews voor meer informatie (Paton et al., 1998; LeBlanc, 2003; Kaper et al., 2004). De aanwezigheid van de verschillende virulentiefactoren laat een grote diversiteit en combinaties zien tussen verschillende VTEC stammen. Meerdere epidemiologische studies hebben laten zien dat de combinatie vt2 en intimine het sterkst zijn geassocieerd met klinische symptomen bij mensen (Boerlin et al., 1999; Ethelberg et al., 2004). Het feit dat vele VTEC virulentiefactoren op mobiele genetische elementen gecodeerd zijn betekent dat verlies van deze genen door pathogene stammen en het verkrijgen er van door oorspronkelijk niet pathogene *E. coli* stammen een dynamisch proces is wat voortdurend plaatsvindt.

Alhoewel er verschillende hypothesen zijn, is het onduidelijk welke factoren verantwoordelijk zijn voor de stijgende prevalentie van met name *E. coli* O157:H7 over de afgelopen twee decennia. Hoogstwaarschijnlijk heeft dit te maken met veranderende landbouw productiesystemen, waarbij een hogere dichtheid van vee en een hogere intensiteit / globalisering van veetransport mogelijk belangrijke aspecten zijn. Ook de toepassing van productieverhogende strategieën zoals het gebruik van ionoforen en koolhydraatrijke voederregimes in de rundveehouderij worden genoemd als factoren die de verspreiding van pathogenen zoals *E. coli* O157:H7 zouden hebben bevorderd (Vanselow et al., 2005).



Figuur 2. Schematisch overzicht van de belangrijkste EHEC/VTEC virulentiefactoren. Het in het bacterieel genoom gelegen pathogeniciteit-eiland LEE codeert o.a. voor een excretiesysteem en intimine; het faag DNA coderend voor de Verocytotoxines ligt ook in het bacterieel genoom; het gen voor hemolysine ligt samen met andere virulentiefactoren op een plasmide (pO157).

1.3 Doelstelling onderzoek

Momenteel is er geen samenvattend overzicht van de bestaande Nederlandse gegevens betreffende de risico's van VTEC/STEC in de diverse ketens en risico's hiervan voor de mens. Dit heeft tot gevolg dat het moeilijk is een duidelijke stelling te formuleren ten aanzien van de bestaande risico's op humane uitbraken uitgaande van reservoirs in de relevante ketens en de omgeving. Het doel van dit rapport is om een overzicht te presenteren betreffende het vóórkomen van VTEC in verschillende reservoirs, infectie incidentie, transmissieroutes, risicofactoren voor verspreiding door de voedselketen, diagnostiek, uitbraaktracering en (potentiële) interventiestrategieën. De focus is op de Nederlandse situatie en hoe die zich verhoudt met de Europese situatie. De inhoud van dit rapport is tot stand gekomen door het bijeenbrengen van informatie uit de wetenschappelijke literatuur, rapporten van onderzoek- en handhavinginstituten, een interview met experts en kennis aanwezig binnen Wageningen UR.

2 Resultaten

2.1 VTEC in de Europees rundvee

De gemiddelde VTEC prevalentie in 2007 onder individuele koeien/kalveren in de Europese Unie was 3.6% (n=5154) en de prevalentie van VTEC O157 was 2.9% (Tabel 1). Deze prevalentie loopt uiteen van 0% (Duitsland, Portugal) tot 22% (Luxemburg). De prevalentie van VTEC op bedrijfsniveau bedroeg in 2007 8.1% en voor VTEC O157 6.3%. Er is slechts weinig data beschikbaar betreffende non-O157 VETC serogroepen. Naast rundvee wordt VTEC aanwezigheid gerapporteerd in schapen (maximaal 1.4%), geiten (maximaal 4.2%) en varkens (maximaal 0.1%).

Tabel 1. VTEC prevalentie onder Europees rundvee, 2007 (Anonymous, 2009).

Country	Unit	No.	VTEC		VTEC O157		Comment
			Pos	% Pos	Pos	% Pos	
Calves							
Austria	Animal	44	1	2.3	0		O150
Denmark	Animal	186	14	7.5	14	7.5	
Germany	Animal	371	0		0		
Netherlands	Holding	174	23	13.2	23	13.2	
Dairy cows							
Estonia	Animal	162	0		0		
Germany	Animal	728	0		0		
Netherlands	holding	157	6	3.8	6	3.8	
Meat production animals							
Lithuania	Animal	96	0		0		
Spain	Animal	312	53	17.0	53	17.0	
Not specified							
Finland	Animal	1,534	19	1.2	19	1.2	O157
Germany	Animal	1,204	33	2.7	0		O91 (4) and unspecified (29)
Italy	Animal	27	3	11.1	1	3.7	O157 (1) and unspecified (2)
Italy	Herd	228	16	7.0	6	2.6	O157 (6) and unspecified (10)
Luxembourg	Animal	240	53	22.1	53	22.1	
Portugal	Animal	52	0		0		
Slovenia	Animal	198	12	6.1	12	6.1	
Total (12 MSs)	Animal	5,154	188	3.6	152	2.9	
	Herd/holding	559	45	8.1	35	6.3	

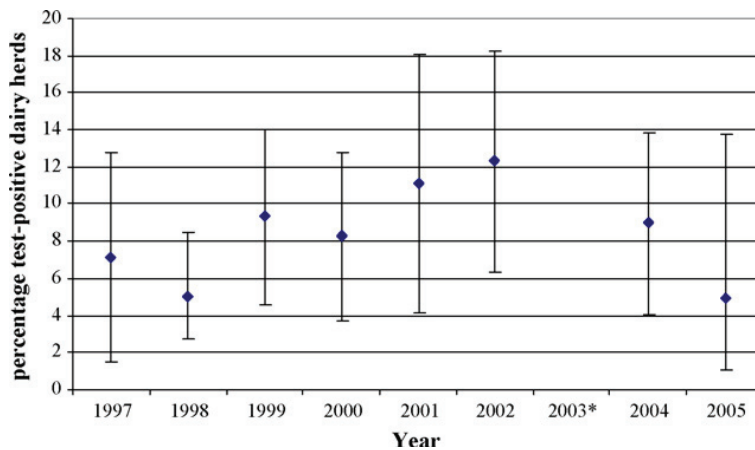
1. Data are only presented for sample size ≥ 25

2.2 VTEC in de Nederlandse veestapel

Van November 1996 tot Juli 2005 heeft het RIVM, in opdracht van de VWA, een nationale monitoring uitgevoerd naar zoönotische bacteriën (waaronder VTEC O157) in populaties van Nederlandse landbouwhuisdieren. Het belangrijkste doel van dit programma was betrouwbare data te verkrijgen omtrent de prevalentie van zoönotische bacteriën en risicofactoren geassocieerd met hun prevalentie. De details van deze monitoring zijn beschreven in reeds verschenen publicaties (Bouwknegt, 2004; Schouten et al., 2004).

2.2.1 Rundvee

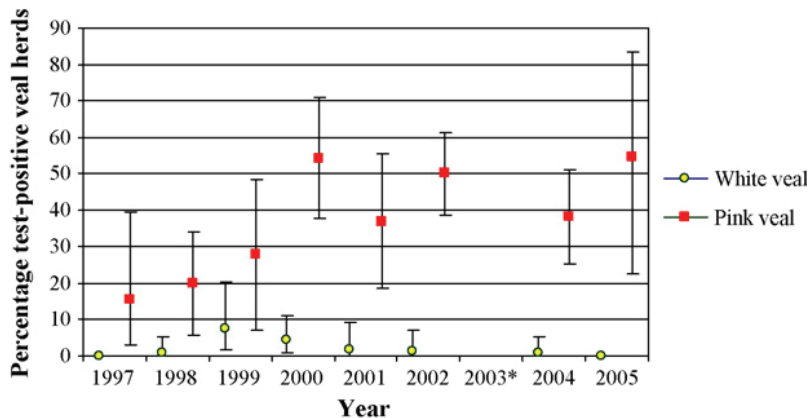
Rundvee is verreweg het belangrijkste reservoir voor VTEC O157. De resultaten betreffende rundvee over de gehele periode 1996-2005 zijn recentelijk gepubliceerd (Berends et al., 2008) (Figuur 3, Figuur 4). In totaal data verzameld van 1051 melkveebedrijven en 930 bedrijven met vleeskalveren.



Figuur 3. Jaarlijkse prevalentie van VTEC O157 positief geteste melkveehouderijen in de periode 1997-2005. * Geen data beschikbaar vanwege vogelgriep epidemie (Berends et al., 2008).

De gemiddelde prevalentie van VTEC O157 was 8.0% (betrouwbaarheidsinterval: 6.4-9.6) voor melkveehouderijen (Figuur 3) en 12.6% (betrouwbaarheidsinterval: 10.5-14.7) voor bedrijven met vleeskalveren (Figuur 4). De vleeskalveren kunnen worden onderverdeeld in rosékalveren en witvleeskalveren. De twee typen verschillen significant in VTEC O157 prevalentie: 39.8% (betrouwbaarheidsinterval: 33.9-45.6) voor rosékalveren en slechts 1.5% (betrouwbaarheidsinterval: 0.7-2.8%) voor witvleeskalveren. Alleen onder bedrijven met rosékalveren is stijgende trend te zien in VTEC O157 prevalentie.

De resultaten van deze monitoring laten zien dat VTEC O157 endemisch is op Nederlandse rundveehouderijen. De prevalentie van VTEC O157 volgt een seizoenspatroon met pieken in prevalentie gedurende de tweede helft van de zomer. Het aantal humane cases volgt deze piek in prevalentie. Opvallend is dat, in tegenstelling tot melkvee, positieve bedrijven met vleeskalveren ook zijn gedetecteerd in de winter (Schouten et al., 2005a).



Figuur 4. Jaarlijkse prevalentie van VTEC O157 positief geteste bedrijven met vleeskalveren in de periode 1997-2005. White veal: witvleeskalveren; pink veal: rosékalveren. * Geen data beschikbaar vanwege vogelgriep epidemie (Berends et al., 2008).

Alhoewel de gemiddelde VTEC O157 prevalentie onder melkveebedrijven ongeveer 8% is, zijn er uitschieters mogelijk tot 36% (Schouten et al., 2004), 52% (n=25, CI: 0.36-0.67) (Franz et al., 2007a) en zelfs 70% (n=10) (Heuvelink et al., 1998c). Het moet worden benadrukt dat deze uitschieters moment opnames zijn. Bovendien lijken deze uitschieters gecorreleerd aan een hoge gemiddelde en maximum maandtemperatuur (Franz et al., 2007a). Alhoewel in een aantal studies de prevalentie van VTEC O157 op biologische rundveebedrijven hoger is dan op gangbare bedrijven, is er tot nu toe geen statistisch significant verschil waargenomen tussen beide bedrijfstypen (Kuhnert et al., 2005; Cho et al., 2006; Franz et al., 2007a). Een kleinschalige surveillance naar de prevalentie van *E. coli* O157 en VTEC virulentiefactoren onder biologische en gangbare melkveehouderijen liet zien dat *E. coli* O157 vaker voorkwam op biologische bedrijven maar dat op gangbare bedrijven vaker klinisch risicovolle combinaties van virulentiefactoren werden aangetroffen (Franz et al., 2007a).

2.2.2 Overige landbouwhuisdieren

Naast rundveebedrijven komt VTEC O157 ook sporadisch voor onder andere landbouwdieren. In de periode 1996-2000 was de prevalentie op bedrijfsniveau voor vleeskuikens, leghennen en varkens respectievelijk 1.7%, 0.5% en 0.4% (Schouten et al., 2005a). In de periode 1995-1996 was de VTEC O157 prevalentie op bedrijfsniveau 4% voor schapen en van 4.1% onder lammeren (Heuvelink et al., 1998a). In de periode 1997-1998 bedroeg de bedrijfs-prevalentie van VTEC O157 onder varkens 1.4% en onder kalkoenen 1.3% (Heuvelink et al., 1999b).

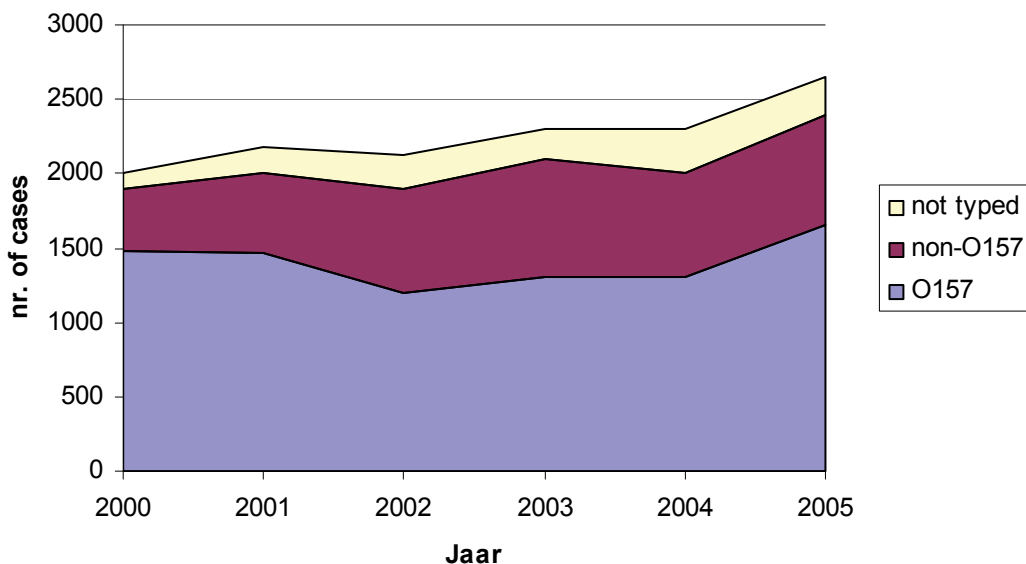
2.2.3 Non-O157 VTEC serotypen

VTEC is een brede groep (potentiële) pathogenen en omvat veel meer serotypen dan alleen *E. coli* O157. In principe hebben alle VTEC serotypen genen die coderen voor Verocytotoxine 1 of 2, of beide. Andere klinisch relevante serotypen zijn o.a. O26, O111, en O145. Wat betreft de prevalentie van non-O157 VTEC serotypen in de Nederlandse rundveestapel is nagenoeg niets bekend. Een prevalentie van 80% voor de aanwezigheid van Verocytotoxine genen (vt) onder Nederlandse melkveehouderijen geeft echter aan dat de prevalentie van VTEC hoogstwaarschijnlijk een aantal malen hoger ligt dan die van VTEC O157 alleen (Franz et al., 2007a).

2.3 VTEC onder de Europese bevolking

2.3.1 Periode 2000 tot en met 2005

In tegenstelling tot het aantal *Salmonella* infecties, was er in Europa (21 landen) een stijging in het aantal VTEC infecties tussen 2000 en 2006 (Fisher, 2006). In 2005 waren er 2660 cases in vergelijking met 2022 in het jaar 2000 (stijging van 31.6%) (Figuur 5). VTEC O157 was het meest geïsoleerde serotype en steeg van 1443 naar 1644 cases (+13.9%). De non-O157 VTEC serotypen worden steeds meer als belangrijk beschouwd en stegen van 476 naar 764 cases (+60.5%). Over de periode 2005-2006 was 66% van humane cases het gevolg van VTEC O157, 20% het gevolg van O26, O103, O91, O145 en O111, en 14% het gevolg van andere serotypen. Over dezelfde periode was VTEC O157 verantwoordelijk voor 68% van de HUS gevallen, O26/O103/O91/O145/O111 voor 26% van de gevallen en overige serotypen voor 6% van de gevallen. Onder "overige" vallen 110 verschillende serotypen.

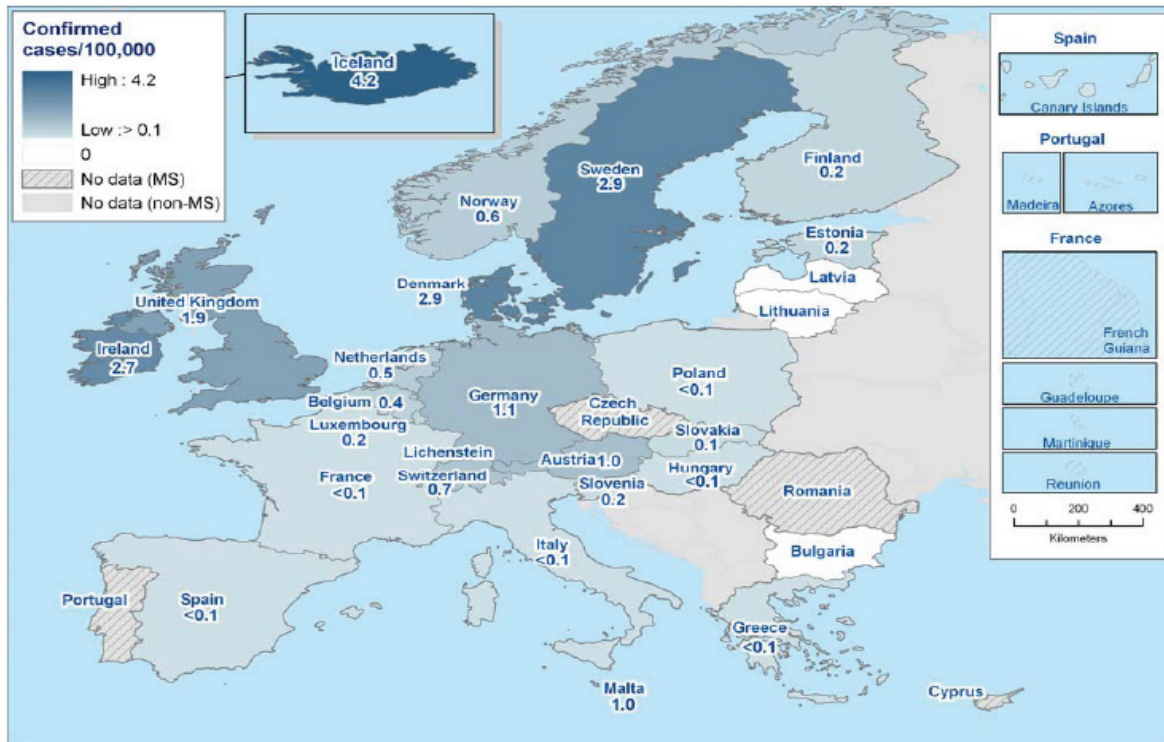


Figuur 5. Trend in VTEC cases in Europa (21 landen) gerapporteerd in Enter-net, 2000-2006 (Fisher, 2006).

2.3.2 Periode 2006 en 2007

In 2007 werden er door 22 Europese lidstaten in totaal 2905 VTEC infecties gerapporteerd, wat een afname is van 13.5% ten opzichte van 2006 (3357 gerapporteerde infecties) (Anonymous, 2009). De gemiddelde incidentie betrof in 2007 0.6 gevallen per 100,000 EU inwoners. Het Verenigd Koninkrijk en Duitsland waren verantwoordelijk voor 70% van alle Europese gevallen in 2007. De Europese VTEC incidentie is relatief verlaag vergeleken met *Campylobacter* (200,000 cases) en *Salmonella* (152,000 cases). VTEC bezet plaats vier wat betreft incidentie (achter *Yersinia* en voor *Listeria*).

Figuur 6 laat de geografische distributie zien van humane VTEC infecties in Europa (Anonymous, 2009). De incidentie in Nederland in 2007 (0.5 per 100,000 inwoners) ligt, ondanks de aan sla gerelateerde uitbraak, onder het EU gemiddelde van 0.6 per 100,000 inwoners. Relatief hoge incidentie komt voor in Zweden, Ierland, Verenigd Koninkrijk en Duitsland.



Figuur 6. VTEC notificaties (cases per 100,000 inwoners) in de bevolking van de Europese Unie in 2007 (Anonymous, 2009).

Ruim de helft (54.1%) van de bevestigde gerapporteerde humane cases in 2007 waren geassocieerd met VTEC O157 (Tabel 1). Een groot gedeelte van de cases was geassocieerd met niet-typeerbare VTEC (29%). De meest voorkomende serogroepen na O157 (>1%) waren O26, O103, O91 en O145 (Tabel 1). In totaal werden er in de EU 103 HUS gevallen gerapporteerd, waarvan ruim 34% kinderen in de leeftijd 0 tot 4 jaar betrof (Anonymous, 2009).

Naast individuele gevallen, hebben zich in Europa de afgelopen jaren ook een aantal VTEC uitbraken voorgedaan (Tabel 2). Opvallend is dat VTEC uitbraken bijna altijd gerelateerd zijn aan de consumptie van besmet voedsel, terwijl individuele gevallen en kleine clusters van gevallen vaak het gevolg zijn van direct contact met dieren en person-to-person verspreiding. Opvallend is ook het relatief hoge percentage HUS gevallen bij de uitbraken met non-O157 stammen (O103, O145 en O26 in respectievelijk schapenvlees en roomijs).

Tabel 1. Gerapporteerde bevestigde humane VTEC gevallen in de Europese Unie onderverdeeld naar VETC serogroep (Anonymous, 2009).

2007				2006			
Serogroup	No. of cases	% Total	% Known	Serogroup	No. of cases	% Total	% Known
O157	1,571	54.1	54.1	O157	1,583	48.1	69.2
NT	842	29.0	29.0	O26	123	3.7	5.4
O26	136	4.7	4.7	O103	86	2.6	3.8
O103	77	2.7	2.7	O119	86	2.6	3.8
O91	43	1.5	1.5	O111	65	2.0	2.8
O145	31	1.1	1.1	O86	61	1.9	2.7
O111	23	0.8	0.8	O91	42	1.3	1.8
O128	21	0.7	0.7	O145	31	0.9	1.4
O113	16	0.6	0.6	O124	28	0.9	1.2
O146	14	0.5	0.5	O44	28	0.9	1.2
Other	130	4.5	4.5	Other	156	4.7	6.8
Unknown	0	0.0	-	Unknown	1005	30.5	-
Total	2,904			Total	3,294		

Tabel 2. Selectie van VTEC uitbraken in Europa uit de database van Eurosurveillance (<http://www.eurosurveillance.org>).

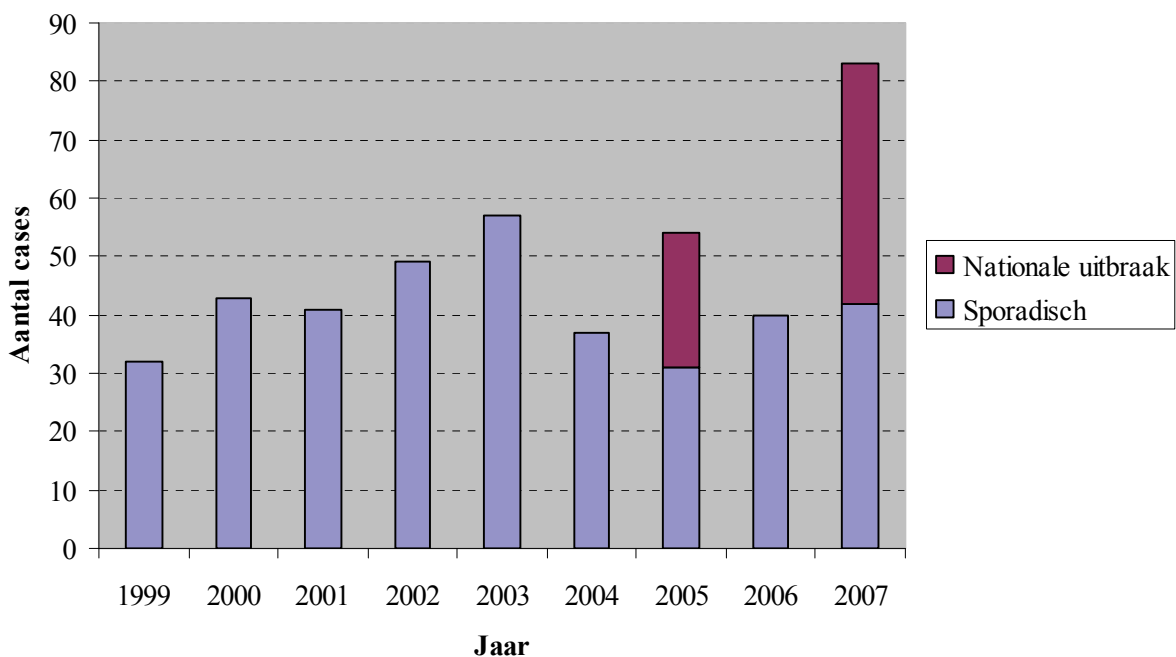
Jaar	Land	Serotype	Product	Aantal cases	Aantal HUS	Aantal doden
1996	Schotland	O157	Rundvlees	293		10
1999	Schotland	O157	Kaas van rauwe	30	1	
1999	Engeland	O157	Rauwe koemelk	38	3	
2000	Spanie	O157	Worst	181		
2004	Denemarken	O157	Koemelk	25		
2005	Zweden	O157	Sla	120	7	
2005	Wales	O157	Rundvlees	157		
2005	Ierland	O157	Water	18	2	
2005	Nederland	O157	Filet Américain	21-32	0	
2006	Denemarken	O157:H-	Biologische melk	25		
2006	Noorwegen	O103:H25	Worst (schaap)	23	10	1
2007	Denemarken	O26:H11	Runderworst	20		
2007	België	O145 & O26	Roomijs	12	5	
2007	Nederland	O157	Gesneden sla	41		
2008	Ierland	O157	Drinkwater uit	>50		

2.4 VTEC onder de Nederlandse bevolking

In Nederland is er sinds 1996 gestructureerde surveillance naar *E. coli* O157 (STEC O157). Vijftien regionale medische streeklaboratoria rapporteerden wekelijks positieve resultaten aan het RIVM, waar de isolaten ook werden getypeerd. Per 1 januari 1999 werd deze surveillance geïntensiveerd, waarbij alle medische laboratoria werden verzocht te participeren. Bovendien werden de GGD's per 1 April 1999 verzocht om contact te leggen met elke positieve patiënt om informatie te verzamelen betreffende de klinische manifestaties en risicofactoren. Per december 1999 is er in Nederland een verplichte meldingsplicht voor ziektegevallen als gevolg van infectie met enterohaemorrhagische *E. coli* (EHEC). EHEC omvat de STEC serotypen die klinische manifestatie veroorzaken bij mensen.

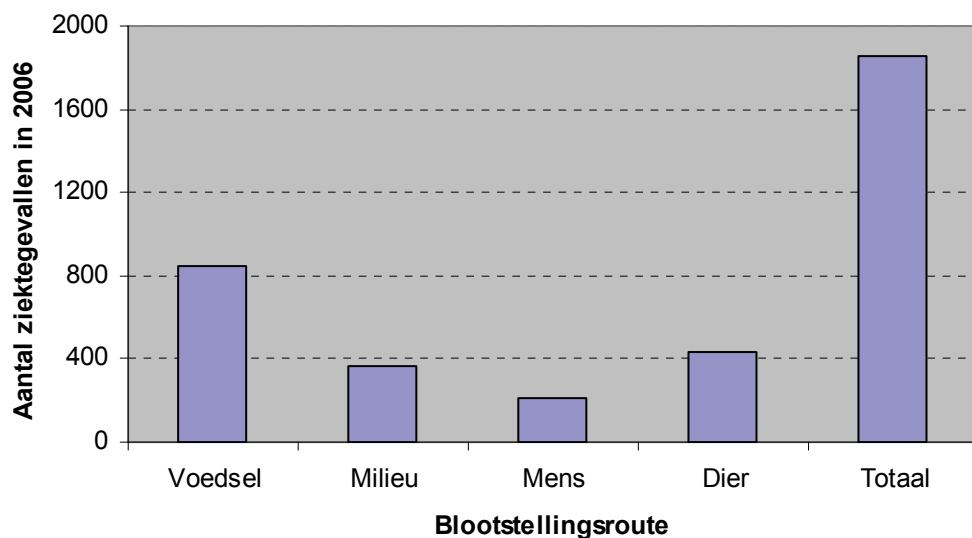
2.4.1 Incidentie van VTEC O157

Over de periode 1999 t/m 2007 werden er gemiddeld 48 VTEC O157 gevallen per jaar gemeld (Figuur 7). Wanneer de uitbraken niet worden meegenomen is er sprake van een baseline incidentie van 43 gevallen per jaar. Dit komt neer op 0.26 gevallen per 100 000 inwoners per jaar. Met de uitbraken meegerekend zijn dit 0.29 gevallen per 100 000 inwoners per jaar. Dit is beneden het Europees langjarig gemiddelde van 0.96 (Fisher, 2006). In 2007 was de incidentie in NL min of meer gelijk aan het Europees gemiddelde voor dat jaar (0.5 versus 0.6 cases per 100,000 inwoners) (Anonymous, 2009).



Figuur 7. Aantal VTEC O157 gevallen per jaar (1999-2007) (bron: Ingrid Friesema, RIVM)

Het gaat hier echter om het aantal officieel gerapporteerde VTEC O157 gevallen. Op basis van gegevens van 1990-2000 wordt geschat dat er in Nederland in totaal gemiddeld 2111 gevallen per jaar zijn (mediaan 1251, 5% percentiel 83, 95% percentiel 7157) (Havelaar et al., 2004). Voor 2006 werd het daadwerkelijk aantal VTEC O157 infecties geschat op 1851 (Figuur 8), ten opzichte van 40 gerapporteerde gevallen (Figuur 7).

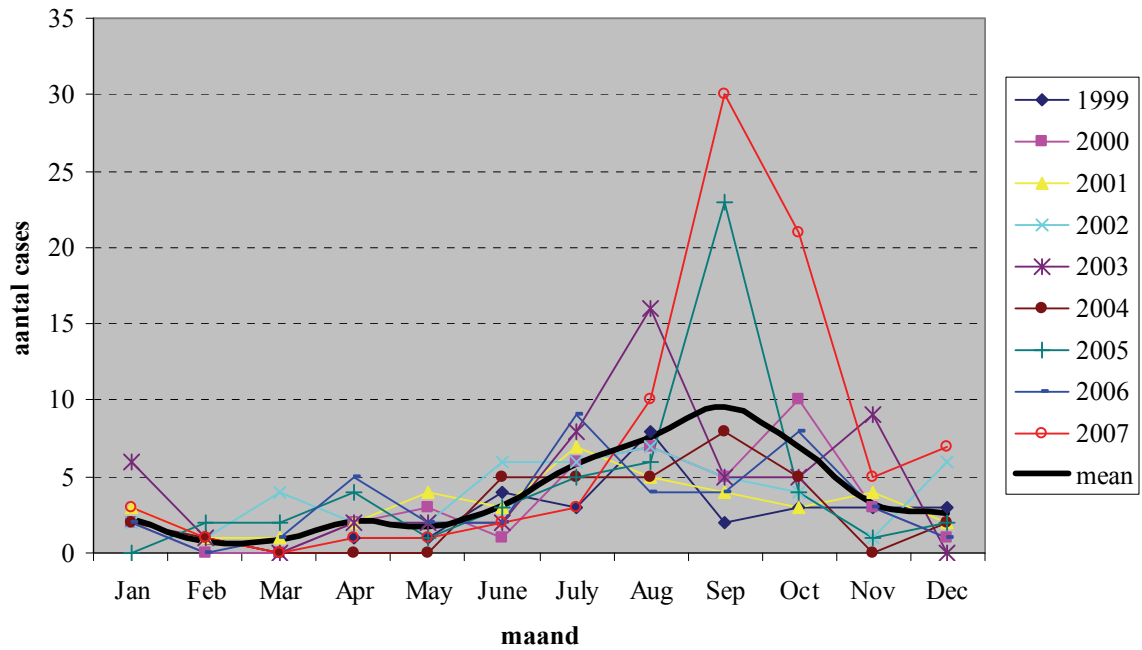


Figuur 8. Schatting van het aantal werkelijke VTEC O157 ziektegevallen per blootstellingsroute in 2006 (bron: nationaal Kompas Volksgezondheid; www.nationaalkompas.nl).

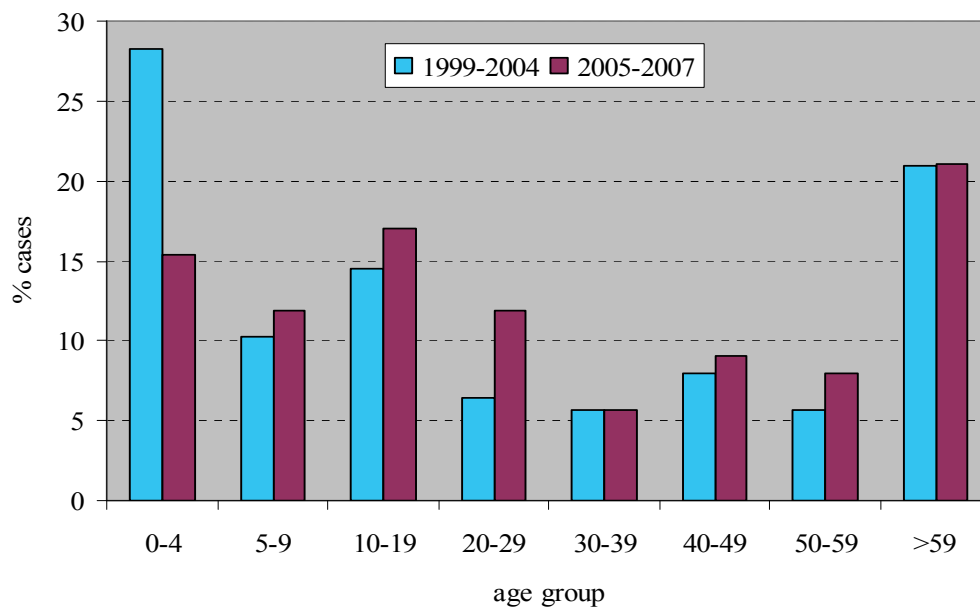
De laatste jaren wordt in Nederland duidelijk dat er naast de relatief lage klinische basis incidentie van VTEC O157 ook pieken in incidentie kunnen voorkomen. Deze pieken worden veroorzaakt door uitbraken of clusters van individuele gevallen. In 2003 was er voor eerst een piek te zien in het aantal ziektegevallen. In dit jaar werden er 57 mensen gediagnosticeerd met VTEC O157. Deze piek werd veroorzaakt door een aantal clusters van VTEC infecties waarbij in totaal 21 mensen betrokken waren (van Duynhoven, 2004). In 2003 werd voor het eerst bewijs geleverd voor besmet voedsel als bron van infectie: een besmette partij rundvleessnippers leidde tot 3 laboratoriumbevestigde ziektegevallen in november. Dit komt naar schatting overeen met enkele honderden tot duizenden ziektegevallen in de algemene bevolking. Bovendien was besmet vlees ook verdacht als bron van infectie bij nog 3 clusters met in totaal 9 patiënten. In 2005 is er een tweede piek, waarbij in totaal 53 patiënten met VTEC O157 worden gediagnosticeerd. Van de patiënten in 2005 werd 33% opgenomen in een ziekenhuis en ontwikkelde 8% HUS. De relatief hoge incidentie in 2005 is te verklaren door de eerste landelijke uitbraak van VTEC O157, waarbij 40% van gemelde 53 patiënten betrokken was (Doorduyn, 2006). Filet americain was de meest aannemelijke oorzaak, alhoewel - zij het in mindere mate - kant en klare rauwe groenten ook statistisch gerelateerd waren aan de infecties).

In 2007 vond een volgende VTEC O157 (H⁻, *stx1*, *stx2*, *eae*, *e-hly* positief) uitbraak plaats in Nederland waarbij 41 personen betrokken waren. De uitbraak stam was identiek aan de stam die een kleine uitbraak veroorzaakte in IJsland (9 gevallen). Beide uitbraken werden statistisch geassocieerd met voorverpakte, gesneden sla geproduceerd in Nederland (Friesema, 2008a). Het totaal aantal geregistreerde VTEC patiënten kwam door deze uitbraak op 0.51 gevallen per 100,000 inwoners. Opvallend is dat beide uitbraken (2005 en 2007) in September - Oktober plaatsvonden. Ook de baseline VTEC O157 incidentie vertoont een piek in September (Figuur 9). Deze piek in humane cases volgt op de piek in VTEC O157 prevalentie onder rundvee in Augustus - September (Berends et al., 2008). Over het algemeen vormen jonge kinderen (<4 jaar) en ouderen (>60) het merendeel van de VTEC O157 patiënten (Figuur 10). Echter, in de periode 2005-2007 is het aandeel van de jonge kinderen (<4 jaar) drastisch afgenomen. Dit heeft waarschijnlijk te maken met de uitbraken gerelateerd

aan fillet americain in 2005 en voorverpakte gesneden ijsbergsla in 2007. Deze producten worden beduidend minder geconsumeerd door kleine kinderen.



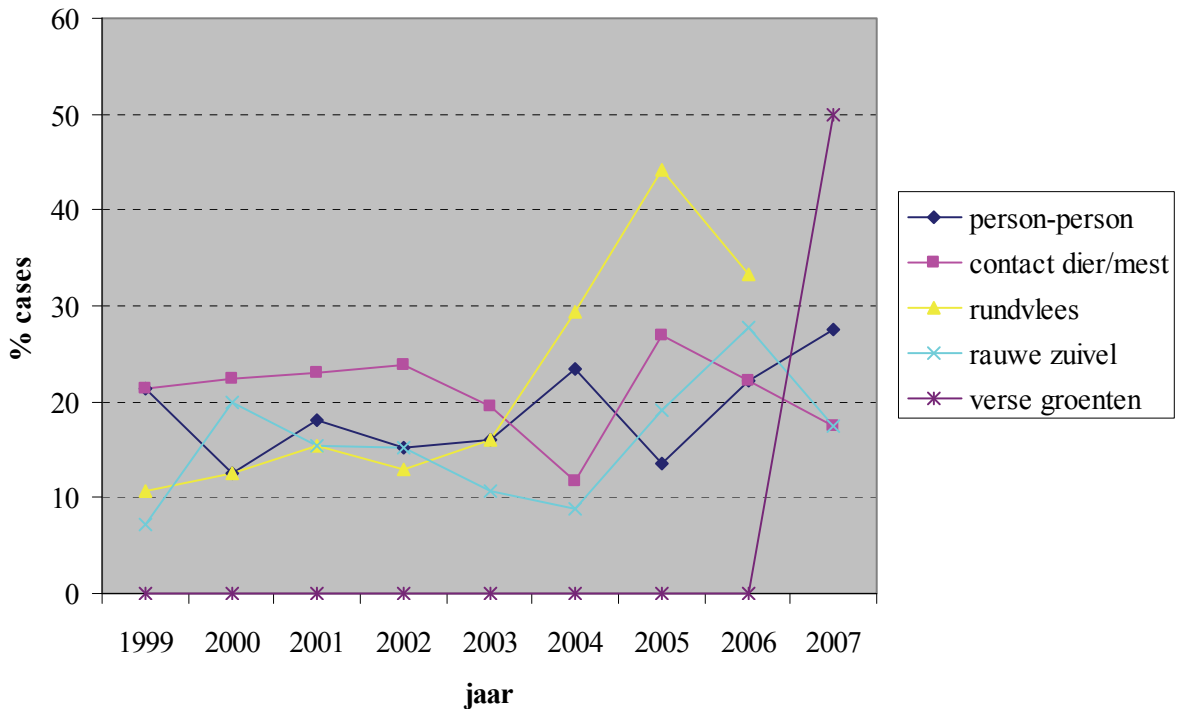
Figuur 9. Maandelijke incidentie van klinische VTEC O157 gevallen in de Nederlandse populatie (1999-2008). (bron: Ingrid Friesema, RIVM).



Figuur 10. VTEC O157 incidentie ingedeeld naar leeftijdsklasse (bron: Ingrid Friesema, RIVM)

2.4.2 Risicofactoren voor VTEC O157 infecties

Om een beeld te krijgen van de bron van VTEC O157 infecties wordt patiënten een vragenlijst afgenomen. In de periode 1999-2003 was het directe contact met landbouwhuisdieren en/of mest de belangrijkste risicofactor in Nederland (Figuur 11). Er is gesuggereerd dat in Schotland, waar de incidentie van VTEC onder mensen relatief hoog is, het milieu de belangrijkste besmettingsbron voor VTEC O157 is (Solecki et al., 2007). Met behulp van modellen heeft men laten zien dat in noordoost Schotland de kans op infectie als gevolg van een weiland bezoek 100 keer groter is dan bij het eten van een hamburger (Strachan et al., 2006). In de periode na 2003 neemt in Nederland het relatief belang van voedsel en person-to-person transmissie toe t.o.v. de periode daarvoor. Dit valt samen met de twee voedselgerelateerde uitbraken in 2005 en 2007. Wat betreft voedsel zijn rauw of niet goed doorbakken rundvlees en rauwe melk de belangrijkste risicofactoren. Of de aan ijsbergsla gerelateerde uitbraak in 2007 een incident was of dat rauwe groenten wel degelijk een consistente risicofactor zijn moet de toekomst uitwijzen. Feit is dat het aantal uitbraken met VTEC O157 gerelateerd aan verse groenten in de Verenigde Staten het afgelopen decennium een ware vlucht heeft genomen (Sivapalasingam et al., 2004), waarbij ook meer virulentere O157 stammen lijken te zijn betrokken (Manning, 2008). Het is dus zaak om dit in Nederland in de gaten te houden. Opvallend is dat 50% van de VTEC O157 patiënten in 2007 die niet bij de uitbraak betrokken waren consumptie van rauwkost aangaven (Friesema, 2008b). Wat betreft het direct contact met landbouwhuisdieren worden publieke boerderijen als specifiek risico genoemd. Op deze boerderijen wordt over het algemeen contact met de dieren aangemoedigd. Uit een recente studie blijkt dat de prevalentie van VTEC O157 onder kinderboerderijen, zorgboerderijen en kampeerboerderijen respectievelijk 10.2% (n=127), 15.4% (n=91) en 11.9% (n=84) is. Het percentage positieve fecale monsters was respectievelijk 4-60% (gemiddeld 26%), 4-70% (gemiddeld 23%) en 5-44% (gemiddeld 16%).

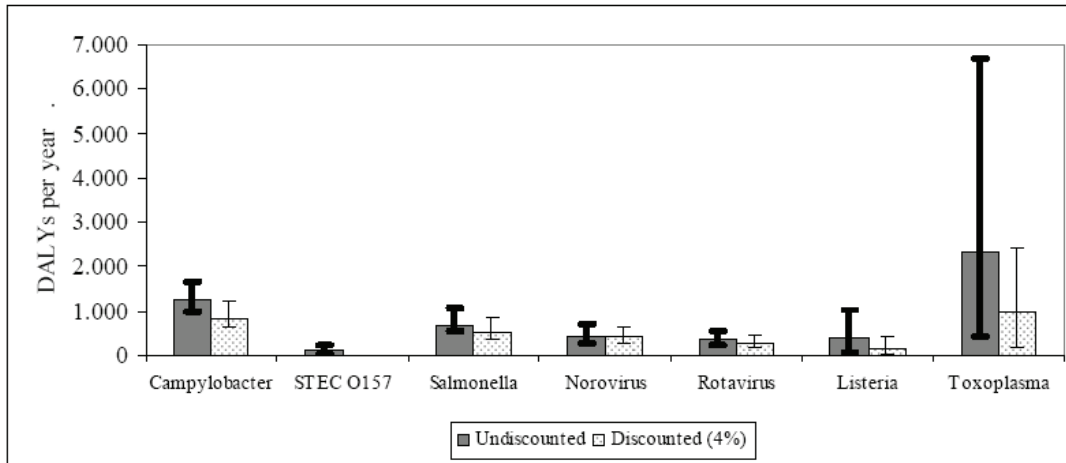


Figuur 11. Risicofactoren voor VTEC O157 infecties over de periode 1999-2007 (bron: Ingrid Friesema, RIVM)

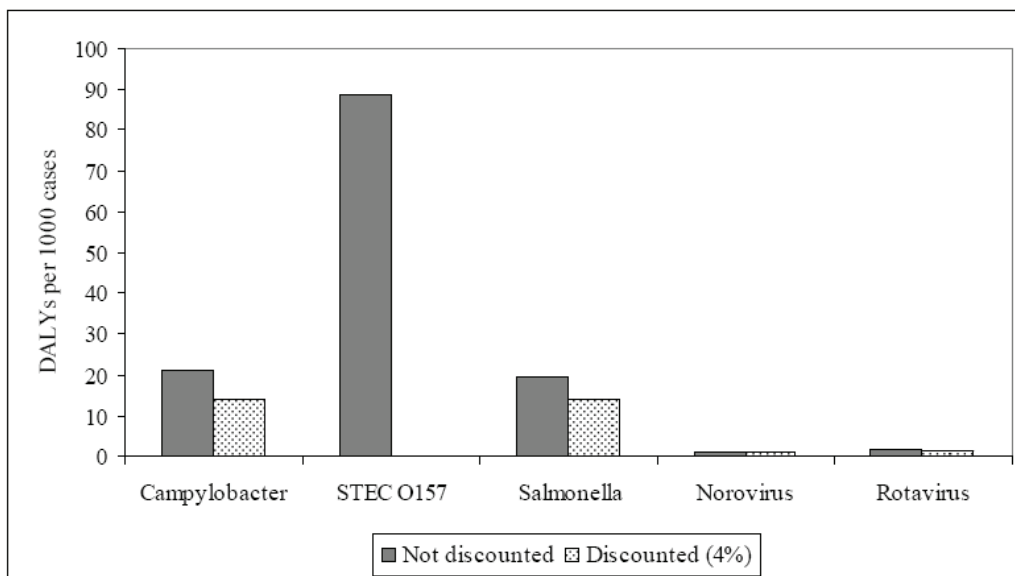
2.4.3 Ziektelast door VTEC O157

De hierboven genoemde incidentie van VTEC O157 infecties zijn slechts de gevallen die gemeld zijn door de GGD's. De werkelijke incidentie van VTEC O157 infecties is zeer onzeker en wordt geschat op 1250 gevallen per jaar (meest waarschijnlijk), met een minimum schatting van 85 en een maximum schatting van 7200 gevallen per jaar (Havelaar et al., 2004; Kemmeren, 2006). Er zijn ongeveer 21 (mediaan) HUS gevallen per jaar (minimum: 16, maximum: 29), voornamelijk onder kleine kinderen. De ziektelast van een infectieziekte kan worden uitgedrukt in een term die Disability Adjusted Life Year (DALY) wordt genoemd. In feite is dit een maat voor het aantal levensjaren die verloren gaan door sterfte en het leven met ziekte als gevolg van de infectie. Ondanks de relatief lage incidentie van VTEC O157 infecties wordt geschat dat ongeveer 110 DALYs/jaar verloren gaan als gevolg van VTEC O157 infecties (Kemmeren, 2006). HUS gevallen nemen hiervan 100 DALYs/jaar voor hun rekening.

In vergelijking tot *Campylobacter*, *Salmonella*, *Listeria*, Norovirus, Rotavirus, Toxoplasma, *Cryptosporidium* en *Giardia* heeft VTEC O157 de laagste ziektelast (DALY's/jaar) (Figuur. 12). Dit komt doordat deze verzameling pathogenen absoluut gezien veel vaker voorkomen. Ter vergelijking, de ziektelast van *Campylobacter* wordt geschat op 1300 DALY's/jaar (Kemmeren, 2006). Wanneer men echter de ziektelast uitdrukt per case, dan heeft VTEC O157 de hoogste ziektelast binnen deze groep pathogenen (Kemmeren, 2006)(Figuur. 13). De ziektelast van VTEC O157 per case per is 90 DALYs/1000 cases, wat meer dan 4 keer zo veel is als die van *Campylobacter* (22 DALYs/1000 cases).



Figuur. 12. Ziekte last van door voedsel overdraagbare pathogenen, uitgedrukt in Disability Adjusted Life Years per jaar (DALYs/jaar) (Kemmeren, 2006).

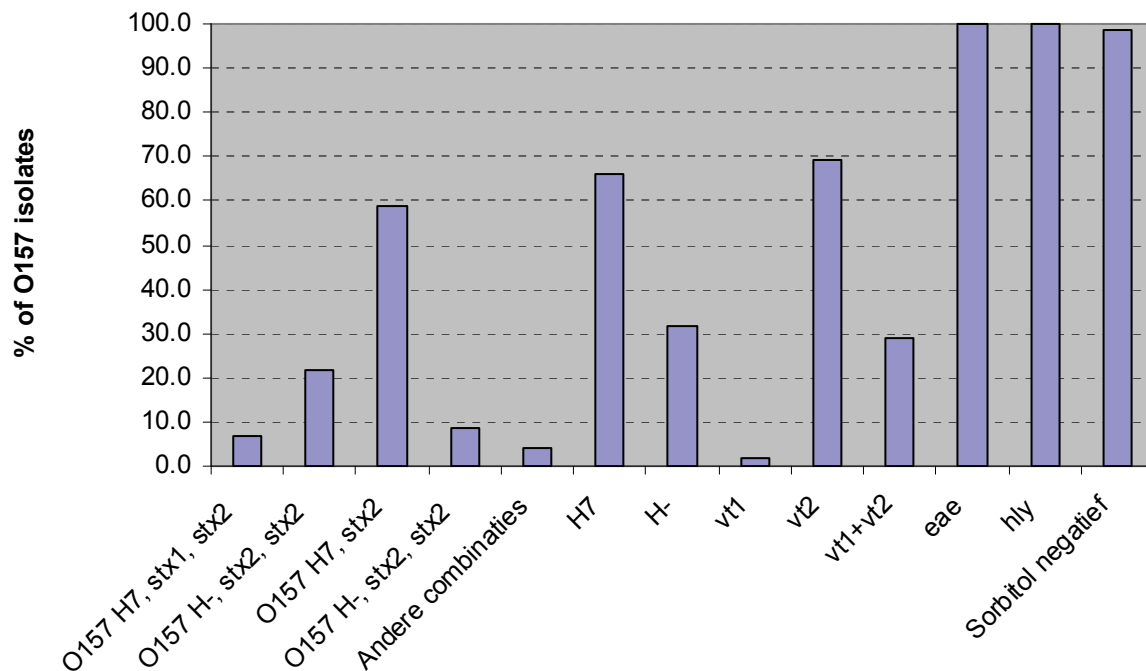


Figuur. 13. Ziekte last van door voedsel overdraagbare pathogenen, uitgedrukt in Disability Adjusted Life Years per 1000 gevallen (DALYs/1000 cases) (Kemmeren, 2006).

2.4.4 Klinische profielen van VTEC in Nederland

Diagnostische resultaten uit andere Europese landen laten zien dat non-O157 VTEC serotypen relatief steeds vaker geassocieerd worden met klinische verschijnselen en uitbraken (zie sectie 3.2 en referenties in (van Duynhoven et al., 2008)). Ook in Nederland lijkt het relatieve belang van non-O157 serotypen groter dan dat van serotype O157. Een case-control studie, uitgevoerd eind jaren negentig onder patiënten met gastroenteritis, liet onder de case-groep 3 non-O157 VTEC serotypen (O98, O145 en 1 maal on-typeerbaar) en 1 O157 zien (De Wit et al., 2001). Tot voor kort was trend informatie in Nederland alleen voor handen betreffende serotype O157. Dit heeft voornamelijk te maken met het feit dat slechts 6% van de medische streeklaboratoria (stand 2000) monsters ook test op andere VTEC serotypen (Van Duynhoven et al., 2002). Over de periode 1999-2005 had het merendeel van de klinische O157 isolaten (n=247) het gen voor Verocytotoxine 2 (vt2) en waren ze allemaal in het bezit

van het intieme gen (eae) en hemolysine gen (hly) (Friesema, 2006) (Figuur. 14). Vanuit de internationale literatuur weten we dat het niet zozeer het serotype is wat de ernst van de klinische symptomen bepaalt, maar de aanwezigheid van bepaalde virulentie-genen. Met name de aanwezigheid van Verocytotoxine 2 (vt2) en intieme (eae) zijn sterk gerelateerd aan klinische symptomen bij de mens (inclusief HUS) (Boerlin et al., 1999; Ethelberg et al., 2004).



Figuur. 14. Resultaten van H-serotypering en virulentieprofiel van 277 klinische VTEC O157-isolaten in de periode 1999-2005 (Friesema, 2006).

Om het relatieve belang van non-O157 VTEC serotypen in Nederland in kaart te brengen is recentelijk (2005-2006) een nationale studie uitgevoerd door het RIVM en medische streeklaboratoria (van Duynhoven et al., 2008). Hierbij werden ontlastingsmonsters (n=4069) die naar de streeklaboratoria werden toegestuurd onderzocht op de aanwezigheid van Verocytotoxine genen (de enige gemeenschappelijke deler van de gehele VTEC groep). Het ging hierbij om monsters afkomstig van mensen met bloed in de ontlasting, die gediagnosticeerd waren met HUS of jonger waren dan 6 jaar. Uit de positieve monsters (n=68, 1.7%) werden vervolgens VTEC serotypen geïsoleerd en getypeerd. Uit 25 stx-positieve monsters (38%) werden in totaal 18 verschillende VTEC serotypen geïsoleerd (Tabel 3). Het aandeel non-O157 serotypen was beduidend hoger dan het aandeel O157 (80% versus 20%).

In Duitsland (Karch et al., 1997), Spanje (Blanco et al., 2003), Frankrijk (Pradel et al., 2000), Zwitserland (Burnens et al., 1995) en België (Pierard et al., 1997) is ook de dominantie van non-O157 serotypen in klinische monsters aangetoond. Naast serotype O157 werd met name O8, O26, O91, O103 en O174 gedetecteerd. Serotype O26 wordt gezien als de belangrijkste non-O157 VTEC serotype en is sterk in opkomst (Bielaszewska et al., 2007). Vreemd genoeg zijn O8 en O174 slechts sporadisch gesignaleerd in andere landen terwijl de O145 en O111, die wereldwijd met O157 tot de

meest voorkomende serotypen worden gerekend, niet in zijn geïsoleerd met deze monitoring. Wellicht bestaan er sterke regionale verschillen in de samenstelling van de VTEC groep.

Tabel 3. Distributie van VTEC serotypen en aanwezigheid van VTEC virulentie genen (Vt1: Verocytotoxine 1, vt2: Verocytotoxine 2, eae: intimine, hly: hemolysine) onder 25 VTEC isolaten geïsoleerd uit Verocytotoxine positieve ontlastingsmonsters (van Duynhoven et al., 2008).

O-type	H-type	vt1	vt2	eae	Hly	N
O8	H9	neg	pos	neg	neg	2
O8	H19	neg	pos	neg	neg	1
O26	H11	pos	neg	pos	neg	2
O54	H21	neg	pos	neg	neg	1
O78	H-	pos	neg	neg	pos	1
O80	H-	neg	pos	pos	pos	1
O91	H21	pos	pos	neg	pos	1
O91	H14	pos	neg	neg	pos	1
O103	H2	pos	neg	pos	pos	3
O128	H2	pos	neg	neg	neg	1
O146	H21	pos	pos	neg	pos	1
O157	H7	neg	pos	pos	pos	4
O157	H-	pos	pos	pos	pos	1
O174	H2	pos	pos	neg	pos	1
O174	H8	pos	pos	neg	neg	1
O?	H25	pos	pos	pos	pos	1
O?	H16	neg	pos	Neg	neg	1
O?	H25	pos	neg	pos	pos	1

2.5 Risicobeheersing van VTEC in Nederland

Om een beeld te krijgen hoe de risicobeheersing van VTEC in Nederland is georganiseerd is een interview afgenomen bij drie deskundigen die betrokken zijn bij de detectie, signalering en tracering van VTEC infecties. Het gaat hierbij om Annet Heuvelink, microbioloog bij de VWA Oost in Zutphen, Wilfrid van Pelt, senior epidemioloog en projectleider gastro-enteritis bij het Centrum Infectieziektebestrijding van het RIVM te Bilthoven en Carolien de Jager, onderzoeksmedewerker / sociaal verpleegkundige bij het Centrum Infectieziektebestrijding van het RIVM te Bilthoven. Het interview is gehouden aan de hand van een aantal vooraf opgestelde vragen.

Hoe verloopt de diagnostiek van VTEC?

VTEC diagnostiek beperkt zich in Nederland veelal tot het aantonen van een VTEC infectie met VTEC O157. Hiertoe wordt feces afgestreken op een selectieve plaat. Een aantal laboratoria test fecesmateriaal mbv een specifieke PCR waarmee behalve VTEC O157 ook andere VTEC stammen kunnen worden aangetoond. Daarnaast maakt een enkel lab gebruik van de Verocel test (celkweek) en wordt ook wel getest op de aanwezigheid van antilichamen tegen bepaalde serotypen van VTEC in serummonsters van patiënten.

Ieder laboratorium maakt zelf een keuze welke diagnostische test gebruikt wordt. Hoeveel laboratoria op dit moment PCR gebruiken en welk PCR protocol zij gebruiken is onbekend en wordt eind 2008 geïnventariseerd door het RIVM.

Zowel een positieve kweek als een positieve PCR leidt in principe tot een positieve melding; VTEC is aangifteplichtig. Na een positieve PCR zal een perifeer laboratorium proberen om (maximaal) 5 kolonies te kweken en alsnog voor serotypering en bevestiging op te sturen naar het RIVM.

Hoe bereikt informatie over humane infecties met VTEC het RIVM?

VTEC behoort sinds enkele jaren tot de (wettelijk) aangifteplichtige ziekten.

Er zijn twee manieren waarop een melding van een VTEC infectie het RIVM kan bereiken. Als in een perifeer diagnostisch laboratorium (± 60 in Nederland) VTEC wordt aangetoond, wordt dit aan de GGD gemeld, die het vervolgens rapporteert via OSIRIS (een online registratie systeem voor infectieuze aandoeningen). Het perifere laboratorium kan ook rechtstreeks een stam voor serotypering en toxinebepaling opsturen naar het RIVM.

Worden alle infecties worden gemeld?

Er zal in de praktijk een selectie plaatsvinden: patiënten met milde verschijnselen zullen minder snel een dokter bezoeken en bij de dokter zal van mensen met milde symptomen minder snel een kweek worden ingezet dan van patiënten met ernstige verschijnselen. Hierdoor wordt slechts “het topje van de ijsberg”, meestal de ernstigste gevallen, gedetecteerd. De gevallen van VTEC die op het laboratorium worden aangetoond zullen hoogstwaarschijnlijk wel allemaal gemeld worden, hoewel dit soms maanden later gebeurt.

Wanneer is er sprake van een uitbraak, en wie signaleert dit?

Bij het RIVM worden wekelijks de meldingen bekeken en gerapporteerd. Omdat het aantal meldingen van VTEC niet erg hoog is (40-50 per jaar) zal een plotselinge toename opvallen, ook zonder moleculaire typering.

Vindt er altijd tracersing plaats bij elk geval van VTEC?

Bij elke positieve bevinding neemt de regionale GGD een standaard vragenlijst af. Dit kan door middel van huisbezoek, telefonisch of per post. De vragenlijsten worden verzameld en bekeken door het RIVM. Pas bij clusters in regio en tijd, en afhankelijk van de gegevens, wordt besloten of het ondernemen van tracersing zinvol is. In bijzondere gevallen wordt ook tracersing ingezet bij individuele gevallen, dit gebeurt met name als er een serieuze verdenking is en als er een humaan isolaat beschikbaar is.

Hoe wordt een tracersing uitgevoerd?

De infecties waarvoor een tracersing zal worden uitgevoerd worden door de regionale GGD gemeld aan de Centrale Meldkamer van de VWA. De melding wordt opgenomen in het Centrale Meldkamersysteem en vervolgens uitgezet in de betreffende regio. De monsternamen (voedingsmiddelen, dierlijke feces en/of omgevingsmonsters verzameld bij de patiënt thuis, in de retail, productiebedrijven of primaire sector) en het monsteronderzoek worden uitgevoerd door de regionale VWA, waarna eventuele isolaten naar de VWA in Zutphen (NRL E. coli) worden opgestuurd voor bevestiging en subtypering. Tenslotte worden de typeringsresultaten van de humane isolaten en de isolaten uit de verdachte bron met elkaar vergeleken om te bepalen of er een match is.

Wat wordt er gedaan met de informatie uit de tracerings?

Een epidemiologisch vermoeden van een bepaalde infectiebron is lastig microbiologisch te bevestigen, omdat bemonstering in de relevante periode vaak niet mogelijk is. Veelal gaat het bij voedingsmiddelen om puntbesmettingen en zijn de producten/grondstoffen niet meer op de markt/beschikbaar op het moment dat tracerings in gang wordt gezet. Bij diercontact als oorzaak van de infectie is brononderzoek wel herhaaldelijk succesvol geweest, omdat VTEC vaak een wat langere periode op een bedrijf/binnen een groep dieren circuleert.

De informatie uit de tracerings wordt gebruikt om vervolgonderzoek op te zetten, bijvoorbeeld extra inspecties in een bepaalde sector, of deze sector meenemen in een volgend monitoringsprogramma van de VWA.

Welke bronnen van VTEC worden gevonden?

Patiënten geven aan al dan niet te zijn blootgesteld aan bekende risicofactoren, zoals vleesproducten (rauw vlees, bijv. filet americain), rauwe groenten (gesneden rauwkost, gekiemde zaden zoals alfalfa en taugé), kinderboerderij, contact met een besmet persoon, recreatiewater, boerderij. In de meeste gevallen kan dit niet (meer) bevestigd worden door het aantonen van de VTEC omdat geen relevante monsters meer kunnen worden verzameld. Dit is met name het geval wanneer het een voedselinfectie betreft. Eén keer is het echter wel gelukt voor vlees; drie patiënten konden zowel epidemiologisch als microbiologisch in verband worden gebracht met één besmette partij rundvleessnippers. Verder leidde het spoor één keer naar rauwe melk; dezelfde stam als geïsoleerd uit enkele gezinsleden werd ook geïsoleerd uit feces van hun melkvee, maar de melk werd op dat moment negatief bevonden. In geval van diercontact zijn de tracerings i.h.a. meer succesvol; meerdere malen is het gelukt het epidemiologische verband tussen een patiënt en contact met (feces van) dieren microbiologisch te bevestigen.

Waarom zijn er in Nederland zo weinig uitbraken, en waarom is de incidentie van sporadische gevallen veel lager dan in andere landen?

Dit vinden de deelnemers een interessante vraag, gegeven het feit dat het besmettingspercentage van voedsel in ons land ongeveer hetzelfde is als in de ons omringende landen, ongeveer 0,5-1%. Ook is het niet zo dat de surveillance of de diagnostiek achterblijven bij de ons omringende landen, want het aantal HUS gevallen en ziekenhuisopnames als fractie van de incidentie is gelijk aan die van landen waar de incidentie veel hoger is.

Er is geen eenduidig antwoord op, wel wordt er een aantal suggesties gedaan:

-in ons land wordt minder vaak gezamenlijk gegeten, zoals op scholen, op kinderdagverblijven, en warme maaltijden in bedrijfskantines. Veel uitbraken in het buitenland worden toegeschreven aan dergelijke gezamenlijke maaltijden.

-misschien zijn Nederlandse consumenten beter voorgelicht met betrekking tot het bewaren en bereiden van voedsel.

-misschien hebben we meer asymptomatische infecties in Nederland, waardoor er een hogere immuniteitsgraad is dan in andere landen en er daardoor minder ernstige infecties optreden. Als dit waar zou zijn, zou er een verklaring gevonden moeten worden waarom er meer asymptomatische infecties optreden.

-er zijn landen die een cultuur hebben waarin meer rauw vlees gegeten wordt dan in Nederland.

Hoe is op dit moment de humane surveillance naar O157? Is dit voldoende?

Zie hierboven, ja dat is voldoende.

Hoe is op dit moment de humane surveillance naar non-O157 VTEC? Is dit voldoende?

Surveillance naar non-O157 wordt gedaan door de laboratoria die een PCR uitvoeren, dit zijn op dit moment nog niet alle laboratoria, en door een enkel lab dat gebruik maakt van de Verocel test. Voor het aantonen van VTEC non-O157 zijn geen selectieve platen beschikbaar en daarom is men aangewezen op moleculaire (aantonen vt genen) of immunologische (aantonen VT) technieken of weefselkweek (Verocel test). Conclusie is dat de surveillance naar non-O157 nog niet voldoende is.

Wordt er onderzoek gedaan naar het voorkomen van VTEC in de vleesketen/groenteketen?

Sinds begin jaren negentig worden monsters rauw vlees en vleesproducten standaard door de VWA onderzocht op VTEC O157. Sinds midden jaren 90 vindt er in het kader van het monitoren van zoönoseverwekkers bij landbouwhuisdieren onderzoek plaats van dierlijke feces op VTEC O157. Daarnaast wordt door de VWA projectmatig gekeken naar het voorkomen van VTEC O157 in andere schakels van de voedselproductieketen (productie- en verwerkingsbedrijven) en zijn in het verleden ook studies gedaan bij kinder-, zorg- en kampeerboerderijen, wilde fauna en oppervlaktewater. Ook groente wordt projectmatig bekeken. In 2006/2007 is er een groot groenteproject geweest van de VWA en het RIVM gericht op de retail en groentesnijderijen. In 2008 was er een project gericht op groentetelers en de omgeving van de bedrijven (o.a. grondmonsters). In het verleden is door de VWA projectmatig ook gekeken naar het voorkomen van VTEC non-O157 in de voedselketen. Vanaf 2009 zal VTEC non-O157 ook in het standaard analysepakket van rauw vlees/vleesproducten worden opgenomen en ook feces van melkvee en vleeskalveren hierop worden onderzocht.

Wordt er bij de surveillance rekening gehouden met import/exportstromen van producten uit de vleesketen/groenteketen?

In de vleesketen blijkt dit ondoenlijk vanwege de complexiteit van de stromen. Van bijvoorbeeld gehakt is vaak niet meer te achterhalen waar het vandaan komt. Groente lijkt minder complex omdat dit een vers product is en de lijnen korter zouden moeten zijn.

Is er behoefte aan actuele kennis van de bedrijfsprevalentie en binnenbedrijfsprevalentie in relatie tot bekende risicofactoren?

Ja, er is behoefte aan gegevens over de bedrijfsprevalentie en deze data worden jaarlijks verzameld door de VWA in het kader van het eerder genoemde monitoringsprogramma bij landbouwhuisdieren, waarbij tevens informatie wordt verzameld m.b.t. risicofactoren voor besmetting van bedrijven met VTEC O157. Deze prevalentiecijfers worden opgenomen in de jaarlijkse EU rapportage m.b.t. zoönosen (verplichte rapportage) en zijn publiekelijk toegankelijk. Het zou interessant zijn om de geografische spreiding van de positief bevonden bedrijven te koppelen aan de geografische spreiding van de patiënten over Nederland.

Er is niet direct behoefte aan nieuwe gegevens over de binnenbedrijfsprevalentie. Er zijn al enkele publicaties hierover verschenen. Hieruit blijkt dat het aantal positieve dieren per bedrijf varieert met het jaargetijde (meeste uitscheiders in zomer en najaar) en dat bij de jonge dieren het percentage uitscheiders hoger is.

2.6 VTEC onderzoek in Nederland

Het VTEC onderzoek in Nederland richt zich op surveillance, experimenteel onderzoek en risico analyse. VTEC onderzoek in Nederland is gestart vanuit medisch onderzoek naar het hemolytisch-uremisch syndroom (HUS) bij de Radboud Universiteit (Van de Kar et al., 1992). Sinds 1985 was bekend dat HUS kon worden veroorzaakt door VTEC (Karmali et al., 1985). In 1991 werd er een verband gelegd tussen Nederlandse HUS patiënten en de aanwezigheid van VTEC O157 (Chart et al., 1991). Het onderzoek werd halverwege de jaren negentig uitgebreid naar moleculaire typering van VTEC O157 stammen (Heuvelink et al., 1995), de detectie van VTEC O157 in vleesproducten (Heuvelink et al., 1996b; Heuvelink et al., 1996c) en de prevalentie van VTEC O157 in landbouwhuisdieren (Heuvelink et al., 1996a; Heuvelink et al., 1998b; Heuvelink et al., 1998c; Heuvelink et al., 1999b). De Wageningen Universiteit deed vervolgens onderzoek naar risicofactoren voor de prevalentie en dynamiek van VTEC O157 onder Nederlandse melkveebedrijven (Schouten et al., 2004; Schouten et al., 2005b) en vleeskalveren (Schouten et al., 2005a).

Sinds eind jaren negentig vindt er een geïntensiveerde surveillance plaats naar humane infecties (RIVM, GGD, VWA) (Van Duynhoven et al., 2002; van Duynhoven et al., 2008). De VWA voert doorlopend een monitorings-programma uit naar het vóórkomen van VTEC O157 in levensmiddelen en vanaf eind jaren negentig is er een doorlopend monitorings-programma naar de prevalentie van VTEC O157 onder landbouwhuisdieren. De resultaten van beide monitorings-programma's worden samenvattend gerapporteerd in het jaarlijkse zoönosen rapport (VWA/RIVM) (RIVM, 2007). Projectmatig wordt gekeken naar het vóórkomen in andere sectoren (kinderboerderijen) en voedselproducten (verse groenten) (VWA, RIVM).

Naast monitoring en surveillance wordt er in Nederland ook experimenteel onderzoek gedaan naar VTEC. ASG (WUR) heeft gekeken naar de dynamiek van VTEC binnen het rundveebedrijf (Dopfer et al., 2006). De Wageningen Universiteit (leerstoelgroep Biologische Landbouwsystemen) en Plant Research International hebben recentelijk een groot project afgerond betreffende de ecologie en risicoanalyse van VTEC O157 en Salmonella in de primaire productieketen van verse groenten (Franz, 2007; Klerks, 2007; Semenov, 2008a). Hierin is de interactie tussen VTEC O157 en Salmonella en slaplanten bekeken (Franz et al., 2007b), zijn risicofactoren geïdentificeerd voor aanwezigheid en overleving van VTEC O157 (Franz et al., 2005; Franz et al., 2007a; Semenov, 2007; Franz, 2008b; Franz, 2008a; Semenov, 2008b; Semenov et al., 2008) en zijn modellen ontwikkeld om risico's in te schatten (Franz et al., 2008; Semenov, 2008a). Bij de WUR leerstoelgroep Bedrijfseconomie is onderzoek gedaan naar de kosteneffectiviteit van beheersmaatregelen betreffende VTEC O157 in the rundvleesketen (Vosough Ahmadi et al., 2006; Vosough Ahmadi et al., 2007). Aan de Universiteit Utrecht is o.a. onderzoek gedaan naar de detectiemethoden voor VTEC O157 (Reinders et al., 2000; Reinders et al., 2002) en plantaardige antimicrobiële stoffen tegen VTEC O157 (Burt et al., 2003). Vergelijkend onderzoek naar verschillende VTEC O157 isolatiemethoden is uitgevoerd bij de VWA en de WUR leerstoelgroep Levensmiddelenmicrobiologie (Aminul Islam et al., 2006; Islam et al., 2006).

2.7 VTEC in de rundvleesproductieketen

Rundvee wordt in het algemeen beschouwd als het belangrijkste reservoir voor VTEC (Wells et al., 1991; Chapman, 1993; Heuvelink et al., 1998c). Daarmee is rundvlees logischerwijs ook de belangrijkste voedsel gerelateerde oorzaak voor humane VTEC infecties (Tabel 4). Rundvlees wordt in het algemeen besmet met VTEC gedurende de slachtfase wanneer de darminhoud in contact komt met het vlees bestemd voor humane consumptie. Ruim 1% (6/571) van de rundergehakt monsters werd positief bevonden voor VTEC O157 (Heuvelink et al., 1999a) en volgens een microbiologisch risicomodel zou 0.3% van de fillet-american porties in Nederland besmet zijn met VTEC O157 (Nauta, 2001). Een risk assessment studie uitgevoerd door het RIVM schatte de prevalentie van met VTEC O157 besmette tartaar op 0.3%, en de incidentie van infectie op 8 cases per 100,000 inwoners per jaar (Nauta, 2001). In September 2005 vond de eerste nationale VTEC O157 uitbraak plaats in Nederland met fillet-american als bron van infecties (Doorduyn, 2006).

Tabel 4. Voorbeelden van VTEC uitbraken geassocieerd met rundvlees.

Jaar	Land	Product	Strain	Aantal cases	Bron
2007	Denemarken	Runderworst	O26:H11	20	(Ethelberg et al., 1983)
1983	USA	Rundvlees	O157:H7	>47	(Riley et al., 1983)
1986	USA	Rundergehakt	O157:H7	37	(Ostroff et al., 1990)
1991	USA	Vleespastei	O157:H7	32	(Belongia et al., 1994)
1993	USA	Hamburgers	O157:H7	>500	(Bell et al., 1994)
1994	UK	Hamburgers	O157:H7	8	(Willshaw et al., 1996)
1996	Schotland	Rundvlees	O157:H7	>279	(Cowden et al., 2002)
2000	Duitsland	Rundvlees	O26:H11	11	(Werber et al., 2002)
2006	Noorwegen	Rundergehakt	O157 /	7	(Schimmer et al., 2006)
2006	NL	Fillet-American	O157:H7	21 (32)	(Doorduyn, 2006)

2.7.1 Risicofactoren voor VTEC besmetting in de rundvleesproductieketen

Er zijn relatief veel studies gedaan betreffende risicofactoren voor het optreden van VTEC O157 op rundveehouderijen, het merendeel in de VS. Slechts weinig studies zijn gedaan waarbij het effect van de risicofactor onder gecontroleerde omstandigheden werd bestudeerd. Meestal betreft het statistische associaties tussen het voorkomen van een factor en de aanwezigheid van VTEC (logistische regressie). Een aantal factoren die positief zijn geassocieerd met de aanwezigheid van VTEC O157 zijn: zomerseizoen (Barkocy-Gallagher et al., 2003), verminderde bedrijfshygiëne (Vosough Ahmadi et al., 2007), besmet veevoer (Hutchison et al., 2006), een graanrijk dieet (Diez-Gonzalez et al., 1998), waterkanalen in de stal (LeJeune et al., 2001), intensief contact tussen de dieren, insecten in de stal (Ahmad et al., 2007), de aanwezigheid van andere landbouwdieren of huisdieren (Beutin et al., 1993; Schouten et al., 2004), en stress gedurende transport (Bach et al., 2004). Op basis van een literatuur review is een actieplan voorgesteld om VTEC in vee te minimaliseren (Ellis-Iversen et al., 2008). Dat actieplan omhelst o.a.: 1) droge en schone bedding, 2) jongvee in dezelfde groepen houden gedurende de opfok zonder introductie van nieuwe dieren in die groepen, 3) het weghouden van knaagdieren en 4) een tijdsinterval tussen het op het land brengen van mest en het laten grazen van het vee.

2.7.2 Interventiestrategieën

Een volledige eliminatie van VTEC in de veestapel is onrealistisch en niet haalbaar: VTEC is wijdverspreid, kan lang overleven in het milieu, heeft het vermogen vee opnieuw te infecteren en heeft een brede host range (waaronder ook wilde dieren). Een meer realistisch doel is om de mate van prevalentie of intensiteit van fecale uitscheiding te beperken. De interventiestrategieën vóór de slacht kunnen gegroepeerd worden in 3 groepen: strategieën die de blootstelling verlagen (exposure reduction), strategieën gericht op pathogeen uitsluiting (exclusion) and directe antipathogeen strategieën (direct antipathogen) (LeJeune, 2006; Franz, 2008b) (Tabel 5).

Tabel 5. Overzicht van interventiestrategieën op het niveau van het rundveebedrijf.

Interventie strategie	Methode	Bron
Exposure reduction	Voerhygiëne	(Hutchison et al., 2006)
	Waterhygiëne	(Faith et al., 1996)
	Huisvestinghygiëne	(Davis et al., 2005)
	Minimaal contact wilde	(Daniels et al., 2003)
	Vermijden hoge	(Vidovic et al., 2006)
Exclusion strategies	Voedingsregime	(Diez-Gonzalez et al., 1998; Herriott et al., 1998; Rugbjerg et al., 2003; Franz et al., 2005)
	Probiotica	(Zhao et al., 2003; Younts-Dahl et al., 2005)
Direct antipathogen	Antimicrobiële middelen	(Callaway et al., 2002; Mora et al., 2005)
	Bacteriofaag therapie	(Sheng et al., 2006)
	Vaccinatie	(Potter et al., 2004; Van Donkersgoed et al.

Het moet worden benadrukt dat de strategieën genoemd in Tabel 5 slechts mogelijke strategieën zijn, gebaseerd op statistisch geïntensiverde risicofactoren. De daadwerkelijk effectiviteit ervan is nog zelden onderzocht en wanneer dit is gebeurd zijn er vaak contrasterende resultaten (bijvoorbeeld wat betreft het effect van het voedingsregime). Bovendien moeten, voor enig effect, de grote meerderheid van de rundveehouderijen deze strategieën toepassen. Dit zal naar verwachting in de praktijk een groot struikelblok zijn. De factoren die het meest effectief lijken, vaccinatie of bacteriofaagtherapie, zullen bovendien pathogeen-specifiek moeten zijn en er is een risico van resistentieontwikkeling. Interventies op slachthuis en processing niveau liggen dus wat betreft rundvlees als bron voor VTEC meer voor de hand (Koohmaraie et al., 2007). In Tabel 6 wordt een overzicht gegeven van de in gebruik zijnde interventies die in het buitenland (VS) worden toegepast. In Nederland, en in de EU als geheel, zijn deze decontaminatie procedures niet toegestaan (alleen thermische procedures zijn toegestaan, maar worden zo goed als niet toegepast).

Tabel 6. Overzicht van interventiestrategieën op slachthuisniveau.

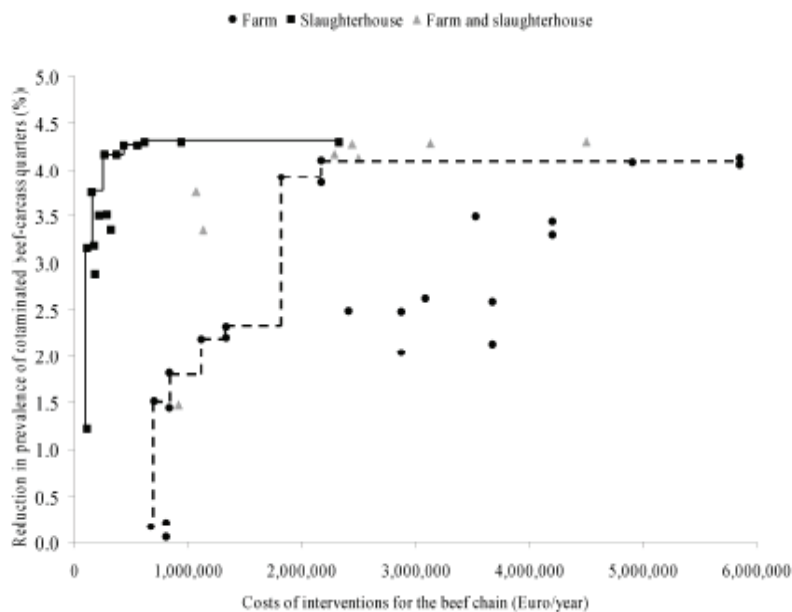
Interventie strategie	Bron
Huid-decontaminatie (voorkomt latere besmetting)	
Chemische ontharing	(Nou et al., 2003; Bosilevac et al., 2005b)
Wasprocedures	(Bosilevac et al., 2005b; Bosilevac et al.,
Karkas-decontaminatie	
Stoom + vacuüm	(Dorsa et al., 1996)
Organische zuren +	(Dorsa, 1997)
Combinaties van interventies (sequential multiple	(Bacon et al., 2000)

Daarnaast kan het verkregen vlees op verschillende wijzen ontsmet worden, zoals door middel van chemische decontaminatie (organische zuren), fysische decontaminatie (gamma bestraling of hoge druk), stoom of heet water sprays/dips en antimicrobiële stoffen (Dincer et al., 2004). Belangrijk is ook dat rundvlees gedurende transport, opslag, verkoop en bij de consument thuis goed gekoeld is en vervolgens goed verhit wordt voor consumptie. Idealiter omvat het pakket interventie maatregelen combinaties van pre- en postharvest interventies. Zo een "best-practice" pakket zou bestaan uit het op een juiste manier aanleveren van het vee (zonder lang transport, schoon drinkwater, vermijden van hoge veedichtheid), gevolgd door slachthuisprocedures (huid en karkas decontaminatie), gekoelde opslag en consumenten bewustzijn betreffende het bereiden van het vlees voor consumptie.

2.7.3 Kosteneffectiviteit van interventiestrategieën

Risico verlagende interventies kunnen worden toegepast gedurende de primaire productiefase (op het rundveebedrijf) en/of in de processingfase (slachthuis, retail, consument). Het trimmen van de karkassen en pasteuriseren met hete stoom bleken de meest effectieve decontaminatie maatregelen te zijn die kunnen worden toegepast in de Nederlandse slachthuizen (Vosough Ahmadi, 2007) Op boerderij niveau zijn dit aanpassingen in de bedrijfsvoering, vaccinatie en de toediening van colicine (een probiotic geproduceerd door generieke *E. coli*).

Kwantitatieve modelstudies van de Wageningen Universiteit hebben aangetoond dat interventies op slachthuisniveau het meest kosteneffectief zijn (Figuur. 15) (Vosough Ahmadi, 2007). Voor elke 1% (de baseline prevalentie voor 1/4-karkassen werd geschat op 4.3%) reductie in met VTEC O157 besmette runvlees partijen zijn de kosten voor het slachthuis tussen de 35,000 en 541,000 euro. Wanneer hetzelfde doel bereikt moet worden met beheersmaatregelen op boerderijniveau worden de jaarlijkse netto kosten geschat tussen de 642.000 en meer dan 1 miljoen euro (Vosough Ahmadi, 2007). De belangrijkste reden voor de hogere kosten op boerderij niveau is dat de beheersmaatregelen moeten worden geïmplementeerd op alle ongeveer 7000 rundveebedrijven. De jaarlijkse interventiekosten voor individuele rundveehouderijen zijn wel veel lager dan voor een slachthuis (500-2000 euro per boerderij tegenover 112000-937000 euro per slachthuis, maar omgerekend per koe zullen interventies in het slachthuis goedkoper zijn (Vosough Ahmadi, 2007). Bovendien is de kosteneffectiviteit op boerderij niveau waarschijnlijk overschat vanwege het feit dat, door het ontbreken van direct voordeel, de beheersmaatregelen slechts door een zeer beperkt aantal rundveehouderijen zal worden geïmplementeerd (Vosough Ahmadi, 2007).



Figuur. 15. Minimum kosten van interventies op slachthuisniveau (doorgetrokken lijn) en van interventies op boerderij niveau (onderbroken lijn) (Vosough Ahmadi, 2007)

2.8 VTEC in de productieketen van groenten

2.8.1 Verse groenten als bron voor VTEC infecties: internationaal

Gedurende de laatste decennia is er internationaal een toename in het aantal uitbraken van VTEC infecties gerelateerd aan de consumptie van verse groenten (Tauxe et al., 1997; Sivapalasingam et al., 2004). In de Verenigde Staten had verse groenten over de periode 1990 tot 2004 het grootste aandeel in het totaal aantal voedselvergiftigingen en het hoogste aantal ziektegevallen per uitbraak, daarmee vlees en zeefruit achter zich latend (Anonymous, 2006b). Het is gebleken dat sla het meest frequent betrokken groenteproduct is en dat de meeste uitbraken gerelateerd aan sla werden veroorzaakt door *E. coli* O157:H7 en *Salmonella enterica* (Sivapalasingam et al., 2004). Een aantal recente grote VTEC O157 uitbraken in de VS geassocieerd met sla en spinazie hebben de productgroep rauw te consumeren bladgroenten hoog op de voedselveiligheid agenda gezet. In het najaar van 2006 waren in totaal 205 mensen betrokken bij een VTEC O157 uitbraak als gevolg van de consumptie van besmette spinazie uit Californië (Anonymous, 2007). Een ongebruikelijk hoog percentage (52%) van de besmette mensen moesten worden opgenomen in het ziekenhuis en 3 mensen (1.5%) kwamen te overlijden. Een recentelijk gepubliceerd wetenschappelijk artikel suggereert op basis van haar onderzoek dat de spinazie uitbraak stam behoort tot een meer virulente (nieuwe) VTEC O157 subpopulatie (Manning, 2008). Vlak na de spinazie uitbraak vond er in de VS opnieuw een VTEC O157 uitbraak (n=80) plaats waarbij ijsbergsla geconsumeerd in een specifieke fast-food keten de bron van de besmettingen was (Anonymous, 2008).

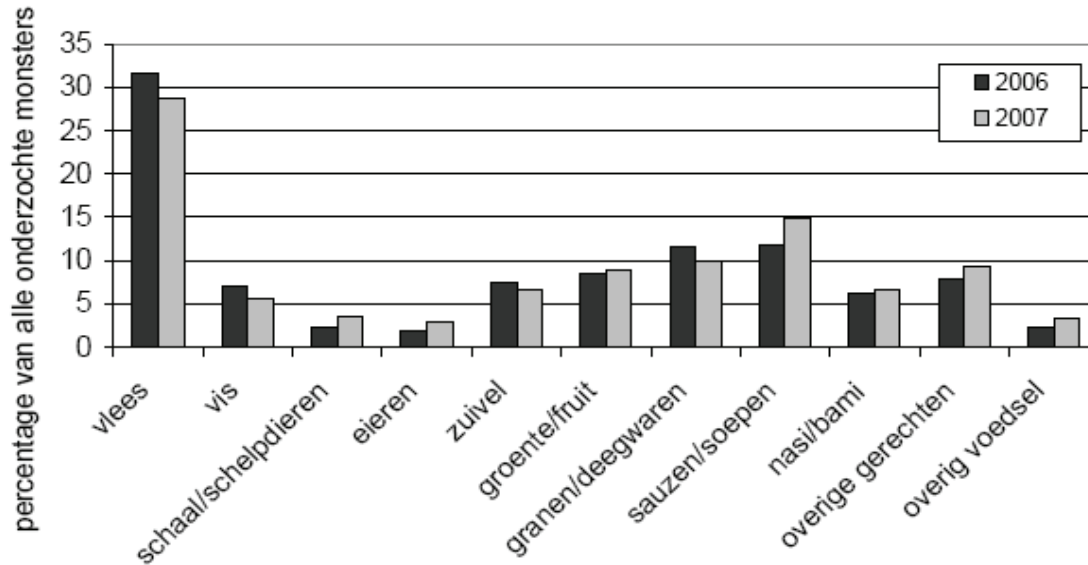
In Europa hebben zich recentelijk ook een aantal groente gerelateerde VTEC uitbraken voorgedaan. In 1999 werd er een uitbraak van VTEC O157 gemeld onder de werknemers van een kindziekenhuis in Zweden waarbij 37 cases betrokken waren (Welinder-Olsson et al., 2004). Besmette sla was

hoogstwaarschijnlijk de bron van de uitbraak. In 2005 waren wederom in Zweden 135 mensen betrokken bij een VTEC O157 (vt2 positief) uitbraak geassocieerd met de consumptie van lokaal geproduceerde sla (Soderstrom et al., 2005). Oppervlaktewater dat gebruikt werd voor irrigatie was waarschijnlijk de bron van de besmetting.

Als een reactie op de recente uitbraken zijn de afgelopen paar jaar in verschillende landen surveillances uitgevoerd naar het vóórkomen van humaan pathogenen in verse groenten (Johannessen et al., 2002; Sagoo et al., 2003; Mukherjee et al., 2006). In tegenstelling tot *Salmonella* en *Listeria* wordt VTEC O157 zelden aangetroffen. Er moet worden benadrukt dat de surveys zich richten op de detectie van slechts één enkel VTEC serotype, namelijk *E. coli* O157. De prevalentie van VTEC zal ongetwijfeld een stuk hoger zijn. Er lijkt dus een contrast aanwezig tussen het vóórkomen van VTEC uitbraken geassocieerd met groenten en het vóórkomen van VTEC in monsters van groenten op de boerderij en in de retail. Het feit dat er zo goed als geen positieve groente monsters worden gevonden komt doordat de prevalentie van besmet gewas in het veld erg laag is en er dus extreem veel monsters genomen moeten worden om positieven te vinden.

2.8.2 *Verse groenten als bron voor VTEC infecties: Nederland*

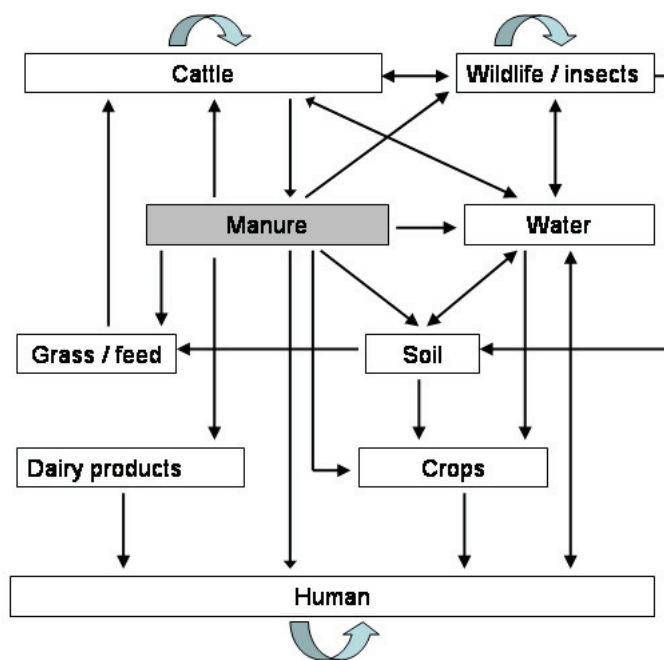
Uit de registratie van voedselinfecties en -vergiftigingen bij de Inspectie van de gezondheidszorg en de Voedsel en Waren Autoriteit blijkt dat groente en fruit in 2007 8.5% van de totaal onderzochte hoeveelheid monsters uitmaakte (Doorduyn, 2008)(Figuur. 16). Dit is een lichte stijging ten opzichte van 2005 (3%) en 2006 (8%). In 2007 vond in Nederland een uitbraak plaats met VTEC O157 (*stx1*, *stx2*, *eae*, *e-hly* positief) waarbij 41 mensen waren betrokken (Friesema, 2008a). Het PFGE patroon van de betrokken VTEC O157 was identiek aan het patroon van de VTEC O157 stam die vlak hierna in IJsland een kleine uitbraak (n= 9) veroorzaakte. Beide uitbraken werden statistisch geassocieerd met voorverpakte, gesneden sla geproduceerd in Nederland. Informatie betreffende het vóórkomen van VTEC in verse groenten in Nederland is zeer schaars. Een recent ontwikkeld risicomodel schat gemiddeld 0.89 (5%-95% percentiel: 0.06-2.42) met VTEC O157 besmette slakroppen per hectare voor typisch gangbare teelt (Franz et al., 2008). Dit komt overeen met een prevalentie van ongeveer 1 op de 40,000 kroppen en ruim 500 besmette kroppen geproduceerd op Nederlandse bodem. Van Oktober 2006 tot Oktober 2007 hebben de VWA en het RIVM een grootschalige survey uitgevoerd naar de prevalentie van humaan pathogenen in verse groenten. De resultaten hiervan verschijnen binnenkort.



Figuur. 16. Onderzochte voedselproducten bij incidenten van voedselinfecties of -vergiftiging gemeld bij VWA in 2006 en 2007 (Doorduyn, 2008).

2.8.3 Besmetting van groenten met VTEC

Besmetting van groenten met pathogenen kan plaatsvinden op verschillende punten in de productieketen. Echter, besmetting wordt het meest waarschijnlijk geacht via het gebruik van besmette mest of irrigatiewater gedurende de primaire productie fase. Alhoewel landbouwhuisdieren het primaire reservoir vormen voor VTEC, moet men zich realiseren dat deze pathogenen niet tot deze habitat beperkt zijn en circuleren door het agrarisch ecosysteem waarbij mest een centrale rol speelt (Figuur. 17). Dierlijke mest wordt wereldwijd intensief gebruikt als meststof voor de productie van voedselgewassen, met name in gebieden waar ook intensieve veehouderij voorkomt. Verschillende studies hebben laten zien dat VTEC groentegewassen kunnen koloniseren vanuit met besmette mest verrijkte grond of door middel van besmet irrigatiewater en hierop aanwezig kunnen blijven tot aan de oogst (Natvig et al., 2002; Islam et al., 2004). Een aantal experimentele laboratorium studies hebben laten zien dat VTEC ook in behoorlijke concentraties inwendig aanwezig kan zijn in de eetbare delen van rauwe groentegewassen zoals sla (Solomon et al., 2002; Wachtel et al., 2002; Franz et al., 2007b). De exacte locatie (inter- of intracellulair, vaatsysteem) van deze endofytische aanwezigheid, evenals de wijze waarop de pathogenen daar komen (systemische verspreiding via de wortels en vaatstelsel of via huidmondjes) is echter onduidelijk. Echter, het feit dat VTEC aanwezig is op/in de eetbare delen van verse groenten die onderworpen zijn aan een grondige oppervlakte sterilisatie betekent dat deze cellen hoogstwaarschijnlijk ook niet worden verwijderd door het wassen van de groenten gedurende processing en door de consument thuis. Dit kan serieuze gevolgen hebben voor de voedselveiligheid aangezien deze producten rauw gegeten worden.



Figuur. 17. Schematische voorstelling van het circuleren van VTEC door het agrarisch ecosysteem (Franz, 2008b)

Als reactie op de toenemende zorgen betreffende de voedselveiligheid van verse groenten heeft veel onderzoek zich toegespitst op de effectiviteit van verschillende fysische en chemische methoden om pathogenen van deze producten te verwijderen (Parish, 2003). Omdat de verschillende ontsmettingsprocedures na de oogst niet altijd voldoende efficiënt zijn in het verwijderen van pathogenen of niet zijn toegestaan (zoals in Nederland), is de preventie van besmetting gedurende de primaire productie fase een essentieel onderdeel van een systeem benadering gericht op het leveren van microbiologisch veilige producten aan de consument.

2.8.4 Risicofactoren voor besmetting in de primaire productiefase

Een aantal van de survey studies die de afgelopen jaren in het buitenland zijn uitgevoerd hebben geprobeerd om risicofactoren te identificeren voor de besmetting van verse groenten met VTEC. Gezien de zeer lage prevalentie van VTEC in groenten is met name gekeken naar de besmetting met generieke *E. coli*. Deze niet-pathogene *E. coli* wordt vaak als indicator organisme gebruikt voor de maat van fecale besmetting van water en voedselproducten. Ook wordt vaak om dezelfde reden gekeken naar de totale groep Enterobacteriaceae of een subgroep hiervan, de coliformen (de geslachten *Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella*).

2.8.4.1 Besmetting van groenten in biologische versus gangbare productie

Het vergelijken van biologische en gangbare productiewijzen is nuttig in het kader van het identificeren van risicofactoren aangezien beide productiewijzen op bepaalde punten significant verschillen (o.a. pesticiden gebruik, mest gebruik, bodemmanagement). Het wordt regelmatig gesuggereerd dat biologisch geteelde groenten een groter risico op besmetting met pathogenen hebben dan gangbaar geproduceerde producten vanwege de afhankelijkheid van organische mest. De

organische mest is overwegend van dierlijke oorsprong en kan dus mogelijk besmet kan zijn, terwijl de besmetting van kunstmest met pathogenen zo goed als kan worden uitgesloten. Op basis van de wetenschappelijke literatuur kan echter geconcludeerd worden dat er geen verschil in besmettingsrisico is tussen biologische en gangbare groenten. Uit een aantal studies in de VS blijkt dat de zowel de prevalentie als de besmettingsgraad met generieke *E. coli* en/of coliformen van verse groenten niet verschilt tussen beide productiewijzen (Phillips et al., 2005; Mukherjee et al., 2006). Uit een eerdere studie bleek dat er wel een verschil was tussen de niet-gecertificeerde biologische bedrijven enerzijds en de gecertificeerde biologische en gangbare bedrijven anderzijds (Mukherjee et al., 2004). VTEC O157 werd in geen van de genoemde studies aangetroffen. Het blijkt dat de prevalentie en de besmettingsgraad met generieke *E. coli* en/of coliformen sterk wordt bepaald door het type groente. Bladgroente zoals sla en kool lijken het meest gevoelig voor besmetting (Figuur. 13). De gemiddelde coliform besmettingsgraad voor deze producten ligt tussen de 2.4 en 3.6 log CFU/gram (Phillips et al., 2005; Mukherjee et al., 2006).

2.8.4.2 Problematiek indicator organismen

De resultaten van bovenstaande studies geven aanleiding tot serieuze twijfel omtrent het gebruik van coliforms en generieke *E. coli* als indicator voor de aanwezigheid van pathogenen. Hier zijn een aantal redenen voor. Ten eerste suggereren de relatief hoge prevalenties en concentraties van de indicator organismen (*E. coli* en coliformen) dat deze bacteriën tot de normale microflora van de plant behoren. Recentelijk is bekend geworden dat generieke, niet-pathogene, *E. coli* een zich als populatie kan handhaven in de bodem (Ishii et al., 2006) en dus deel kan gaan uitmaken van de natuurlijke microflora van het gewas zonder dat er dierlijke mest bij is betrokken. Coliforms en generieke *E. coli* overleven ook langer in het milieu dan pathogenen zoals VTEC. Ten tweede is er ondanks de hoge prevalenties en concentraties van de indicator organismen geen VTEC aangetroffen. Recentelijk is aangetoond dat de distributie van stx-genen in water zeer variabel is en niet correleert met het voorkomen van generieke *E. coli* (Smith, 2009). Bovendien zijn er aanwijzingen dat de relatie tussen het aantal coliformen en pathogenen negatief kan zijn. Om de plant te kunnen koloniseren moeten pathogenen in staat zijn de competitie met de aanwezige microflora aan te gaan. De aanwezigheid van de coliform *Enterobacter asburiae* verlaagde de overleving van *E. coli* O157:H7 op sla met een factor 25 (Cooley et al., 2006) en de overleving van *E. coli* O157:H7 in rundermest was negatief gecorreleerd met de het aantal coliformen (Franz et al., 2007a). De aanwezigheid van andere coliformen kan dus ook bufferend werken tegen de aanwezigheid van pathogenen. Recentelijk zijn er voorstellen gedaan voor alternatieve indicatoren voor fecale besmetting (en dus pathogeen aanwezigheid), zoals strikt anaerobe fecale bacteriën (*Bacteroides* spp., *Bifidobacterium* spp.), fecale virussen (colifagen) en chemische indicatoren (sterolen).

2.8.4.3 Mest en bodemmanagement

Er zijn slechts enkele studies uitgevoerd naar risicofactoren voor de besmetting van verse groenten met pathogenen. Mukherjee *et al.* (Mukherjee et al., 2007) verzamelde data betreffende de besmetting van verse groenten met generieke *E. coli* en verzamelde management gegevens van de producenten. Het risico op besmetting met *E. coli* bleek significant hoger wanneer er dierlijke mest werd gebruikt, wanneer mest werd gebruikt dat jonger dan een half jaar oud was en wanneer er rundermest werd gebruikt ten opzichte van andere dierlijke mestsoorten (Mukherjee et al., 2007). Echter, men moet voorzichtig zijn om deze resultaten te extrapoleren naar risicofactoren voor pathogenen aangezien het hier indicator organismen betreft.

Aangezien vele groenteproductiesystemen afhankelijk zijn van dierlijke mest is van het belang te kijken naar het mest type wat betreft het risico van pathoogen overleving en verspreiding. Een te kort tijdsinterval tussen het aanbrengen van (ongecomposteerde) mest op het land en het planten van de zaailingen wordt als een risicofactor gezien aangezien er dan niet voldoende tijd is om pathoogen concentraties voldoende te laten dalen. In de VS moet de biologische productie voldoen aan een minimale tijdsinterval van 120 dagen (Anonymous, 2000; Ingham et al., 2005), in de UK is dat zelfs 6 maanden (Nicholson, 2000). Echter, voor vele productiesystemen (zoals in Nederland) is zo'n lang tijdsinterval onrealistisch. Het streven is dus naar een minimale overleving in de mest en bodem door de mest en bodemkarakteristieken te beïnvloeden. In Tabel 7 zijn de factoren die van invloed zijn op de overleving van VTEC O157 samengevat.

Tabel 7. Factoren van invloed op de overleving van VTEC O157 in mest en met mest verrijkte bodem.

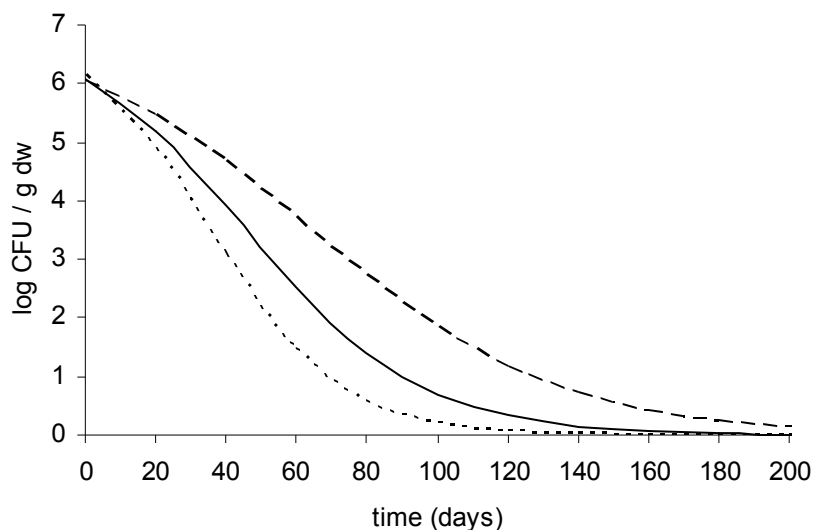
Substraat	Factor	Relatie met overleving	Bron
Mest	pH	Negatief	(Park et al., 2003; Franz et al., 2005)
Mest	Vezelgehalte	Negatief	(Franz et al., 2005)
Mest	Temperatuur	Negatief	(Kudva et al., 1998; Semenov, 2007)
Mest	Temperatuur fluctuaties	Negatief	(Semenov, 2007)
Mest	Coliformen	Negatief	(Franz et al., 2007a)
Mest	Zuurstof	Negatief	(Kudva et al., 1998; Semenov, 2008b)
Bodem	DOC/biomC ¹	Positief	(Franz, 2008a)
Bodem	Samenstelling zand/klei	Negatief	(Mubiru et al., 2000; Nicholson et al., 2005)

¹ DOC/biomC: hoeveelheid opgeloste suikerverbindingen per eenheid microbiele biomassa.

Uit Tabel 7 is af te leiden dat de mate van overleving van VTEC O157 samenhangt met de kwaliteit van de mest. Mest met een relatief hoge C/N verhouding (vaste mest) wordt over algemeen beschouwd als mest van betere kwaliteit aangezien deze mest weinig direct beschikbare suikerbronnen bevat. De suikers zijn aanwezig in complexere koolstofverbindingen zoals lignine en (hemi)cellulose waardoor de gemakkelijk opneembare suikers langzaam vrijkomen (door o.a. afbraak door schimmels). Het gebruik van vaste mest (in tegenstelling tot drijfmest) is daarom belangrijk voor het opbouwen van stabiele organische stof in de bodem. Als gevolg hiervan neemt de microbiologische activiteit en diversiteit toe in de bodem waardoor de natuurlijke ziektevering van de bodem toeneemt (van Bruggen et al., 2006). Bovendien zorgt het gebruik van vaste mest voor minder wegspoeling van nitraat en emissie van ammonia dan bij het gebruik van drijfmest (Reijs et al., 2007). Het blijkt dat het gebruik van vaste mest niet alleen agronomische en milieu voordelen heeft maar ook leidt tot een kleiner risico op het overleven van VTEC O157 in mest en met mest verrijkte bodem (Franz, 2008b). Immers, de pH, vezelgehalte, hoeveelheid coliformen en hoeveelheid gemakkelijk opneembare suikers zijn in het algemeen hoger in drijfmest. Aangezien vaste mest vaak op een hoop wordt bewaard en drijfmest in een kelder, bereikt vaste mest meestal een hogere temperatuur (compostering) met grotere fluctuaties en komt er meer zuurstof bij. Op basis van de beschikbare gegevens kan geconcludeerd

worden dat het risico van besmetting van groenten in het veld gereduceerd kan worden door het gebruik van vaste mest in vergelijking met drijfmest.

Mest met een hogere C/N verhouding kan verkregen worden door koeien een vezelrijker dieet te geven. Dit wordt reeds toegepast door melkveehouders in Nederland (b.v. de boeren in het mineralen project Vel & Vanla) om de nutriëntverliezen te verminderen (Reijs et al., 2007). De overleving van VTEC O157 bleek significant korter te zijn in mest afkomstig van koeien op een strodieet in vergelijking met koeien op een dieet van gras/mais-silage (Figuur. 18) (Franz et al., 2005). De mest afkomstig van de koeien op een stro-dieet had een hoger vezelgehalte, hogere C/N verhouding en hogere pH. Om te compenseren voor de lagere stikstof gehalten in vezelrijk voer kunnen additionele stikstof concentraten worden bijgevoerd om de melkproductie op peil te houden. Deze stikstofconcentraten bleken geen effect te hebben op de overleving van VTEC O157 in de mest (Franz et al., 2005).



Figuur. 18. Overleving van VTEC O157 in mest afkomstig van koeien met een verschillend voederregime: stro (gestippeld), gras-silage (lijn) en gras/mais-silage (gestreept) (Franz et al., 2005).

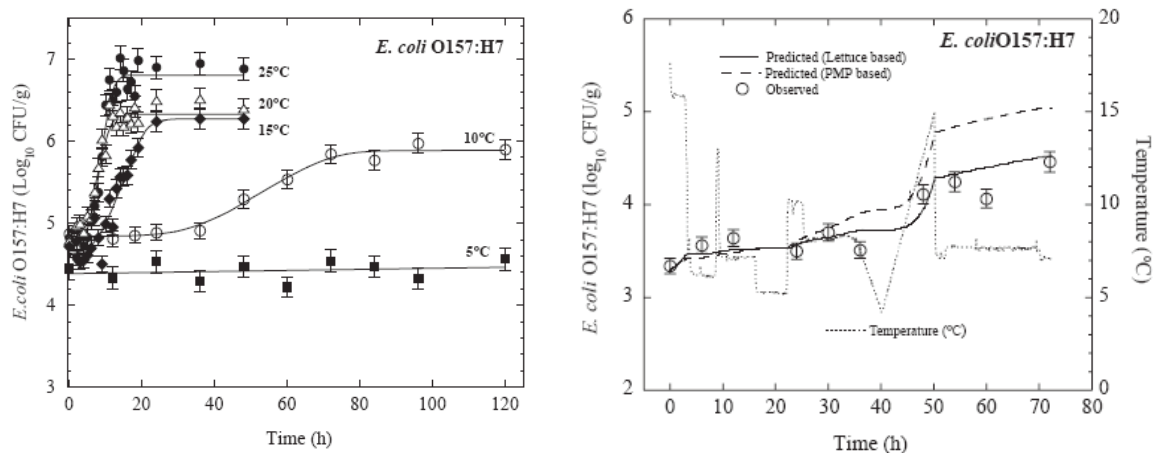
2.8.5 Post-harvest risicofactoren

Verse groenten kunnen ook tijdens de oogst besmet raken met pathogenen zoals VTEC, bijvoorbeeld via besmette handen, gereedschap, kratten en spoelwater (Beuchat et al., 1997). Het is daarom van belang om te werken volgens een hygiëncode, zoals opgesteld door het Productschap Tuinbouw (Anonymous, 2001). Aan het oppervlakte gehechte VTEC kan na de oogst nog geruime tijd overleven of zelfs groeien, afhankelijk van temperatuur, water beschikbaarheid, mate van weefselschade, beschikbaarheid van nutriënten en de aanwezige microbiële gemeenschap (Abdul-Raouf et al., 1993; Brandl, 2006; Delaquis et al., 2007). De belangrijkste risicofactoren worden hieronder behandeld.

2.8.5.1 Temperatuur

Perioden met hogere temperatuur in de productieketen van verse groenten kunnen leiden tot pathogeen uitgroei (Figuur. 12). Het niet respecteren van de zogenoemde cold-chain is een van de belangrijkste risicofactoren. In het algemeen vindt er geen groei plaats van VTEC O157 op groenten bij

temperaturen lager dan 8°C (Delaquis et al., 2007). VTEC O157 kan echter nog wel geruime tijd overleven bij temperaturen tussen 4 en 8 °C (Francis et al., 2001; Koseki et al., 2005) (Figuur. 19). Bovendien zijn er groeiende zorgen betreffende het effect van lage temperatuur (koude-stress) op de virulentie van pathogenen. De toxineproductie van VTEC O157 was verhoogd na langdurig verblijf bij 4°C en bij lage nutriëntgehalten (Buncic et al., 1998).



Figuur. 19. Groei van *E. coli* O157:H7 op gesneden sla onder constante temperatuur (links) en de groei van *E. coli* O157:H7 bij een realistisch temperatuursprofiel van oogst tot en met de retail (Koseki et al., 2005).

2.8.5.2 Post-harvest decontaminatie

Als reactie op de toenemende zorgen betreffende de voedselveiligheid van verse groenten heeft veel onderzoek zich toegespitst op de effectiviteit van verschillende fysische en chemische methoden om pathogenen van deze producten te verwijderen (Parish, 2003). Echter, deze methoden zijn niet altijd voldoende efficiënt in het verwijderen van pathogenen. Dit komt doordat deze vaak sterk gehecht zijn aan het oppervlak of zich bevinden op locaties in het plantenweefsel of in biofilms waar de bacterie beschermd is tegen het letale effect van decontaminatie. Het risico van decontaminatie schuilt in het feit dat niet alleen de pathogeen wordt gedood maar ook de van nature aanwezige goedaardige microbiële gemeenschap, welke als een buffer kan werken tegen de uitgroei van het pathogeen. Als deze microbiële gemeenschap in een grotere mate wordt verwijderd door decontaminatie dan vervalt de competitie en kan de pathogeen sneller gaan groeien (Doyle et al., 2008).

2.8.5.3 Kruisbesmetting gedurende verwerking

De laatste jaren is er een sterke toename te zien in het marktaandeel voorgesneden en verpakte verse groenten. Dit productieproces is inherent zeer gevoelig voor kruisbesmetting waarbij een kleine besmette partij kan leiden tot een grote hoeveelheid besmet eindproduct. Deze kruisbesmetting kan het gevolg zijn van direct contact tussen besmet en onbesmet product, of via besmet geraakt water en machinerie (Kaneko et al., 1999; Doyle et al., 2008). Ondanks de lage besmettingskans van individuele planten in het veld (Franz et al., 2008), kan dit productieproces leiden tot een relatief groot aantal besmette eindproducten. Er is nog geen kwantitatief onderzoek uitgevoerd naar kruisbesmetting in de groenteproduktieketen. Echter, grootschalige uitbraken in de VS met o.a. voorgesneden spinazie en sla ondersteunen de zorg omtrent de mogelijkheid van kruisbesmetting (Anonymous, 2006a).

2.8.5.4 Verpakking met "modified atmosphere"

Voorgesneden verse groenten wordt meestal verpakt met een gemodificeerde gassamenstelling om de houdbaarheidsdatum te verlengen. Door de zuurstofconcentratie laag te houden wordt de respiratie van het product laag gehouden, en dus de houdbaarheidsdatum verlengt. Deze verpakkingstechniek is gevoelig voor voedselveiligheid problemen aangezien de organismen die normaliter de consument waarschuwen voor bederf worden onderdrukt terwijl de groei van pathogenen kan worden gestimuleerd doordat er meer tijd is om te groeien en omdat VTEC goed kan groeien onder anaerobe condities (Farber, 2003). Experimenten laten zien dat VTEC O157 niet extra onderdrukt wordt onder gemodificeerde gassamenstelling (Francis et al., 2001). Bij een gemodificeerde atmosfeer van 5% O₂, 20% CO₂ en 65% stikstof, nam de houdbaarheidstijd met 300% toe en groeide de bederfflora langzamer dan bij normale lucht samenstelling, terwijl VTEC O157 juist sneller groeide (Diaz et al., 1996).

3 Discussie en conclusies

Verocytotoxine-producerende *E. coli* (VTEC) is een groep pathogenen die ernstige ziekteverschijnselen bij de mens kan veroorzaken. VTEC heeft een duidelijk zoönotisch karakter met rundvee als belangrijkste reservoir. Het meest bekende serotype VTEC is *E. coli* O157:H7. Langjarige monitoring naar de prevalentie van *E. coli* O157:H7 op melkveebedrijven in Nederland laat zien dat dit serotype endemisch is in de Nederlandse rundveestapel, met een gemiddeld prevalentie van 8% onder melkveebedrijven en 13% onder vleeskalveren. Pieken in prevalentie vinden plaats in de zomer en vroege herfst. De redenen voor deze seizoensfluctuatie zijn onbekend. Opvallend is de hoge prevalentie onder rosékalveren (40%) in vergelijking met witvleeskalveren (1.5%). Dit zou te maken kunnen hebben met verschillen in het productiesysteem. Rosékalveren zijn over het algemeen ouder op het moment van slacht dan witvleeskalveren (35 weken versus 25 weken) en zijn dus langer blootgesteld. Bovendien worden deze dieren in meer gecontroleerde omgeving gehouden. Het dieet van witvleeskalveren bestaat hoofdzakelijk uit melkpoeder en een zeer beperkte hoeveelheid ruwvoer en/of concentraten terwijl rosékalveren een dieet krijgen dat voornamelijk uit ruwvoer en concentraten bestaat. Uit de wetenschappelijke literatuur blijkt dat het voederregime van rundvee invloed kan hebben op de prevalentie en mate van pathogeen-uitscheiding. Echter, de conclusies zijn niet eenduidig en de rol van het dieet in het verschil in prevalentie tussen beide typen vleeskalveren is dan ook niet duidelijk. In het licht van het verdwijnen van de witvleeskalverindustrie en het uitbreiden van de rosekalverindustrie, moeten de rosékalveren goed in de gaten worden gehouden als VTEC reservoir. *E. coli* O157:H7 komt sporadisch voor onder vleeskuikens, leghennen, varkens (prevalentie van minder dan 2%) en lammeren (prevalentie rond 4%).

Vanaf 1999 is er een geïntensiverde surveillance en een meldingsplicht voor humane infecties met VTEC O157. De baseline incidentie van geregistreerde VTEC O157 infecties in Nederland ligt op 0.26 gevallen per 100,000 inwoners per jaar (43 gevallen per jaar). Dit is ruim beneden het Europees gemiddelde van 0.96 per 100,000 inwoners. Wanneer de uitbraken met fillet américain (2005) en gesneden sla (2007) worden meegerekend komt de gemiddelde incidentie op 0.29 per 100,000 inwoners (48 gevallen per jaar). In 2007 was de incidentie in Nederland min of meer gelijk aan het Europees gemiddelde voor dat jaar (0.5 versus 0.6 cases per 100,000 inwoners). Het gaat hier echter om het aantal officieel gerapporteerde VTEC O157 gevallen. Op basis van gegevens van 1990-2000 wordt geschat dat er in totaal gemiddeld 2111 gevallen per jaar zijn. Voor 2006 werd het daadwerkelijk aantal VTEC O157 infecties geschat op 1851, ten opzichte van 40 gerapporteerde gevallen. In de periode 1999-2003 was het directe contact met landbouwhuisdieren en/of mest de belangrijkste risicofactor in Nederland voor humane infectie met VTEC O157. In de periode na 2003 nam het relatief belang van voedsel en person-to-person transmissie toe t.o.v. de periode daarvoor. Dit valt samen met de twee voedselgerelateerde uitbraken in 2005 (filet américain) en 2007 (gesneden sla). Het lijkt dat de sporadische VTEC O157 infecties voornamelijk het gevolg zijn van direct contact met landbouwhuisdieren en mest, terwijl uitbraken met name gerelateerd zijn aan de consumptie van besmet voedsel. Diagnostische resultaten uit andere Europese landen laten zien dat non-O157 VTEC serotypen relatief steeds vaker geassocieerd worden met klinische cases en uitbraken. Ook in Nederland lijkt het relatieve belang van non-O157 serotypen groter dan dat van serotype O157. Er bestaan echter grote regionale verschillen in de samenstelling van deze non-O157 groep. Er bestaat momenteel geen eenduidige standaard voor het isoleren van non-O157 VTEC. De enige manier om

VTEC als geheel aan te tonen is met een PCR op de Shiga-toxine genen aangezien dit de enige (bekende) factor is die de gehele groep gemeenschappelijk heeft. In Nederland wordt surveillance naar non-O157 VTEC uitgevoerd door de laboratoria die een PCR uitvoeren. De fractie van de laboratoria die een PCR uitvoert is echter niet precies bekend. Bij de surveillance naar de prevalentie van VTEC onder landbouwhuisdieren en voedsel is tot nu alleen sporadisch gekeken naar non-O157 VTEC. Conclusie is dat de surveillance naar non-O157 VTEC in Nederland nog niet voldoende is.

In sommige Europese landen zijn er opvallende verschillen in VTEC prevalentie onder rundvee (bedrijven) en humane VTEC infecties. In 2007 was zowel de prevalentie onder rundvee als de humane incidentie in Nederland min of meer gelijk aan het Europees gemiddelde. Echter, in Duitsland was de prevalentie onder rundvee 0% (n=1099) terwijl de incidentie van humane gevallen 1.1 per 100,000 inwoners was (Anonymous, 2009). In Luxemburg is het omgekeerde het geval: een prevalentie onder rundvee van 22% (n=243) en een humane incidentie van slechts 0.2 per 100,000 inwoners. Dit suggereert dat er andere VTEC reservoirs en/of andere transmissieroutes zijn.

Bij elke positieve VTEC O157 bevinding neemt de regionale GGD een standaard vragenlijst af bij de patiënt. Pas bij clusters van cases wordt besloten of tracering zinvol is. Deze tracering wordt door de regionale VWA uitgevoerd. De typeringsresultaten van de humane isolaten worden uiteindelijk vergeleken met isolaten uit de verdachte bron. Tracering van voedselbronnen is vaak erg lastig aangezien dit vaak puntbesmettingen betreft en het betreffende product zich vaak niet meer op de markt bevindt ten tijde van de tracering. Bij diercontact als oorzaak van infectie is brononderzoek vaker succesvol. De informatie uit de tracering wordt gebruikt om vervolgonderzoek op te zetten, het monitorings-programma uit te breiden of de surveillance op deze specifieke bron te intensiveren.

Rundvleesproducten zijn in het algemeen de belangrijkste voedselgerelateerde oorzaak van VTEC (O157) infecties. Interventiestrategieën met als doel om de prevalentie te verlagen kunnen worden toegepast gedurende de primaire productiefase (op boerderijniveau) of gedurende de slachtfase. Interventies gedurende de primaire fase zijn echter moeizaam te realiseren. Risicofactoren geassocieerd met de aanwezigheid van VTEC (O157) verschillen sterk per studie. Echter, combinaties van interventies kunnen leiden tot een reductie van VTEC O157 onder runderen. Een bijkomend probleem is wel dat, om het gewenste effect te realiseren, de interventies moeten worden toegepast op alle rundveebedrijven in Nederland. Zolang dit echter geen direct voordeel voor de boer oplevert, zal dit praktisch onhaalbaar zijn. Omgerekend per koe zullen de kosten voor interventie op boerderijniveau dan ook hoger zijn dan voor interventies op slachthuisniveau. Het toepassen van interventiestrategieën op slachthuisniveau lijkt dan ook realistischer. Echter, karkas- en vleesdecontaminatie is op basis van Europese wetgeving niet toegestaan. Alleen decontaminatie op basis van hittebehandeling is toegestaan maar resulteert, net zoals andere decontaminatie procedures, in nadelige effecten op de vleeskwaliteit. Implementatie van zulke maatregelen vereist een grote investering en levert de slachterij, die met name geïnteresseerd is in verlenging van de houdbaarheid, geen direct voordeel op. Op basis van de relatieve lage VTEC O157 infectie-incidentie in Nederland zou het handhaven van de bestaande HACCP (Hazard And Critical Control Points) en GMP (Good Manufacturing Practice) protocollen voorlopig voldoende moeten zijn. Het handhaven van de koudeketen is van groot belang om uitgroei van pathogenen te voorkomen.

Gedurende de laatste jaren is er internationaal een toename in het aantal uitbraken van VTEC infecties gerelateerd aan de consumptie van verse groenten. Door een recente uitbraak van VTEC O157

geassocieerd met voorgesneden sla wordt nu ook in Nederland verse groenten als een mogelijke risicofactor gezien. Besmetting van deze voedselproducten wordt het meest waarschijnlijk geacht via het gebruik van besmette mest en/of water gedurende de primaire productiefase. Wat betreft de potentiële besmetting van groenten is het voorkómen van besmetting in de primaire productie belangrijk aangezien er geen decontaminatie plaatsvindt na de oogst en geen verhitting voor consumptie. De meeste post-harvest ontsmettingsprocedures zijn namelijk niet voldoende effectief, of zijn niet toegestaan (zoals in Nederland). Maatregelen die genomen worden op het niveau van het rundveebedrijf om de VTEC last te verlagen zorgen uiteindelijk ook voor een lagere input van VTEC in de groenteproductieketen. De overleving van VTEC O157 in mest en bodem kan worden beperkt door het tegen gaan van eutrofiëring van mest en bodem in termen van voor VTEC gemakkelijk opneembare koolstofbronnen. Door het gebruik van mest met een hoger vezelgehalte wordt het gehalte aan gemakkelijk opneembare koolstofbronnen verlaagd terwijl juist het gehalte aan stabiele organische stof toeneemt. Deze strategie wordt ook toegepast om plant pathogenen te onderdrukken en om nutriënten verlies bij bemesting te verminderen. Om besmetting gedurende de post-harvest fase te voorkómen moeten de hygiëneprotocollen worden nageleefd. Bovendien moet de zogenaamde koudeketen worden gerespecteerd om eventuele uitgroei te voorkómen.

4 Aanbevelingen

In dit project is een oriënterende workshop gehouden met beleidsmedewerkers en onderzoekers, gevolgd door een deskstudie waarin zowel peer-reviewed literatuur is bestudeerd evenals diverse andere bronnen. **De algemene conclusie van deze deskstudie is dat de huidige VTEC problematiek in Nederland relatief gering is, ondanks de algemene aanwezigheid in de Nederlandse rundveestapel. Er is dan ook geen directe aanleiding voor grootschalige interventiestrategieën om de baseline incidentie te verlagen.**

Er zijn echter een aantal punten die continue surveillance rechtvaardigen en verder onderzoek vereisen:

Uitbraakpotentie. Het lijkt dat de sporadische VTEC O157 infecties voornamelijk het gevolg zijn van direct contact met landbouwhuisdieren en mest, terwijl uitbraken met name gerelateerd zijn aan besmet voedsel. Alhoewel de basis incidentie van VTEC O157 in Nederland relatief laag en stabiel is, is er de laatste jaren een stijging in het totaal aantal VTEC infecties. Dit komt door uitbraken in 2005 (rundvlees) en 2007 (gesneden sla). In tegenstelling tot de lage incidentie van individuele VTEC cases, vormt de uitbraakpotentie een serieuze bedreiging voor de volksgezondheid én kan het economische effecten hebben op de desbetreffende sector. Vanuit het buitenland weten we dat VTEC uitbraken een grote omvang kunnen aannemen. Bovendien heeft VTEC O157 een relatief hoge individuele ziektelast met ernstige klinische verschijnselen. Het voorkómen van uitbraken is dan ook van groot belang. Hiervoor is kennis noodzakelijk betreffende de condities in voedselproductiesystemen die een rol kunnen spelen bij het ontstaan van een uitbraak.

Aanbeveling: continue monitoring betreffende de prevalentie van VTEC O157 om veranderingen in prevalentie te signaleren en uitbraken vroegtijdig te kunnen detecteren.

Non-O157 VTEC serotypen. Al geruime tijd wordt in de internationale literatuur gewezen op het feit dat andere VTEC serotypen dan *E. coli* O157:H7 van grote klinische relevantie kunnen zijn en dat hun incidentie sterk wordt onderschat. Dit lijkt ook voor Nederland te gelden. Sinds een aantal jaren is er een geïntensiveerde klinische surveillance naar non-O157 VTEC. Echter, wat betreft het vóórkomen van non-O157 VTEC serotypen in de Nederlandse veestapel is nog zo goed als niets bekend. Hiermee loopt Nederland achter op de rest van Europa. Kennis hierover zou sterk bijdragen aan een volledig beeld van de VTEC problematiek in Nederland. De ontwikkeling van een standaard VTEC detectiemethode zou een sterke bijdrage leveren aan de ontwikkeling van kennis omtrent non-O157 VTEC. Een bijkomend aandachtspunt is dat de belangrijkste VTEC virulentiefactoren gecodeerd worden door genen die zich bevinden op mobiele genetische elementen, welke overgedragen kunnen worden naar andere VTEC (Wetzel et al., 2007; Sekse et al., 2008) and zelfs naar generieke *E. coli* (Gamage et al., 2004). Het ontstaan (en verdwijnen) van VTEC en nieuwe varianten is dus een continu proces dat waakzaamheid vereist.

Aanbeveling: intensivering van surveillance naar non-O157 VTEC serogroepen onder Nederlandse landbouwhuisdieren.

Nieuwe transmissieroutes. De laatste jaren wordt duidelijk dat niet alleen vlees een risicoproduct kan zijn voor VTEC O157 besmetting maar ook andere voedselproducten die direct of indirect in contact komen met dierlijke mest en die voorbereiding geen hitte behandeling ondergaan (verse groenten). Of de aan ijsbergsla gerelateerde uitbraak in 2007 een incident was of dat rauwe groenten wel degelijk een consistente risicofactor zijn moet de toekomst uitwijzen. Het is dan ook van belang om deze productgroep in de gaten te blijven houden. Surveillance naar het vóórkomen van VTEC O157 in verse groenten is kostbaar en tijdrovend vanwege de lage prevalentie. Vanwege het vaak ontbreken van correlaties met pathogeen aanwezigheid wordt het gebruik van generieke *E. coli* en /of coliformen als indicator organismen steeds vaker betwijfeld.

Aanbeveling: stimuleren van onderzoek naar alternatieve indicator organismen voor de aanwezigheid op voedselproducten die worden gekenmerkt door lage pathogeen prevalenties.

Virulentie. In de levensmiddelenmicrobiologie wordt steeds meer bekend betreffende de inductie van resistentiemechanismen van pathogenen als reactie op fysische/chemische/biologische stress. In hoeverre de voedselproductieketen een bijdrage levert aan verhoogde stressresistentie, verhoogde virulentie en/of selectie voor bepaalde VTEC serotypen is niet bekend. Dit zou met name van belang kunnen zijn voor VTEC aanwezig in de productieketen van groenten aangezien mest, bodem en plant van nature voor VTEC vijandige milieus zijn. Recentelijk is bekend geworden dat de VTEC O157 strain verantwoordelijk voor de grootschalige uitbraak met spinazie in de VS opmerkelijk virulent was. Of dit toevallig was of een consistente ontwikkeling inhoudt is niet duidelijk en vereist nader onderzoek. Tot nu toe baseren microbiologische risicoanalyses zich alleen op aantallen pathogenen, zonder rekening te houden met de virulentie, fysiologische status, genetische samenstelling, etc. Het meenemen van deze eigenschappen in risicoanalyses zou kunnen leiden tot preciezere risicovoorspellingen en microbiologische criteria voor voedingsmiddelen.

Aanbeveling: stimuleren van onderzoek naar hoe het voedselproductieproces kan selecteren voor virulentie bij pathogenen en hoe fysiologische en genetische eigenschappen van pathogenen kunnen worden verwerkt in microbiologische risicoanalyses.

5 Literatuur

- Abdul-Raouf, U.M., Beuchat, L.R., Ammar, M.S., 1993. Survival and growth of *Escherichia coli* O157:H7 on salad vegetables. *Applied and Environmental Microbiology* 59, 1999-2006.
- Ahmad, A., Nagaraja, T.G., Zurek, L., 2007. Transmission of *Escherichia coli* O157 : H7 to cattle by house flies. *Preventive Veterinary Medicine* 80, 74-81.
- Aminul Islam, M., Heuvelink, A.E., Talukder, K.A., de Boer, E., 2006. Immunoconcentration of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 from animal faeces and raw meats by using Dynabeads anti-E. coli O157 and the VIDAS system. *International Journal of Food Microbiology* 109, 151-156.
- Anonymous, 2000. National organic program. American Society for Microbiology: <http://www.asm.org/Policy/index.asp?bid=3585>.
- Anonymous, 2001. Hygienecode voor teeltbedrijven van groenten en fruit. Productschap Tuinbouw.
- Anonymous, 2006a. Multi-state outbreak of *E. coli* O157:H7 infections from spinach. <http://www.cdc.gov/ecoli/2006/september/>.
- Anonymous, 2006b. Outbreak alert - Closing the gap in our federal food-safety net. http://www.cspinet.org/foodsafety/outbreak_alert.pdf.
- Anonymous, 2007. Investigation of an *Escherichia coli* O157:H7 outbreak associated with Dole pre-packaged spinach. In: http://www.marlerclark.com/2006_spinach_Report_Final_01.pdf (Ed.), California department of public health.
- Anonymous, 2008. Investigation of the Taco John's *Escherichia coli* O157:H7 outbreak associated with iceberg lettuce. In: The California Food Emergency Response Team.
- Anonymous, 2009. The Community Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses and Zoonotic Agents in the European Union in 2007. *The EFSA Journal* (2009) 223.
- Bach, S.J., McAllister, T.A., Mears, G.J., Schwartzkopf-Genswein, K.S., 2004. Long-haul transport and lack of preconditioning increases fecal shedding of *Escherichia coli* and *Escherichia coli* O157:H7 by calves. *Journal of Food Protection* 67, 672-678.
- Bacon, R.T., Belk, K.E., Sofos, J.N., Clayton, R.P., Reagan, J.O., Smith, G.C., 2000. Microbial populations on animal hides and beef carcasses at different stages of slaughter in plants employing multiple-sequential interventions for decontamination. *Journal of Food Protection* 63, 1080-1086.
- Barkocy-Gallagher, G.A., Arthur, T.M., Rivera-Betancourt, M., Nou, X.W., Shackelford, S.D., Wheeler, T.L., Koohmaraie, M., 2003. Seasonal prevalence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*, including O157 : H7 and non-O157 serotypes, and *Salmonella* in commercial beef processing plants. *Journal of Food Protection* 66, 1978-1986.
- Bell, B.P., Goldoft, M., Griffin, P.M., Davis, M.A., Gordon, D.C., Tarr, P.I., Bartleson, C.A., Lewis, J.H., Barrett, T.J., Wells, J.G., Baron, R., Kobayashi, J., 1994. A multistate outbreak of *Escherichia coli* O157:H7-associated bloody diarrhea and hemolytic uremic syndrome from hamburgers: The Washington experience. *Journal of the American Medical Association* 272, 1349-1353.
- Belongia, E.A., MacDonald, K.L., Parham, G.L., White, K.E., Korlath, J.A., Lobato, M.N., Strand, S.M., Casle, K.A., Osterholm, M.T., 1991. An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 colitis associated with consumption of precooked meat patties. *Journal of Infectious Diseases* 164, 338-343.
- Berends, I.M.G.A., Graat, E.A.M., Swart, W.A.J.M., Weber, M.F., van de Giessen, A.W., Lam, T.J.G.M., Heuvelink, A.E., van Weering, H.J., 2008. Prevalence of VTEC O157 in dairy and veal herds and risk factors for veal herds. *Preventive Veterinary Medicine*.
- Bettelheim, K.A., 2007. The non-O157 Shiga-toxigenic (verocytotoxigenic) *Escherichia coli*; under-rated pathogens. *Critical Reviews in Microbiology* 33, 67-87.
- Beuchat, L.R., Ryu, J.H., 1997. Produce Handling and Processing Practices. *Emerging Infectious Diseases* 3, 459-465.

- Beutin, L., Geier, D., Steinruck, H., Zimmermann, S., Scheutz, F., 1993. Prevalence and Some Properties of Verotoxin (Shiga-Like Toxin)-Producing *Escherichia-Coli* in 7 Different Species of Healthy Domestic-Animals. *Journal of Clinical Microbiology* 31, 2483-2488.
- Bielaszewska, M., Zhang, W., Mellmann, A., Karch, H., 2007. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O26:H11/H-: A human pathogen in emergence. *Berliner und Munchener Tierarztliche Wochenschrift* 120, 279-287.
- Blanco, J., Blanco, M., Blanco, J.E., Mora, A., Gonzalez, E.A., Bernardez, M.I., Alonso, M.P., Coira, A., Rodriguez, A., Rey, J., Alonso, J.M., Usera, M.A., 2003. Verotoxin-producing *Escherichia coli* in Spain: Prevalence, serotypes, and virulence genes of O157:H7 and non-O157 VTEC in ruminants, raw beef products, and humans. *Experimental Biology and Medicine* 228, 345-351.
- Boerlin, P., McEwen, S.A., Boerlin-Petzold, F., Wilson, J.B., Johnson, R.P., Gyles, C.L., 1999. Associations between virulence factors of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and disease in humans. *Journal of Clinical Microbiology* 37, 497-503.
- Bosilevac, J.M., Shackelford, S.D., Brichta, D.M., Koohmaraie, M., 2005a. Efficacy of ozonated and electrolyzed oxidative waters to decontaminate hides of cattle before slaughter. *Journal of Food Protection* 68, 1393-1398.
- Bosilevac, J.M., Nou, X., Osborn, M.S., Allen, D.M., Koohmaraie, M., 2005b. Development and evaluation of an on-line hide decontamination procedure for use in a commercial beef processing plant. *Journal of Food Protection* 68, 265-272.
- Bouwknegt, M., Dam-Deisz, W. D. C., Wannet, W. J. B., van Pelt, W., Visser, G. and van de Giessen, A. W., 2004. Surveillance of zoonotic bacteria in farm animals in the Netherlands. Results from January 1998 until December 2002. RIVM report 330050001/2004.
- Brandl, M.T., 2006. Fitness of human enteric pathogens on plants and implications for food safety. In: *Annual Review of Phytopathology*. pp. 367-392.
- Buncic, S., Avery, S.M., 1998. Effects of cold storage and heat-acid shocks on growth and verotoxin 2 production of *Escherichia coli* O157:H7. *Food Microbiology* 15, 319-328.
- Burnens, A.P., Frey, A., Lior, H., Nicolet, J., 1995. Prevalence and clinical significance of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) isolated from cattle in herds with and without calf diarrhoea. *Zentralblatt für Veterinärmedizin. Reihe B. Journal of veterinary medicine. Series B* 42, 311-318.
- Burt, S.A., Reinders, R.D., 2003. Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O157:H7. *Letters in Applied Microbiology* 36, 162-167.
- Callaway, T.R., Anderson, R.C., Genovese, K.J., Poole, T.L., Anderson, T.J., Byrd, J.A., Kubena, L.F., Nisbet, D.J., 2002. Sodium chlorate supplementation reduces *E-coli* O157 : H7 populations in cattle. *Journal of Animal Science* 80, 1683-1689.
- Chapman, P.A., Siddons, C. A., Wright, J.D., Norman, P., Fox, J. and Crick, E, 1993. Cattle as a possible source of verotoxin-producing *Escherichia coli* O157 contaminations in man. *Epidemiology and Infection* 111, 439-447.
- Chart, H., Rowe, B., Kar, V.D.N., Monnens, L.A.H., 1991. Serological identification of *Escherichia coli* O157 as cause of haemolytic uraemic syndrome in Netherlands. *Lancet* 337, 437.
- Cho, S., Bender, J.B., Diez-Gonzalez, F., Fossler, C.P., Hedberg, C.W., Kaneene, J.B., Ruegg, P.L., Warnick, L.D., Wells, S.J., 2006. Prevalence and characterization of *Escherichia coli* O157 isolates from Minnesota dairy farms and county fairs. *Journal of Food Protection* 69, 252-259.
- Cooley, M.B., Chao, D., Mandrell, R.E., 2006. *Escherichia coli* O157:H7 survival and growth on lettuce is altered by the presence of epiphytic bacteria. *Journal of Food Protection* 69, 2329-2335.
- Cowden, J.M., Ahmed, S., Donaghy, M., Riley, A., 2001. Epidemiological investigation of the Central Scotland outbreak of *Escherichia coli* O157 infection, November to December 1996. *Epidemiology and Infection* 126, 335-341.
- Daniels, M.J., Hutchings, M.R., Greig, A., 2003. The risk of disease transmission to livestock posed by contamination of farm stored feed by wildlife excreta. *Epidemiology and Infection* 130, 561-568.
- Davis, M.A., Cloud-Hansen, K.A., Carpenter, J., Hovde, C.J., 2005. *Escherichia coli* O157:H7 in environments of culture-positive cattle. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 6816-6822.

- De Wit, M.A.S., Koopmans, M.P.G., Kortbeek, L.M., Van Leeuwen, N.J., Vinje, J., Van Duynhoven, Y.T.H.P., 2001. Etiology of gastroenteritis in sentinel general practices in The Netherlands. *Clinical Infectious Diseases* 33, 280-288.
- Delaquis, P., Bach, S., Dinu, L.D., 2007. Behavior of *Escherichia coli* O157:H7 in leafy vegetables. *Journal of Food Protection* 70, 1966-1974.
- Diaz, C., Hotchkiss, J.H., 1996. Comparative growth of *Escherichia coli* O157:H7, spoilage organisms and shelf-life of shredded iceberg lettuce stored under modified atmospheres. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 70, 433-438.
- Diez-Gonzalez, F., Callaway, T.R., Kizoulis, M.G., Russell, J.B., 1998. Grain feeding and the dissemination of acid-resistant *Escherichia coli* from cattle. *Science* 281, 1666-1668.
- Dincer, A.H., Baysal, T., 2004. Decontamination techniques of pathogen bacteria in meat and poultry. *Critical Reviews in Microbiology* 30, 197-204.
- Donnenberg, M.S., 2002. Introduction. In: Donnenberg, M.S. (Ed.), *Escherichia coli: virulence mechanisms of a versatile pathogen* Elsevier Ltd, UK. ISBN 0122207513.
- Doorduyn, Y., de Boer, E. en van Pelt, W., 2008. Registratie voedselinfecties en -vergiftigingen bij de Inspectie voor de Gezondheidszorg en de Voedsel en Waren Autoriteit, 2007. RIVM Rapport 330261001/2008.
- Doorduyn, Y., de Jager, C. M., van der Xwaluw, W. K., Friesema, I. H. M., Heuvelink, A. E., de Boer, E., Wannet, W. J. B. and van Duynhoven, Y. T. H. P. , 2006. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) O157 outbreak, The Netherlands, September - October 2005. *Eurosurveillance* 11, 182-185 (http://www.eurosurveillance.org/eq/2006/2003-2006/pdf/eq_2007_2006_2182-2185.pdf).
- Dopfer, D., Geue, L., De Bree, J., De Jong, M.C.M., 2006. Dynamics of verotoxin-producing *Escherichia coli* isolated from German beef cattle between birth and slaughter. *Preventive Veterinary Medicine* 73, 229-240.
- Dorsa, W.J., 1997. New and established carcass decontamination procedures commonly used in the beef-processing industry. *Journal of Food Protection* 60, 1146-1151.
- Dorsa, W.J., Cutter, C.N., Siragusa, G.R., Koohmaraie, M., 1996. Microbial decontamination of beef and sheep carcasses by steam, hot water spray washes, and a steam-vacuum sanitizer. *Journal of Food Protection* 59, 127-135.
- Doyle, M.P., Erickson, M.C., 2008. Summer meeting 2007 - The problems with fresh produce: An overview. *Journal of Applied Microbiology* 105, 317-330.
- Ellis-Iversen, J., Watson, E., 2008. A 7-point plan for control of VTEC O157, *Campylobacter jejuni/coli* and *Salmonella* serovars in young cattle. *Cattle Practice* 16, 103-106.
- Ethelberg, S., Smith, B., Torpdahl, M., Lisby, M., Boel, J., Jensen, T., MÅlbak, K., 2007. An outbreak of Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O26:H11 caused by beef sausage, Denmark 2007. *Euro surveillance : bulletin européen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin* 12.
- Ethelberg, S., Olsen, K.E.P., Scheutz, F., Jensen, C., Schiellerup, P., Engberg, J., Petersen, A.M., Olesen, B., Gerner-Smidt, P., Mølbak, K., 2004. Virulence Factors for Hemolytic Uremic Syndrome, Denmark. *Emerging Infectious Diseases* 10, 842-847.
- Faith, N.G., Shere, J.A., Brosch, R., Arnold, K.W., Ansay, S.E., Lee, M.S., Luchansky, J.B., Kaspar, C.W., 1996. Prevalence and clonal nature of *Escherichia coli* O157:H7 on dairy farms in Wisconsin. *Applied and Environmental Microbiology* 62, 1519-1525.
- Farber, J.N., Harris, L. J., Parish, M. E., Beuchat, L. R., Suslow, T. V., Gorney, J. R., Garrett, E. H. and Busta, F. F., 2003. Microbiological safety of controlled and modified atmosphere packaging of fresh and fresh-cut produce. . In: *Analysis and evaluation of preventive control measures for the control and reduction / elimination of microbial hazards on fresh and fresh-cut produce*. *Comprehensive reviews in food science and food safety* 2 (supplement).
- Fisher, I.S., Meakens, S., 2006. Surveillance of enteric pathogens in Europe and beyond: Enter-net annual report for 2004. . *Euro surveillance : bulletin européen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*. 11 (8). <http://www.hpa.org.uk/hpa/inter/enter-net/Enter-net%20annual%20report%202004.pdf> 11.

- Francis, G.A., O'Beirne, D., 2001. Effects of vegetable type, package atmosphere and storage temperature on growth and survival of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 27, 111-116.
- Franz, E., 2007. Ecology and risk assessment of *E. coli* O157:H7 and *Salmonella* Typhimurium in the primary production chain of lettuce. PhD thesis, Wageningen University, Wageningen, the Netherlands. 216p. .
- Franz, E., Semenov, A.V., Van Bruggen, A.H.C., 2008. Modelling the contamination of lettuce with *Escherichia coli* O157:H7 from manure-amended soil and the effect of intervention strategies. *Journal of Applied Microbiology* 105, 1569-1584.
- Franz, E., Van Diepeningen, A.D., De Vos, O.J., Van Bruggen, A.H.C., 2005. Effects of cattle feeding regimen and soil management type on the fate of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* serovar typhimurium in manure, manure-amended soil, and lettuce. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 6165-6174.
- Franz, E., Klerks, M.M., De Vos, O.J., Termorshuizen, A.J., Van Bruggen, A.H.C., 2007a. Prevalence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* stx1, stx2, eaeA, and rfbE genes and survival of *E. coli* O157:H7 in manure from organic and low-input conventional dairy farms. *Applied and Environmental Microbiology* 73, 2180-2190.
- Franz, E., Visser, A.A., Van Diepeningen, A.D., Klerks, M.M., Termorshuizen, A.J., van Bruggen, A.H.C., 2007b. Quantification of contamination of lettuce by GFP-expressing *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Food Microbiology* 24, 106-112.
- Franz, E., Semenov, A. V., Termorshuizen, A. J., de Vos, O. J., Bokhorst, J. G. and van Bruggen, A. H. C. , 2008a. Manure-amended soil characteristics affecting the survival of *E. coli* O157:H7 in 36 Dutch soils. *Environmental Microbiology* 10, 313-327.
- Franz, E., van Bruggen, A.H.C., 2008b. Ecology of *E. coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* in the primary vegetable production chain. *Critical Reviews in Microbiology* 34.
- Friesema, I., Sigmundsdottir, G., van der Zwaluw, K., Heuvelink, A., Schimmer, B., de Jager, C., Rump, B., Briem, H., Hardardottir, H., Atladottir, A., Gudmundsdottir, E., van Pelt, W. , 2008a. An international outbreak of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 infection due to lettuce, September – October 2007. *Euro Surveill.* 2008;13(50):pii=19065. Available online: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19065>.
- Friesema, I.H.M., de Jager, C.M., Heuvelink, A.E., van der Zwaluw, W.K., Kuiling, S, van Duynhoven, Y.T.H.P, van Pelt, W., 2008b. Intensieve surveillance van Shigatoxineproducerende *Escherichia coli* (STEC) in Nederland, 2007. *Infectieziektebulletin* 19.
- Friesema, I.H.M., de Jager, C.M., Heuvelink, A.E., van der Zwaluw, W.K., Maas, H.M.E., van Pelt, W., Wannet, W.J.B. en van Duynhoven, Y.T.H.P., 2006. Intensieve surveillance van Shigatoxine-producerende *Escherichia coli* O157 in Nederland, 2005. *Infectieziektebulletin* 17, 282-287.
- Gamage, S.D., Patton, A.K., Hanson, J.F., Weiss, A.A., 2004. Diversity and host range of Shiga toxin-encoding phage. *Infection and Immunity* 72, 7131-7139.
- Havelaar, A.H., Van Duynhoven, Y.T.H.P., Nauta, M.J., Bouwknegt, M., Heuvelink, A.E., De Wit, G.A., Nieuwenhuizen, M.G.M., van de Kar, N.C.A.J., 2004. Disease burden in The Netherlands due to infections with Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157. *Epidemiology and Infection* 132, 467-484.
- Herriott, D.E., Hancock, D.D., Ebel, E.D., Carpenter, L.V., Rice, D.H., Besser, T.E., 1998. Association of herd management factors with colonization of dairy cattle by shiga toxin-positive *Escherichia coli* O157. *Journal of Food Protection* 61, 802-807.
- Heuvelink, A., Schulten, S., Hoenderken, R., Bijker, P., De Boer, E., 1996a. Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 in Dutch veal calves and adult cattle sampled at slaughterhouses. *Verocytotoxine-producerende Escherichia coli* O157 BIJ nederlandse vleeskalveren en slachtrunderen 121, 642-646.
- Heuvelink, A.E., de Boer, E., Edel, W., 1996b. Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 in feces from cattle and uncooked meat products in The Netherlands. *Isolatie van Escherichia coli* O157:H7 uit faeces van runderen en uit rauwe vleesproducten in Nederland. 121, 324-325.

- Heuvelink, A.E., Wernars, K., De Boer, E., 1996c. Occurrence of *Escherichia coli* O157 and other verocytotoxin-producing *E. coli* in retail raw meats in the Netherlands. *Journal of Food Protection* 59, 1267-1272.
- Heuvelink, A.E., Zwartkruis-Nahuis, J.T.M., Beumer, R.R., De Boer, E., 1999a. Occurrence and survival of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 in meats obtained from retail outlets in The Netherlands. *Journal of Food Protection* 62, 1115-1122.
- Heuvelink, A.E., Van de Kar, N.C.A.J., Meis, J.F.G.M., Monnens, L.A.H., Melchers, W.J.G., 1995. Characterization of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 isolates from patients with haemolytic uraemic syndrome in Western Europe. *Epidemiology and Infection* 115, 1-14.
- Heuvelink, A.E., Zwartkruis-Nahuis, J.T.M., van den Biggelaar, F., van Leeuwen, W.J., de Boer, E., 1999b. Isolation and characterization of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 from slaughter pigs and poultry. *International Journal of Food Microbiology* 52, 67-75.
- Heuvelink, A.E., van den Biggelaar, F., de Boer, E., Herbes, R.G., Melchers, W.J.G., Huis In 't Veld, J.H.J., Monnens, L.A.H., 1998a. Isolation and characterization of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 strains from Dutch cattle and sheep. *Journal of Clinical Microbiology* 36, 878-882.
- Heuvelink, A.E., Van Den Biggelaar, F.L.A.M., De Boer, E., Herbes, R.G., Melchers, W.J.G., Huis In 't Veld, J.H.J., Monnens, L.A.H., 1998b. Isolation and characterization of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 strains from Dutch cattle and sheep. *Journal of Clinical Microbiology* 36, 878-882.
- Heuvelink, A.E., Van Den Biggelaar, F.L.A.M., Zwartkruis-Nahuis, J.T.M., Herbes, R.G., Huyben, R., Nagelkerke, N., Melchers, W.J.G., Monnens, L.A.H., De Boer, E., 1998c. Occurrence of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 on Dutch dairy farms. *Journal of Clinical Microbiology* 36, 3480-3487.
- Hutchison, M.L., Thomas, D.J.I., Walters, L.D., Avery, S.M., 2006. Shiga toxin-producing *Escherichia coli*, faecal coliforms and coliphage in animal feeds. *Letters in Applied Microbiology* 43, 205-210.
- Ingham, S.C., Fanslau, M.A., Engel, R.A., Breuer, J.R., Breuer, J.E., Wright, T.H., Reith-Rozelle, J.K., Zhu, J., 2005. Evaluation of fertilization-to-planting and fertilization-to-harvest intervals for safe use of noncomposted bovine manure in Wisconsin vegetable production. *Journal of Food Protection* 68, 1134-1142.
- Ishii, S., Ksoll, W.B., Hicks, R.E., Sadowsky, M.J., 2006. Presence and growth of naturalized *Escherichia coli* in temperate soils from lake superior watersheds. *Applied and Environmental Microbiology* 72, 612-621.
- Islam, M., Doyle, M.P., Phatak, S.C., Millner, P., Jiang, X., 2004. Persistence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in soil and on leaf lettuce and parsley grown in fields treated with contaminated manure composts or irrigation water. *Journal of Food Protection* 67, 1365-1370.
- Islam, M.A., Heuvelink, A.E., Talukder, K.A., Zwietering, M.H., De Boer, E., 2006. Evaluation of immunomagnetic separation and PCR for the detection of *Escherichia coli* O157 in animal feces and meats. *Journal of Food Protection* 69, 2865-2869.
- Johannessen, G.S., Loncarevic, S., Kruse, H., 2002. Bacteriological analysis of fresh produce in Norway. *International Journal of Food Microbiology* 77, 199-204.
- Kaneko, K.I., Hayashidani, H., Takahashi, K., Shiraki, Y., Limawongpranee, S., Ogawa, M., 1999. Bacterial contamination in the environment of food factories processing ready-to-eat fresh vegetables. *Journal of Food Protection* 62, 800-804.
- Kaper, J.B., Nataro, J.P., Mobley, H.L.T., 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology* 2, 123-140.
- Karch, H., Huppertz, H.I., Bockemuhl, J., Schmidt, H., Schwarzkopf, A., Lissner, R., 1997. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in Germany. *Journal of Food Protection* 60, 1454-1457.
- Karmali, M.A., 1989. Infection by verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews* 2, 15-38.
- Karmali, M.A., Petric, M., Lim, C., 1985. The association between idiopathic hemolytic uremic syndrome and infection by verotoxin-producing *Escherichia coli*. *Journal of Infectious Diseases* 151, 775-782.

- Kemmeren, J.M., Mangen, van Duynhoven Y.T.H.P and Havelaar, A.H., 2006. RIVM report 330080001: Priority setting of foodborne pathogens disease burden and costs of selected enteric pathogens.
- Klerks, M.M., 2007. Quantitative detection of *Salmonella enterica* and the specific interaction with *lactuca sativa*. PhD thesis, Wageningen University, the Netherlands.
- Konowalchuk, J., Speirs, J.I., Stavric, S., 1977. Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. *Infection and Immunity* 18, 775-779.
- Koohmaraie, M., Arthur, T.M., Bosilevac, J.M., Brichta-Harhay, D.M., Kalchayanand, N., Shackelford, S.D., Wheeler, T.L., 2007. Interventions to reduce/eliminate *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef. *Meat Science* 77, 90-96.
- Koseki, S., Isobe, S., 2005. Prediction of pathogen growth on iceberg lettuce under real temperature history during distribution from farm to table. *International Journal of Food Microbiology* 104, 239-248.
- Kudva, I.T., Blanch, K., Hovde, C.J., 1998. Analysis of *Escherichia coli* O157:H7 survival in ovine or bovine manure and manure slurry. *Applied and Environmental Microbiology* 64, 3166-3174.
- Kuhnert, P., Dubosson, C.R., Roesch, M., Homfeld, E., Doherr, M.G., Blum, J.W., 2005. Prevalence and risk-factor analysis of Shiga toxicogenic *Escherichia coli* in faecal samples of organically and conventionally farmed dairy cattle. *Veterinary Microbiology* 109, 37-45.
- LeBlanc, J.J., 2003. Implication of Virulence Factors in *Escherichia coli* O157:H7 Pathogenesis. *Critical Reviews in Microbiology* 29, 277-296.
- LeJeune, J.T., 2006. Preharvest control of *Escherichia coli* O157 in cattle. *Journal of Animal Science* 85: E73-80E
- LeJeune, J.T., Besser, T.E., Hancock, D.D., 2001. Cattle Water Troughs as Reservoirs of *Escherichia coli* O157. *Applied and Environmental Microbiology* 67, 3053-3057.
- Manning, S.D., Motiwala, A.S., Springman, A.C., Qi, W., Lacher, D.W., Quelette, L.M., Mladonicky, J.M., Somsel, P., Rudrik, J.T., Dietrich, S.E., Zhang, W., Swaminathan, B., Alland, D. and Whittam, T.S., 2008. Variation in virulence among clades of *Escherichia coli* O157:H7 associated with disease outbreaks. *PNAS* 105, 4868-4873
- Mora, A., Blanco, J.E., Blanco, M., Alonso, M.P., Dhahi, G., Echeita, A., Gonzalez, E.A., Bernandez, M.I., Blanco, J., 2005. Antimicrobial resistance of Shiga toxin (verotoxin)-producing *Escherichia coli* O157 : H7 and non-O157 strains isolated from humans, cattle, sheep and food in Spain. *Research in Microbiology* 156, 793-806.
- Mubiru, D.N., Coyne, M.S., Grove, J.H., 2000. Mortality of *Escherichia coli* O157:H7 in two soils with different physical and chemical properties. *Journal of Environmental Quality* 29, 1821-1825.
- Mukherjee, A., Speh, D., Diez-Gonzalez, F., 2007. Association of farm management practices with risk of *Escherichia coli* contamination in pre-harvest produce grown in Minnesota and Wisconsin. *International Journal of Food Microbiology* 120, 296-302.
- Mukherjee, A., Speh, D., Dyck, E., Diez-Gonzalez, F., 2004. Preharvest evaluation of coliforms, *Escherichia coli*, *Salmonella*, and *Escherichia coli* O157:H7 in organic and conventional produce grown by Minnesota farmers. *Journal of Food Protection* 67, 894-900.
- Mukherjee, A., Speh, D., Jones, A.T., Buesing, K.M., Diez-Gonzalez, F., 2006. Longitudinal microbiological survey of fresh produce grown by farmers in the upper midwest. *Journal of Food Protection* 69, 1928-1936.
- Natvig, E.E., Ingham, S.C., Ingham, B.H., Cooperband, L.R., Roper, T.R., 2002. *Salmonella enterica* serovar typhimurium and *Escherichia coli* contamination of root and leaf vegetables grown in soils with incorporated bovine manure. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 2737-2744.
- Nauta, M.J., Evers, E. G., Takumi, K. and Havelaar, A. H., 2001. Risk assessment of Shiga-toxin producing *Escherichia coli* O157 in steak tartare in the Netherlands. RIVM report 257851003/2001.
- Nicholson, F.A., Groves, S.J., Chambers, B.J., 2005. Pathogen survival during livestock manure storage and following land application. *Bioresource Technology* 96, 135-143.
- Nicholson, F.A., Hutchison, M. L., Smith, K. A., Keevil, C. W., Chambers, B. J. and Moore, A., 2000. A study on farm manure applications to agricultural land and an assessment of the risks of

- pathogen transfer into the food chain. A report to: The Ministry of Agriculture, Fisheries and Food.
- Nou, X., Rivera-Betancourt, M., Bosilevac, J.M., Wheeler, T.L., Shackelford, S.D., Gwartney, B.L., Reagan, J.O., Koohmaraie, M., 2003. Effect of Chemical Dehairing on the Prevalence of *Escherichia coli* O157:H7 and the Levels of Aerobic Bacteria and Enterobacteriaceae on Carcasses in a Commercial Beef Processing Plant. *Journal of Food Protection* 66, 2005-2009.
- O'Brien, A.D., Newland, J.W., Miller, S.F., 1984. Shiga-like toxin-converting phages from *Escherichia coli* strains that cause hemorrhagic colitis or infantile diarrhea. *Science* 226, 694-696.
- Ostroff, S.M., Griffin, P.M., Tauxe, R.V., Shipman, L.D., Greene, K.D., Wells, J.G., Lewis, J.H., Blake, P.A., Kobayashi, J.M., 1990. A statewide outbreak of *Escherichia coli* 0157:H7 infections in Washington State. *American Journal of Epidemiology* 132, 239-247.
- Parish, M.E., L.R. Beuchat, T.V. Suslow, L.J. Harris, E.H. Garrett, J.N. Farber, F.F. Busta, 2003. Methods to reduce/eliminate pathogens from fresh and fresh-cut produce (chapter IV). *Comprehensive reviews in food science and food safety* 2 (supplement), 161-173.
- Park, G.W., Diez-Gonzalez, F., 2003. Utilization of carbonate and ammonia-based treatments to eliminate *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* Typhimurium DT104 from cattle manure. *Journal of Applied Microbiology* 94, 675-685.
- Paton, J.C., Paton, A.W., 1998. Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. *Clinical Microbiology Reviews* 11, 450-479.
- Phillips, C.A., Harrison, M.A., 2005. Comparison of the microflora on organically and conventionally grown spring mix from a California processor. *Journal of Food Protection* 68, 1143-1146.
- Pierard, D., Stevens, D., Moriau, L., Lior, H., Lauwers, S., 1997. Isolation and virulence factors of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* in human stool samples. *Clinical Microbiology and Infection* 3, 531-540.
- Potter, A.A., Klashinsky, S., Li, Y.L., Frey, E., Townsend, H., Rogan, D., Erickson, G., Hinkley, S., Klopfenstein, T., Moxley, R.A., Smith, D.R., Finlay, B.B., 2004. Decreased shedding of *Escherichia coli* O157 : H7 by cattle following vaccination with type III secreted proteins. *Vaccine* 22, 362-369.
- Pradel, N., Livrelli, V., De Champs, C., Palcoux, J.B., Reynaud, A., Scheutz, F., Sirot, J., Joly, B., Forestier, C., 2000. Prevalence and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from cattle, food, and children during a one-year prospective study in France. *Journal of Clinical Microbiology* 38, 1023-1031.
- Reijs, J.W., Sonneveld, M.P.W., Sørensen, P., Schils, R.L.M., Groot, J.C.J., Lantinga, E.A., 2007. Effects of different diets on utilization of nitrogen from cattle slurry applied to grassland on a sandy soil in The Netherlands. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 118, 65-79.
- Reinders, R.D., Bijker, P.G.H., Huis In't Veld, J.H.J., Van Knapen, F., 2000. Use of 8-hydroxyquinoline-?-D-glucuronide for presumptive identification of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157. *Letters in Applied Microbiology* 30, 411-414.
- Reinders, R.D., Barna, A., Lipman, L.J.A., Bijker, P.G.H., 2002. Comparison of the sensitivity of manual and automated immunomagnetic separation methods for detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 in milk. *Journal of Applied Microbiology* 92, 1015-1020.
- Riley, L.W., Remis, R.S., Helgerson, S.D., 1983. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *New England Journal of Medicine* 308, 681-685.
- RIVM, 2007. Zoonoses and zoonotic agents in humans, food, animals and feed in the Netherlands 2003-2006. RIVM report 330152001.
- Rugbjerg, H., Nielsen, E.M., Andersen, J.S., 2003. Risk factors associated with faecal shedding of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 in eight known-infected Danish dairy herds. *Preventive Veterinary Medicine* 58, 101-113.
- Sagoo, S.K., Little, C.L., Ward, L., Gillespie, I.A., Mitchell, R.T., 2003. Microbiological study of ready-to-eat salad vegetables from retail establishments uncovers a national outbreak of salmonellosis. *Journal of Food Protection* 66, 403-409.
- Schimmer, B., Eriksen, H.M., Nygård, K., Grahek-Ogden, D., Madssen, T., Hajdu, A., LÃ, voll, O., Stavnes, T.L., Lassen, J., Kapperud, G., Aavitsland, P., 2006. An outbreak of haemolytic uraemic syndrome associated with minced beef, Norway, January-February 2006: preliminary

- report. Euro surveillance : bulletin europeïen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin. 11.
- Schouten, J.M., van de Giessen, A.W., Frankena, K., De Jong, M.C.M., Graat, E.A.M., 2005a. *Escherichia coli* O157 prevalence in Dutch poultry, pig finishing and veal herds and risk factors in Dutch veal herds. *Preventive Veterinary Medicine* 70, 1-15.
- Schouten, J.M., Bouwknegt, M., Van De Giessen, A.W., Frankena, K., De Jong, M.C.M., Graat, E.A.M., 2004. Prevalence estimation and risk factors for *Escherichia coli* O157 on Dutch dairy farms. *Preventive Veterinary Medicine* 64, 49-61.
- Schouten, J.M., Graat, E.A.M., Frankena, K., Van De Giessen, A.W., Van Der Zwaluw, W.K., De Jong, M.C.M., 2005b. A longitudinal study of *Escherichia coli* O157 in cattle of a Dutch dairy farm and in the farm environment. *Veterinary Microbiology* 107, 193-204.
- Sekse, C., Solheim, H., Urdahl, A.M., Wasteson, Y., 2008. Is lack of susceptible recipients in the intestinal environment the limiting factor for transduction of Shiga toxin-encoding phages? *Journal of Applied Microbiology* 105, 1114-1120.
- Semenov, A.V., 2008a. Ecology and modelling of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in cattle manure and soil. PhD dissertation, Wageningen University And Research Center.
- Semenov, A.V., Franz, E., Van Overbeek, L., Termorshuizen, A.J., Van Bruggen, A.H.C., 2008. Estimating the stability of *Escherichia coli* O157:H7 survival in manure-amended soils with different management histories. *Environmental Microbiology* 10, 1450-1459.
- Semenov, A.V., van Bruggen, A. H. C. and van Overbeek, L., 2008b. Influence of oxygen on survival and quantification of *Escherichia coli* O157:H7 in LB broth, farmyard manure and slurry Submitted to *FEMS Microbiology Ecology*.
- Semenov, A.V., van Bruggen, A. H. C., van Overbeek, L., Termorshuizen, A. J. and Semenov, A. M., 2007. Influence of temperature fluctuations on *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in cow manure. *FEMS Microbiology Ecology* 60, 419-428.
- Sheng, H.Q., Knecht, H.J., Kudva, I.T., Hovde, C.J., 2006. Application of bacteriophages to control intestinal *Escherichia coli* O157 : H7 levels in ruminants. *Applied and Environmental Microbiology* 72, 5359-5366.
- Sivapalasingam, S., Friedman, C.R., Cohen, L., Tauxe, R.V., 2004. Fresh produce: A growing cause of outbreaks of foodborne illness in the United States, 1973 through 1997. *Journal of Food Protection* 67, 2342-2353.
- Smith, C.J., Olszewski, A.M. and Mauro, S.A., 2009. Correlation of Shiga toxin gene frequency with commonly used microbial indicators of recreational water quality. *Applied and Environmental Microbiology* 75, 316-321.
- Soderstrom, A., Lindberg, A., Andersson, Y., 2005. EHEC O157 outbreak in Sweden from locally produced lettuce, August-September 2005. Euro surveillance : bulletin europeïen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin. 10.
- Solecki, O., MacRae, M., Ogden, I., Strachan, N., 2007. Can the high levels of human verocytotoxigenic *Escherichia coli* O157 infection in rural areas of NE Scotland be explained by consumption of contaminated meat? *Journal of Applied Microbiology* 103, 2616-2621.
- Solomon, E.B., Yaron, S., Matthews, K.R., 2002. Transmission of *Escherichia coli* O157:H7 from contaminated manure and irrigation water to lettuce plant tissue and its subsequent internalization. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 397-400.
- Strachan, N.J.C., Dunn, G.M., Locking, M.E., Reid, T.M.S., Ogden, I.D., 2006. *Escherichia coli* O157: Burger bug or environmental pathogen? *International Journal of Food Microbiology* 112, 129-137.
- Tauxe, R., Kruse, H., Hedberg, C., Potter, M., Madden, J., Wachsmuth, K., 1997. Microbial hazards and emerging issues associated with produce: A preliminary report to the National Advisory Committee on Microbiologic Criteria for Foods. *Journal of Food Protection* 60, 1400-1408.
- van Bruggen, A.H.C., Semenov, A.M., van Diepeningen, A.D., De Vos, O.J., Blok, W.J., 2006. Relation between soil health, wave-like fluctuations in microbial populations, and soil-borne plant disease management. *European Journal of Plant Pathology* 115, 105-122.
- Van de Kar, N.C.A.J., Monnens, L.A.H., Karmali, M.A., Van Hinsbergh, V.W.M., 1992. Tumor necrosis factor and interleukin-1 induce expression of the verocytotoxin receptor

- globotriaosylceramide on human endothelial cells: Implications for the pathogenesis of the hemolytic uremic syndrome. *Blood* 80, 2755-2764.
- Van Donkersgoed, J., Hancock, D., Rogan, D., Potter, A.A., 2005. *Escherichia coli* O157 : H7 vaccine field trial in 9 feedlots in Alberta and Saskatchewan. *Canadian Veterinary Journal-Revue Veterinaire Canadienne* 46, 724-728.
- Van Duynhoven, Y.T.H.P., De Jager, C.M., Heuvelink, A.E., Van der Zwaluw, W.K., Maas, H.M.E., Van Pelt, W., Wannet, W.J.B., 2002. Enhanced laboratory-based surveillance of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* O157 in the Netherlands. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 21, 513-522.
- van Duynhoven, Y.T.H.P., Friesema, I.H.M., Schuurman, T., Roovers, A., van Zwet, A.A., Sabbe, L.J.M., van der Zwaluw, W.K., Notermans, D.W., Mulder, B., van Hannen, E.J., Heilmann, F.G.C., Buiting, A., Jansen, R., Kooistra-Smid, A.M.D., 2008. Prevalence, characterisation and clinical profiles of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in The Netherlands. *Clinical Microbiology and Infection* 14, 437-445.
- van Duynhoven, Y.T.H.P., de Jager, C.M., Heuvelink, A.E., van der Zwaluw, W.K., Maas, H.M.E., van Pelt, W. and Wannet, W.J.B., 2004. Overzicht 2003. Intensieve surveillance van Shiga toxine-producerende *Escherichia coli* O157 in Nederland. *Infectieziektebulletin* 15, 251-257.
- Vanselow, B.A., Krause, D.O., McSweeney, C.S., 2005. The Shiga toxin-producing *Escherichia coli*, their ruminant hosts, and potential on-farm interventions: A review. *Australian Journal of Agricultural Research* 56, 219-244.
- Vidovic, S., Korber, D.R., 2006. Prevalence of *Escherichia coli* O157 in Saskatchewan cattle: Characterization of isolates by using random amplified polymorphic DNA PCR, antibiotic resistance profiles, and pathogenicity determinants. *Applied and Environmental Microbiology* 72, 4347-4355.
- Vosough Ahmadi, B., 2007. Cost-effectiveness of *Escherichia coli* O157:H7 control in the beef chain. PhD dissertation, Wageningen University And Research Center.
- Vosough Ahmadi, B., Velthuis, A.G.J., Hogeveen, H., Huirne, R.B.M., 2006. Simulating *Escherichia coli* O157:H7 transmission to assess effectiveness of interventions in Dutch dairy-beef slaughterhouses. *Preventive Veterinary Medicine* 77, 15-30.
- Vosough Ahmadi, B., Frankena, K., Turner, J., Velthuis, A.G.J., Hogeveen, H., Huirne, R.B.M., 2007. Effectiveness of simulated interventions in reducing the estimated prevalence of *E. coli* O157:H7 in lactating cows in dairy herds. *Veterinary Research* 38, 755-771.
- Wachtel, M.R., Whitehand, L.C., Mandrell, R.E., 2002. Association of *Escherichia coli* O157:H7 with preharvest leaf lettuce upon exposure to contaminated irrigation water. *Journal of Food Protection* 65, 18-25.
- Welinder-Olsson, C., Stenqvist, K., Badenfors, M., Brandberg, A., Floren, K., Holm, M., Holmberg, L., Kjellin, E., Marild, S., Studahl, A., Kaijser, B., 2004. EHEC outbreak among staff at a children's hospital - Use of PCR for verocytotoxin detection and PFGE for epidemiological investigation. *Epidemiology and Infection* 132, 43-49.
- Wells, J.G., Shipman, L.D., Greene, K.D., Sowers, E.G., Green, J.H., Cameron, D.N., Downes, F.P., Martin, M.L., Griffin, P.M., Ostroff, S.M., Potter, M.E., Tauxe, R.V., Wachsmuth, I.K., 1991. Isolation of *Escherichia coli* serotype O157:H7 and other Shiga-like-toxin-producing *E. coli* from dairy cattle. *Journal of Clinical Microbiology* 29, 985-989.
- Werber, D., Fruth, A., Liesegang, A., Littmann, M., Buchholz, U., Prager, R., Karch, H., Breuer, T., Tschalpe, H., Ammon, A., 2002. A multistate outbreak of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O26:H11 infections in Germany, detected by molecular subtyping surveillance. *Journal of Infectious Diseases* 186, 419-422.
- Wetzel, A.N., LeJeune, J.T., 2007. Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 strains that do not produce Shiga toxin from bovine, avian and environmental sources. *Letters in Applied Microbiology* 45, 504-507.
- Willshaw, G.A., Thirlwell, J., Jones, A.P., Parry, S., Salmon, R.L., Hickey, M., 1994. Vero cytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 in beefburgers linked to an outbreak of diarrhoea, haemorrhagic colitis and haemolytic uraemic syndrome in Britain. *Letters in Applied Microbiology* 19, 304-307.

- Younts-Dahl, S.M., Osborn, G.D., Galyean, M.L., Rivera, J.D., Loneragan, G.H., Brashears, M.M., 2005. Reduction of *Escherichia coli* O157 in finishing beef cattle by various doses of *Lactobacillus acidophilus* in direct-fed microbials. *Journal of Food Protection* 68, 6-10.
- Zhao, T., Tkalcic, S., Doyle, M.P., Harmon, B.G., Brown, C.A., Zhao, P., 2003. Pathogenicity of enterohemorrhagic *Escherichia coli* in neonatal calves and evaluation of fecal shedding by treatment with probiotic *Escherichia coli*. *Journal of Food Protection* 66, 924-930.