



Rijksinstituut voor Volksgezondheid  
en Milieu  
*Ministerie van Volksgezondheid,  
Welzijn en Sport*

**Kiemsurveillance van  
voedselgerelateerde ziekteverwekkers  
in Nederland: een inventarisatie**

RIVM rapport 330261005/2012

L.P.B. Verhoef et al.



Rijksinstituut voor Volksgezondheid  
en Milieu  
*Ministerie van Volksgezondheid,  
Welzijn en Sport*

## **Kiemsurveillance van voedselgerelateerde ziekteverwekkers in Nederland: een inventarisatie**

RIVM Rapport 330261005/2012

## Colofon

© RIVM 2012

Delen uit deze publicatie mogen worden overgenomen op voorwaarde van bronvermelding: 'Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu (RIVM), de titel van de publicatie en het jaar van uitgave'.

L.P.B. Verhoef  
W. van Pelt  
H. Sprong  
H.J.M. Aarts

Contact:  
H.J.M. Aarts  
Centrum voor Zoönose en Omgevingsmicrobiologie  
[henk.aarts@rivm.nl](mailto:henk.aarts@rivm.nl)

Dit onderzoek werd verricht in opdracht van Nederlandse Voedsel en Warenautoriteit, in het kader van project V/330261/01.

## Rapport in het kort

### **Kiemsurveillance van voedselgerelateerde ziekteverwekkers in Nederland: een inventarisatie**

Dit rapport beschrijft, voor een geselecteerde groep ziekteverwekkers waarbij voedsel in meer of mindere mate een rol speelt in de epidemiologie, een aantal aspecten van de huidige kiemsurveillance, oftewel ziektesurveillance door middel van typering van pathogenen, in Nederland. Bij de selectie van de virale, bacteriële en parasitaire ziekteverwekkers is rekening gehouden met ziektelast en kosten. De verschillende aspecten van de kiemsurveillance zijn per pathogeen beschreven in afzonderlijke hoofdstukken waarbij elk hoofdstuk is afgesloten met de lacunes in de huidige kiemsurveillance, het nut van typering voor besluitvorming in relatie tot de voedselveiligheid en een aantal conclusies. Dit rapport is mede gebaseerd op het eerder verschenen rapport *Surveillance van pathogenen in Nederland: Detailkarakterisering van pathogenen die relevant zijn voor de openbare gezondheidszorg* (1). Een aantal van de pathogenen is beschreven in beide rapporten.

Voorafgaand aan de inhoudelijke hoofdstukken wordt in een afzonderlijk hoofdstuk achtergrondinformatie gegeven met betrekking tot de toepassingsgebieden van kiemsurveillance voor de voedselveiligheid en een korte beschrijving van de meest gebruikte moleculaire typeringstechnieken en aanwezige (inter-)nationale databanken. Het rapport wordt vervolgens afgesloten met een samenvatting van de conclusies zoals getrokken in de verschillende afzonderlijke inhoudelijke hoofdstukken met aansluitend een algemene conclusie en aanbevelingen. De belangrijkste bevindingen uit het rapport met betrekking tot virussen is dat de bestaande surveillance van norovirus en hepatitis A-virus aanzienlijk bijgedragen aan de gedetailleerde beschrijving van de verspreiding van deze virussen, ook via voedsel. Voor een verbeterde bronopsporing is het wenselijk de kiemsurveillance te richten, vooral internationaal, op een groter genoom fragment dan momenteel wordt gehanteerd. Verder dat moleculaire typering op bredere schaal zou kunnen bijdragen aan de opheldering van de omvang van de rol van voedsel in de transmissie van enterovirussen, rotavirussen en hepatitis E-virus. Voor de verspreiding van sommige geselecteerde bacteriële ziekteverwekkers is de rol van voedsel niet altijd duidelijk, zoals voor *Methicilline*-resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Clostridium difficile* en *Coxiella*. Met betrekking tot *Coxiella* is het verder de vraag of (moleculaire) typering een belangrijke rol zal gaan spelen bij besluitvorming met betrekking tot voedselveiligheid. Een brede surveillance (voor onder andere *Salmonella* en *Campylobacter*), waarbij ook veterinaire, voedsel en omgevingsbronnen worden betrokken blijft noodzakelijk voor het epidemiologisch, transmissieonderzoek en attributieanalyse. De waarde van de huidige surveillance heeft zich al bewezen voor STEC. Voor *Listeria* zou moleculaire typering, zoals MLST (Multilocus Sequence Typing), de kiemsurveillance in velerlei opzicht kunnen verbeteren. Om sneller te kunnen ingrijpen in de voedselproductieketens is het wenselijk te kunnen beschikken over niet-kweekafhankelijke moleculaire detectiemethoden. Er vindt geen kiemsurveillance plaats voor de parasieten *Giardia intestinalis* en *Cryptosporidium parvum*. Voor alle parasieten is het gewenst humane en veterinaire typeringsgegevens te kunnen integreren omdat deze parasieten allemaal zoönotisch van aard zijn. Binnen het RIVM wordt gewerkt aan een typeringsmethode voor *Giardia*, *Cryptosporidium*, *Echinococcus* en *Toxoplasma gondii* ter ondersteuning van het attributieonderzoek.

Trefwoorden:

Voedselgerelateerde ziekteverwekkers, kiemsurveillance, moleculaire typering

## Abstract

### **Detailed surveillance of foodborne pathogens in the Netherlands: an inventory**

In this report the detailed surveillance (molecular typing) of food borne viruses, bacteria and parasites that present the greatest burden of disease and economic costs in the Netherlands are presented in separate chapters in a standardized way. Each chapter ends with a description of the shortcomings in the surveillance in place, the benefit of (molecular) typing in policymaking decisions concerning food safety and some conclusions. For part, this report is based on a previously published report by Boot (2006) entitled: *Surveillance van pathogenen in Nederland: Detailkarakterisering van pathogenen die relevant zijn voor de openbare gezondheidszorg* (1). Some pathogens are discussed in both reports. The report starts with a description of the various fields of application of detailed surveillance, the most used molecular typing methods and the available databases and infrastructures both at the national and international level. This report ends with a summary of the conclusions drawn in the various chapters and subsequently with a general conclusion and recommendations.

#### Some key findings:

- For norovirus and hepatitis A-virus the role of food in their transmission is obvious. The use of longer sequences will facilitate the tracing of a common food source.
- Molecular typing on a broader scale would make it feasible to determine the exact role of food in the transmission of enterovirus, rotavirus and hepatitis E-virus.
- The role of food in the transmission of Methicilline resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Clostridium difficile* and *Coxiella* is unclear. Furthermore, for *Coxiella*, it is doubtful whether (molecular) typing will be useful in food safety decision making.
- Comprehensive surveillance that includes veterinary, food and environmental sources will be necessary for epidemiological, transmission and attribution studies.
- Surveillance proved its benefit for STEC. For *Listeria*, molecular typing techniques, like Multilocus Sequence Typing (MLST), would improve the current surveillance significantly.
- The introduction of non-culture based molecular techniques would facilitate earlier interventions in food production.
- No surveillance is in place for *Giardia intestinalis* and *Cryptosporidium*. Integration of human and veterinary monitoring data is, due to the zoonotic aspect, needed for all parasites. Typing methods for *Cryptosporidium*, *Echinococcus* and *Toxoplasma gondii* are under development.

#### Keywords:

food-borne pathogens, surveillance, molecular typing

Inhoud

Samenvatting—7

**1 Inleiding—9**

**2 Achtergrondinformatie—13**

2.1 Toepassingen van kiemsurveillance voor de voedselveiligheid—13

2.1.1 Detectie van diffuse uitbraken en bronopsporing—13

2.1.2 Attributie—13

2.1.3 Biotracering—13

2.1.4 Zoönotische transmissie—14

2.2 Typeringsmethoden—14

2.2.1 Sero- en faagtypering—14

2.2.2 PFGE—14

2.2.3 PCR-sequencing—15

2.2.4 MLST—15

2.2.7 Nieuwe ontwikkelingen—15

2.3.1 Nederland—17

2.3.2 Internationaal—18

**3 Virussen—21**

3.1 Enterovirussen—21

3.2 Hepatitis A-virus—26

3.3 Hepatitis E-virus—30

3.4 \*potentieel3.4 Norovirus—33

3.5 Rotavirus—39

**4 Bacteriën—43**

4.1 *Campylobacter* spp.—43

4.2 *Clostridium difficile*—47

4.3 *Coxiella burnetii*—51

4.4 Shiga toxineproducerende *Escherichia coli* (STEC)—56

4.5 *Listeria monocytogenes*—62

4.6 *Salmonella* spp.—67

4.7 Methicilline resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA)—72

**5 Parasieten—75**

5.1 *Echinococcus granulosus*—75

5.2 *Echinococcus multilocularis*—79

5.3 *Giardia lamblia* en *Cryptosporidium* spp.—82

5.4 *Toxoplasma gondii*—85

5.5 *Trichinella spiralis*—87

**6 Conclusies en aanbevelingen—91**

Lijst van afkortingen—97

**7 Literatuur—101**



## Samenvatting

Voedselinfecties vormen nog steeds een groot probleem met jaarlijks bijna 700.000 gevallen van gastro-enteritis en honderden andere ziektegevallen. Voor de bestrijding van voedseloverdraagbare infecties is kiemsurveillance, onmisbaar, onder andere bij het detecteren van diffuse uitbraken, attributievraagstukken, zoönotische transmissie en bij het vaststellen van pathogene eigenschappen. Dit rapport behandelt – voor een selectie van virussen, bacteriën en parasieten, die in meer of mindere mate door voedsel worden overgedragen – een aantal belangrijke aspecten met betrekking tot de huidige kiemsurveillance. Dit zijn onder andere de stand van zaken van de huidige kiemsurveillance, welke typeringsmethoden worden toegepast, wat de kosten zijn van de huidige kiemsurveillance, de relevantie voor de volksgezondheid en het nut voor de besluitvorming in voedselveiligheid.

Wat betreft virussen hebben de bestaande surveillance van norovirus en hepatitis A aanzienlijk bijgedragen aan de gedetailleerde beschrijving van de verspreiding van deze virussen, ook via voedsel. Voor een verbeterde bronopsporing van het norovirus is het wenselijk de kiemsurveillance te richten, vooral internationaal, op een groter genoom fragment dan momenteel wordt gehanteerd. Hoewel bewezen voor hepatitis E, is de rol van voedsel in de verspreiding van hepatitis E, rotavirus en enterovirussen anders dan via besmet water onduidelijk. Systematische monitoring en moleculaire typering kunnen hierover uitsluitsel geven.

Voor tijdige signalering en adequate bestrijding van uitbraken van *Salmonella* en *Campylobacter* is het noodzakelijk dat het huidige surveillanceprogramma gehandhaafd blijft. De toepassing van niet-kweekafhankelijke typeringsmethoden zou een sneller en efficiënter ingrijpen in de voedselproductieketen mogelijk maken. De waarde van de huidige STEC-kiemsurveillance heeft zich al bewezen. Hoewel er nog steeds aandachtspunten zijn voor verbetering. De kiemsurveillance van *Listeria* is in velerlei opzicht gebaat bij de toepassing van de moleculaire typeringstechniek MLST. Naast bovengenoemde bacteriën worden in dit rapport een aantal bacteriën (MRSA, *Clostridium difficile* en *Coxiella burnetti*) besproken waarvan de rol van voedsel minder evident is. Voor *Coxiella* is het tevens twijfelachtig of typering zal bijdrage aan de besluitvorming betreffende voedselveiligheid.

Ook met betrekking tot parasieten geldt dat moleculaire typering noodzakelijk is voor het vaststellen van de relatieve bijdrage van de verschillende transmissieroutes en de daaraan verbonden risico's. Voor alle parasieten is het gewenst humane en veterinaire typeringsgegevens te kunnen integreren vanwege het feit dat deze parasieten allemaal zoönotisch van aard zijn. Binnen het RIVM wordt gewerkt aan een typeringsmethode voor *Giardia*, *Cryptosporidium*, *Echinococcus* en *Toxoplasma gondii* ter ondersteuning van het attributie-onderzoek.



**De volgende personen werkten mee aan de totstandkoming van dit rapport:**

Dr. H.G.A.M. van der Avoort (RIVM), dr. B.H.B. van Benthem (RIVM), dr. M. Bouwknecht (RIVM), dr. A. de Bruin (RIVM), dr. Ir. E. Duizer (RIVM), dr. A. van der Ende (RBM/AMC), dr. E. Franz (RIVM), dr. I.H.M. Friesema (RIVM), dr. A.W. van de Giessen (RIVM), dr. J.W.B. van der Giessen (RIVM), M. Heck (RIVM), Prof. dr. ir. A. Havelaar (RIVM), drs. M. Hensgens (LUMC), dr. ir. A.E. Heuvelink (NVWA), dr. X.W. Huijsdens (RIVM), dr. I. Janse (RIVM), prof. dr. M.P.G. Koopmans (RIVM), drs. L.M. Kortbeek (RIVM), dr. A. Kroneman (RIVM), dr. E.J. Kuijper (LUMC), dr. A.J. de Neeling (RIVM), dr. D.W. Notermans (RIVM), dr. W. van Pelt (RIVM), ing. J.H.J. Reimerink (RIVM), dr. B.J. van Rotterdam (RIVM), dr. S.A. Rutjes (RIVM), dr. F.M. Schets (RIVM), dr. H. Sprong (RIVM), dr. H. Vennema (RIVM), dr. ir. L.P.B. Verhoef (RIVM)

## 1 Inleiding

Voedselinfecties vormen nog steeds een groot probleem met jaarlijks bijna 700.000 gevallen van gastro-enteritis en honderden andere ziektegevallen (kompas 2006, <http://www.nationaalkompas.nl/gezondheidsdeterminanten/omgeving/milieu/voedsel/gezondheidsverlies-door-microbiologische-ziekteverwekkers-in-voedsel/>). Voor een adequate bestrijding van deze voedselinfecties zijn verbeterde inzichten in de epidemiologie van voedselinfecties noodzakelijk. Kiemsurveillance (= fenotypische en/of genotypische detailkarakterisering van het pathogeen volgend op de primaire diagnostiek) van pathogene micro-organismen uit patiënten en uit de voedselketen draagt hieraan bij en kan worden toegepast bij onderstaande vraagstellingen:

1. Detectie van diffuse uitbraken en bronopsporing  
Primair wordt uitgegaan van humane isolaten en wordt gezocht naar het voorkomen van verwante typen in een bepaalde periode en/of regio/locatie. Waar mogelijk wordt gezocht naar het voorkomen van dezelfde typen in voedsel of de omgeving.
2. Attributie  
Door het vergelijken van patiënt-isolaten met isolaten uit een representatieve steekproef uit voedsel en dieren wordt op grond van type-overeenkomsten geschat welke humane gevallen geassocieerd zijn met welke bronnen, i.e. voedsel(dieren). Idealiter toont dit de relatieve rol van bronnen met betrekking tot de humane gevallen en kan dit over de tijd tonen of een interventie in de voedselketen effect heeft gehad.
3. Biotracering  
Bij biotracering wordt op basis van informatie over de typen die op voedsel worden aangetroffen een uitspraak gedaan over de waarschijnlijkheid van verschillende besmettingsbronnen in de keten.
4. Zoönotische transmissie  
Bij deze toepassing wordt vastgesteld of pathogenen potentieel zoönotisch zijn.
5. Pathogeen-eigenschappen  
Hierbij wordt gekeken naar de 'ziekteverwekkende' eigenschappen van een pathogeen. Door gebruik te maken van verdergaande (moleculaire) karakterisering.

Iedere toepassing stelt eigen eisen aan de beschikbaarheid van stammen uit diverse bronnen, de mate van discriminatie van de typeringsmethoden en aan de data-analyse. Deze worden op hoofdlijnen beschreven.

In dit rapport wordt voor de belangrijkste voedselgeassocieerde pathogene organismen beschreven welke typeringsmethoden beschikbaar en in ontwikkeling zijn, en welke (inter)nationaal al worden gebruikt voor bronopsporing en tracering. Daarbij is ook aandacht voor mogelijkheden om in de toekomst typering in perifere laboratoria uit te voeren. Ook wordt geïnventariseerd voor welke organismen bewakingsprogramma's en diagnostiek routinematig worden uitgevoerd inclusief typering. Dit wordt vergeleken met de gewenste data zodat inzicht ontstaat in noodzakelijke aanvullende inspanningen. In afzonderlijke hoofdstukken wordt dit beschreven voor de relevante virale, bacteriële en parasitaire ziekteverwekkers, dit in relatie tot voedselveiligheid. De in dit rapport opgenomen ziekteverwekkers zijn vermeld in Tabel 1. Deze zijn geselecteerd op basis van ziektelast en kosten en de rol van voedsel in de epidemiologie. Dit rapport is mede gebaseerd op het eerder verschenen rapport *Surveillance van pathogenen in Nederland: Detailkarakterisering van pathogenen die relevant zijn voor de openbare gezondheidszorg* (1). Een aantal van de pathogenen beschreven in dit rapport zijn ook beschreven in het rapport van Boot et al., 2006 (1) omdat zinvolle toepassingen binnen het domein van de voedselveiligheid alleen ontwikkeld kunnen worden in samenhang met humane surveillance. Deze pathogenen zijn in Tabel 1 aangegeven met een \*.

Tabel 1: Overzicht van de incidentie, ziektelast (DALY), kosten (op basis van Nationaal Kompas, gegevens 2009), de aanwezigheid van een database bij het RIVM en het voorkomen van clusters van de in dit rapport beschreven pathogenen.

	Inci- dentie <sup>1</sup>	DALY <sup>1</sup>	Kosten <sup>1</sup> (M€)	% voedsel	Database binnen RIVM	Clus- ters
<b>Virussen</b>						
Enterovirussen*		NA	NA	6	√	
Hepatitis A-virus*	860	140	NA	11	√	√
Hepatitis E-virus*	53	24	NA	13	√	
Rotavirus*	370.000	1600	36	13	√	
Norovirus*	590.000	1400	35	17	√	√
<b>Bacteriën</b>						
<i>Campylobacter spp.</i>	88.000	3000	30	43	√	
<i>Clostridium difficile</i> *		NA	NA	NA	√	√
<i>Coxiella burnettii</i>		NA	NA	0		
<i>Escherichia coli</i> (STEC) O157* Non-O157	2800	150 NA	9	40	√	√
<i>Listeria monocytogenes</i> *	79	110	3	70	√	√
<i>Salmonella spp.</i> *	33.000	1200	10	55	√	√
<i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)*		NA	NA	0		
<b>Parasieten</b>						
<i>Cryptosporidium parvum</i> ?)	55.000	100	5	12	√	
<i>Echinococcus granulosus</i> *		NA	NA		√	
<i>E. multilocularis</i> *		NA	NA			
<i>Giardia intestinalis</i> * (lamblia)	110.000	180	16	13	√	
<i>Toxoplasma gondii</i> *	810	3700	NA	56		
<i>Trichinella spiralis</i> *		NA	NA			

<sup>1</sup> totaal van alle blootstellingsroutes (voedsel, milieu, mens, dier en reizen)

\* pathogeen ook beschreven in het rapport van Boot et al., 2006(1)



## 2 Achtergrondinformatie

### 2.1 Toepassingen van kiemsurveillance voor de voedselveiligheid

#### 2.1.1 *Detectie van diffuse uitbraken en bronopsporing*

Door de toegenomen globalisering van de voedselmarkt over de laatste jaren, is het aannemelijk dat een partij voedsel geproduceerd wordt in één land, en geconsumeerd in verschillende andere landen. Wanneer tijdens het productieproces contaminatie van voedsel optreedt, kan dit resulteren in de zogeheten 'diffuse uitbraken'. Dit zijn uitbraken door een gemeenschappelijke bron die niet direct gelinkt hoeven te zijn aan tijd en plaats, en die een internationaal karakter kunnen hebben. Dit soort uitbraken vraagt andere maatregelen dan de lokale uitbraken, waar bijvoorbeeld een geïnfecteerde voedselbereider de oorzaak van contaminatie is. De identificatie van internationale links tussen uitbraken is lastig, en kiemsurveillance gecombineerd met epidemiologisch onderzoek draagt bij aan de bronopsporing. Wanneer een besmet product herkend wordt, kan deze van de markt gehaald worden om volgende infecties te voorkomen. Wanneer een fout in de productie procedure achterhaald wordt, kan hierop worden ingegrepen om volgende gevallen van contaminatie-events te voorkomen. Door gebruik te maken van moleculaire typering kan een betere schatting verkregen worden van het deel van de infecties met een onbekende transmissieroute dat mogelijk aan voedsel toe te schrijven zijn (2-4). Door gebruik te maken van genotype profielen is het bijvoorbeeld mogelijk gebleken om contaminatie aan het begin van de voedselketen, i.e. broncontaminatie, te onderscheiden van contaminatie aan het eind van de voedselketen, i.e. besmetting door een voedselbereider (3). Dit is een relevant verschil, daar deze routes verschillende interventie maatregelen vragen.

#### 2.1.2 *Attributie*

Het doel van bronattributie is het kwantificeren van de bijdrage van verschillende bronnen van besmetting aan de totale ziektelast veroorzaakt door een bepaald pathogeen bij de mens. Hierbij speelt het gebruik van moleculaire typeringsdata een steeds belangrijkere rol. Wiskundige en statistische modellen worden in deze methodologie gebruikt om de humaan gevonden genotypen te vergelijken met genotypen in de verschillende bronnen van besmetting, waarbij rekening gehouden wordt met onzekerheid over het pathogeen en de transmissieroutes en onzekerheid van de methoden. Deze kunnen voortkomen uit een onderrepresentatie van de natuurlijke diversiteit van een pathogeen in de respectievelijke reservoirs. Bijvoorbeeld door een gelimiteerd aantal monsters, door onvolledige stabiliteit van het type langs de transmissieroute, door onvoldoende onderscheidend vermogen van de typeringsmethode, door onzekerheid in de wiskundige modellen, et cetera. Moleculaire methoden kunnen bijdragen aan een vermindering van deze onzekerheid, hetgeen een verbeterde schatting van de attributieve fracties tot gevolg heeft. Dit kan leiden tot een verbeterde prioritering bij het nemen van preventieve maatregelen om de totale ziektelast terug te dringen.

#### 2.1.3 *Biotracering*

Biotracering omvat alle methoden waarbij gebruikgemaakt wordt van informatie aan het einde van de productieketen om grondstoffen, processen of activiteiten binnen een bepaalde voedselketen te identificeren als een mogelijke bron van microbiële besmetting (5). Deze methoden dienen ter ontwikkeling van een toolbox om meer inzicht te verkrijgen ten behoeve van de productie van veilig voedsel. Specifieke onderdelen van zo'n toolbox zijn detectie-, kwantificering- en (geno-)typeringsmethoden. Moleculaire

methoden nemen door hun hoge resolutie en snelheid hierin een steeds belangrijkere plaats in. Moleculaire data dragen bij aan inzicht in de biologische dynamiek en karakteristieken van de microbiologische contaminatie in bepaalde voedselketens, zoals overleving, groei en resistentie. Deze data kunnen gebruikt worden als input van wiskundige modellen, waarmee bronopsporing in voedselketens bewerkstelligd kan worden. Het uiteindelijke doel hiervan is het verlagen van de blootstelling aan contaminatie en daarmee het risico voor de mens.

#### 2.1.4 *Zoönotische transmissie*

Een zoönose is een infectieziekte die direct of indirect wordt overgedragen van dier naar mens. Naast direct contact met dieren speelt de consumptie van dierlijk voedsel (rauwe vis en rauw vlees) en besmet voedsel (ongewassen groente en fruit) hierbij een belangrijke rol. Eetgewoontes hebben een grote invloed op het voorkomen van zoönosen. Van een groot aantal ziekteverwekkers is onbekend of (en hoe vaak) zij van dierlijke oorsprong zijn. Typische voorbeelden zijn *Giardia*, *Cryptosporidium* en hepatitis E-virus. Onderzoek naar het zoönotisch potentieel van pathogenen is vergelijkbaar met bronattributie. Hierbij worden de bijdragen van pathogenen afkomstig van verschillende diersoorten gekoppeld aan het voorkomen van deze pathogenen bij de mens. Moleculaire typering van isolaten afkomstig van mensen en dieren is onmisbaar daar er niet of nauwelijks morfologische verschillen zijn tussen niet-zoönotische en potentieel zoönotische typen van een soort. Een zoönose is niet per definitie een ziekteverwekker van dier(soort)en wat betekent dat sommige ziekteverwekkers niet routinematig worden gediagnosticeerd door dierenartsen. Zoönosen kunnen vaak tussen verschillende dier(soort)en overgedragen worden, bijvoorbeeld tussen wild en landbouwhuisdieren en tussen landbouwhuisdieren en huisdieren. Voor risicoanalyses is het belangrijk om inzicht in deze reservoirs te hebben wat alleen mogelijk is bij een systematische aanpak.

#### 2.1.5 *Pathogeen-eigenschappen*

Isolaten kunnen, naast het gebruik van typeringdata, gekarakteriseerd worden op basis van biologisch significante genen die gerelateerd zijn aan bijvoorbeeld 'ziekteverwekkende' eigenschappen. Dit is mogelijk doordat er steeds meer sequentiedata en geavanceerde technieken beschikbaar komen zoals *whole genome sequencing* en *microarray*-analyse. De virologie loopt hierop voor, ten opzichte van de bacteriologie en de parasitologie waarbij dit nog sterk in ontwikkeling is.

## 2.2 **Typeringsmethoden**

### 2.2.1 *Sero- en faagtypering*

De klassieke typeringsmethoden serotypering en faagtypering zijn voor onder andere *Salmonella*, *E. Coli* en *Listeria* nog steeds de standaard methode. Sero- en faagtypering zijn fenotypische methoden, wat niet altijd het genotype van een organisme weergeeft of de genetische afstand tot andere typen. Hierdoor kan deze vorm van typeren minder geschikt zijn als epidemiologische marker. Serotypering is gebaseerd op serum dat reageert met oppervlakteantigenen. Kruisreactie is een probleem dat vaak voorkomt bij het gebruik van serotypering, waardoor een aanvullende test nodig kan zijn. Faagtypering is het identificeren van stammen binnen een bacteriesoort op grond van hun gevoeligheid voor bepaalde bacteriofagen. Zowel voor sero- als faagtypering geldt dat de ontwikkeling, toepassing en kwaliteitscontrole arbeidsintensief zijn en afhankelijk van ervaren laboranten (6).

### 2.2.2 *PFGE*

Pulsed Field Gel Electroforese (PFGE) is een methode waarbij het DNA van een organisme wordt geknipt met een enzym dat maar enkele knipplaatsen in het DNA herkent, waardoor een klein aantal grote DNA-fragmenten ontstaan. Deze fragmenten worden vervolgens gescheiden op een agarose-gel waardoor een uniek bandenpatroon

wordt verkregen, de zogenoemde fingerprint. De methode is bewerkelijk en heeft een lange doorlooptijd. PFGE wordt vaak gezien als de gouden standaard moleculaire typeringsmethode van bacteriële voedselpathogenen zoals *Salmonella*, *E. coli* en *Listeria* en gebruikt voor het verder differentiëren van sero- en faagtypen. PFGE wordt gebruikt als standaard methode in het PulseNet-programma voor het identificeren van wijdverspreide voedselgerelateerde uitbraken (7).

### 2.2.3 *PCR-sequencing*

Bij polymerase chain reaction (PCR) wordt een specifiek nucleïnezuurfragment vanaf een DNA-matrijs in grote hoeveelheden gerepliceerd. RNA-monsters moeten hiervoor eerst worden omgezet in copy-DNA (cDNA) door middel van reverse transcriptase. Het is een manier om een kleine hoeveelheid DNA of RNA aan te tonen, en wordt vaak gebruikt in situaties waarbij andere methoden te weinig sensitief zijn. Hiermee is het bij uitstek een geschikte methode voor detectie van virussen in voedselbronnen, aangezien virussen niet kunnen repliceren buiten de gastheer en daardoor in lage doses aanwezig zijn in voedsel. Het PCR-product kan op verschillende manieren worden onderzocht, waaronder de meest gedetailleerde DNA-sequentiebepaling.

### 2.2.4 *MLST*

Multilocus Sequence Typing (MLST) is een veel toegepaste genotypische typeringsmethode die gebaseerd is op de DNA-sequentievariatie tussen allelen van voornamelijk huishoudgenen. Het grote voordeel van deze methode is de ontwikkelingen in het laboratorium die parallel zijn verlopen met inspanningen op het gebied van standaardisatie, software (freeware zoals eBURST) en datatoegankelijkheid via internet. Veelal betreft het langzaam veranderende genen (huishoudgenen) waardoor de typeringsmethode minder geschikt is voor epidemiologische doeleinden en zijn toepassing meer vindt in populatie-genetica en -dynamica (6).

### 2.2.5 *MLVA*

Multilocus Variable number tandem repeat (VNTR) Analysis (MLVA) is een genotypische typeringsmethode op PCR gebaseerd. MLVA maakt gebruik van variatie in repetitief DNA, als gevolg van een deletie of insertie. Deze variatie wordt gemeten door verschil in lengte van het repetitief DNA-deel. De langere repetitieve delen kunnen worden weergegeven door middel van agarose gel-electroforese; voor de kortere delen kan bijvoorbeeld massaspectrometrie inzicht geven. Repetitief DNA komt voornamelijk bij bacteriën voor. Een nadeel van deze typeringsmethode kan zijn dat de mutatiesnelheid in het repetitieve deel groot is, waardoor deze binnen een uitbraak kan veranderen en epidemiologische koppeling bemoeilijkt wordt (6).

### 2.2.6. *Welke typeermethode is geschikt?*

Er bestaat niet zoiets als een voor elke toepassing ideale universele typeermethode. De methode moet voldoen aan een aantal prestatiekenmerken zoals stabiliteit, typerend vermogen, discriminerend vermogen, epidemiologische concordantie en reproduceerbaarheid. Daarnaast zijn er enkele 'gemaks'kenmerken, zoals flexibiliteit, snelheid, gebruikersgemak, kosten en toegankelijkheid van de data van belang. Deze zijn uitvoerig besproken in (6).

### 2.2.7 *Nieuwe ontwikkelingen*

#### **Whole-genome sequencing**

Het genoom vertegenwoordigt de gehele genetische informatie van een organisme. Aangezien sequencing steeds goedkoper en sneller wordt (8) zal het gebruik van hele genomen voor vergelijking van pathogenen binnen afzienbare tijd tot de mogelijkheden behoren. Een probleem hierbij kan zijn de opslagcapaciteit en rekenvermogen van



huidige databases, die hier nog niet altijd op berekend zijn en de bio-informatische analyse die ingewikkelder wordt. Whole-genome-sequencing levert per definitie het hoogst mogelijke niveau van resolutie, maar kan ook een signaal verdunnen, doordat grote regio's van het genoom geconserveerd zijn, en kleine regio's hypervariabel (9). De informatie van het hele genoom kan echter gebruikt worden om de variabele delen te lokaliseren, om bijvoorbeeld van nut te zijn voor SNP-genotyping.

### **SNP-genotyping**

Door het steeds groter aantal bacteriële genomen dat is gesequenced wordt SNP (Single Nucleotide Polymorphism) analyse steeds vaker toegepast om bacteriestammen te karakteriseren en om onderscheid te maken tussen stammen(10). SNP-genotypering is gericht op het identificeren van nucleotides die variabel zijn binnen een populatie, en die gelokaliseerd zijn op bekende locaties binnen het genoom. In essentie is MLST een SNP-genotypingsmethode.

### **Micro-array voor detectie en typering**

DNA Microarray-analyse is een platform waarbij het mogelijk is om in één experiment meerdere pathogenen dan wel meerdere genen binnen een organisme te detecteren. Microarrays bestaan uit een drager waarop vele probes (~100-10.000) zijn aangebracht. Voor typeringsdoeleinden worden onder andere arrays gebruikt waarop probes zijn aangebracht voor herkenning van organismespecifieke genen of variabele sequenties in universele genen, zoals ribosomale RNA-genen. Daarnaast is het mogelijk inzicht te krijgen in het repertoire van genen met een biologische significantie zoals antibiotica-resistentie, virulentie en stress-responsgenen.

### **Nieuwe analyse methoden**

Met de groeiende datasets qua aantallen en lengte van sequenties neemt ook de behoefte aan nieuwe analysemethoden toe. De toenemende technologische ontwikkelingen bieden steeds meer mogelijkheden voor de toepasbaarheid van nieuwe rekenmethoden. Een bekend voorbeeld is fylogenie, waarbij de genetische afstand tussen pathogenen inzichtelijk wordt gemaakt. Hierbij worden aannames gedaan ten aanzien van, onder andere, de evolutiesnelheid of evolutiemodel. Afhankelijk van de gekozen rekenmethode en omvang van de dataset kan de analyse enkele minuten tot weken of maanden in beslag nemen. In toenemende mate worden fylogenetische en epidemiologische data gekoppeld geanalyseerd, wat tot nieuwe inzichten kan leiden. Een minder bekend voorbeeld is phylodynamica (11) waarbij op basis van bayesiaanse analyses bekeken wordt in hoeverre de diversiteit van een pathogeen invloed heeft op, of beïnvloed wordt door, immuniteit, transmissie en epidemieën.

## 2.3 Databases en infrastructuur

### 2.3.1 Nederland

**OSIRIS.** In OSIRIS worden alle (humaan) aangifteplichtige ziektes gemeld. De voor dit rapport relevante ziektes/pathogenen betreffen *Listeria*, STEC, Hepatitis A, *Salmonella Typhi*, *S. Paratyphi* A, B en C en MRSA buiten de ziekenhuisclusters. Alle meldingen worden vervolgens via TESSY gemeld aan de European Center for Disease Control (ECDC) en komen daar in de jaarrapportages met de andere EU-landen, de voor voedsel relevante pathogenen worden ook aan de EFSA gerapporteerd en komen ook hier in hun jaarrapportages tezamen met die uit voedsel en landbouwhuisdieren. Gastro-enteritis-verwekkers worden daarnaast jaarlijks afzonderlijk gepubliceerd in de gastro-enteritisnotitie en in het Infectieziekten Bulletin, in MARAN en de zoönoses daaronder jaarlijks in de Staat van zoönosen. Uitbraken worden vaak apart gepubliceerd, met name indien deze een grensoverschrijdende component bevat. Meldingen van voedselinfecties en -vergiftigingen worden in Nederland via twee grotendeels gescheiden routes geregistreerd. De instanties die meldingen registreren zijn de NVWA en de GGD'en. De NVWA heeft een warenklachtenlijn waar onder andere meldingen van consumenten met betrekking tot voedselinfecties of voedselvergiftigingen binnenkomen. Meldingen worden periodiek via het door het RIVM ontwikkelde online informatiesysteem OSIRIS ingevoerd. Het RIVM analyseert jaarlijks de gegevens. De resultaten van deze analyse vormen een belangrijk onderdeel van de jaarlijkse rapportage *Registratie voedselinfecties en -vergiftigingen bij de Inspectie voor de Gezondheidszorg en Voedsel en Waren Autoriteit*. De tweede registratieroute van voedselinfecties en -vergiftigingen loopt via de GGD'en. Behandelend artsen zijn volgens de Infectieziektewet verplicht voedselinfecties te melden aan de GGD'en. De GGD'en verzamelen deze meldingen en geven deze continu via OSIRIS door aan het RIVM. De gegevens verkregen via OSIRIS worden ook jaarlijks geanalyseerd en beschreven in de bovengenoemde jaarrapportage. Hoewel deze data geschikt zijn voor epidemiologische analyses, zijn de betreffende data moeilijk te koppelen aan laboratoriumgegevens als moleculaire typeringsdata. Dit, omdat in OSIRIS anoniem gemeld moet worden vanwege de privacy. Er lopen verschillende projecten om deze koppeling van verschillende databronnen beter te laten verlopen.

**Laboratorium Surveillance Infectieziekten (LSI).** Binnen het LSI-project worden wekelijks gegevens verzameld over bacteriële ziekteverwekkers vanuit zestien voormalige streeklaboratoria met de aan hun historisch gelieerde laboratoria. Tegenwoordig betreft dit vrijwel uitsluitend *Campylobacter*, maar ook *Salmonella* wordt hieronder gerekend. Resultaten worden gepubliceerd in het Infectieziekten bulletin, jaarlijkse Gastro-enteritis-notitie, Staat van de zoönoses, MARAN-rapportage, EFSA- en ECDC- (TESSY) jaarrapportages en verwerkt in tijdschriftpublicaties.

**Type-Ned.** Type-Ned is een initiatief om moleculaire typering binnen Nederland te structureren. Het principe van Type-Ned bestaat uit het uitvoeren van uniforme typering door enkele Typeerlaboratoria die hun data naar de centrale database van het Centrum Infectieziektebestrijding (CIb) sturen. De Typeerlaboratoria ontvangen hiertoe isolaten of klinische monsters uit diverse ziekenhuizen in de regio. Voor het virologiedeel van Type-Ned is een pilot gestart met zes medische microbiologische laboratoria voor het sharen van norovirus maar ook entero- en parechovirus-sequenties, inclusief een kleine set klinische en epidemiologische data.

**Moleculair platform.** Het moleculair platform is een initiatief van het RIVM dat bedoeld is om een gebruikersvriendelijke generieke database-infrastructuur te ontwikkelen voor bestaande en toekomstige moleculaire surveillance. Het functioneert zowel op nationaal als op internationaal niveau. Er wordt uitgegaan van een flexibel prototype platform, dat

aangepast kan worden qua wensen voor specifieke pathogenen waarvoor lab-netwerken bestaan. De verschillende componenten voor het totale platform zijn in de vorm van modules onderverdeeld. Tot nu toe zijn zes extern toegankelijke databases ingericht en opgeleverd, drie voor virussequenties (norovirusuitbraken, hepatitis A-cases en influenza-cases), twee voor VNTR-profielen van bacteriën (MRSA en TBC), een voor MLST-sequenties van een parasiet (*Giardia*), als voorbeelden van zeer verschillende pathogenen met internationale en nationale gebruikersnetwerken. De gewenste functionaliteiten zijn in samenspraak met het Type-Ned netwerk opgesteld. Databases voor andere pathogenen zijn in ontwikkeling.

Ook worden binnen het moleculair platform diverse typeringstools ontwikkeld voor sequence based typing (met als pilot-organismen NoV, HAV, Enterovirussen en *Giardia*) en voor MLVA-typering (met MRSA als pilot). Deze tools zijn bedoeld om de functie als referentielaboratorium te ondersteunen, door gestandaardiseerde nomenclatuur toe te kennen op basis van gegevens die in laboratoria buiten het CIB worden gegenereerd. De NoV en enterovirus typeringstools staan online, en de MRSA-typeringstool zal binnenkort worden opgeleverd. In 2011 zijn typeringstools ontwikkeld voor *Giardia* en enterovirussen. Deze laatste is breed opgezet en bevat alle picornaviridae, waardoor deze ook voor HAV-typering gebruikt kan worden. De verschillende databases zijn gelinkt aan de corresponderende typingtools zodat alle gesubmitte sequenties getypeerd worden. Dit geldt voor norovirus, *Giardia*, enterovirus en hepatitis A.

Het moleculair platform is continu in ontwikkeling. Momenteel worden de mogelijkheden voor analyse en visualisatie van de data in de typeringdatabases uitgebreid. Al aanwezig zijn een verheffingenanalyse, een best match-analyse voor sequenties, een fylogenetische analysemodule, een geo-module (in testfase) voor visualisatie van query- en analyseresultaten via kaarten, dendrogrammen en clusteringsdiagrammen.

**Lokale databases.** Projectmatig vindt opbouw van lokale databases plaats. Voorbeelden hiervan zijn hepatitis A en hepatitis E. De database van hepatitis A is oorspronkelijk gestart als vierjarig project in Amsterdam van 2001 tot 2004. Na afloop van het project is de database overgenomen door het RIVM. In een tweejarig project van 2008 tot 2010 is deze database weer systematisch aangevuld op basis van geïntensiveerde moleculaire surveillance. In de overige perioden is de database bijgehouden op basis van reguliere surveillance. Voor hepatitis E lopen diverse projecten voor de verzameling van sequenties bij mensen, varkens en in de omgeving.

### 2.3.2 Internationaal

**PulseNet Europe.** PulseNet Europe is opgericht in 2004 in het kader van het FP 6 network of excellence *Med-Vet-Net* met als belangrijkste doelstelling het opzetten van een realtime moleculair surveillance databasesysteem voor de detectie van infectieclusters en uitbraakonderzoek voor *Salmonella*, STEC en *Listeria* in Europa. De gebruikte typeringmethode is PFGE, welke is gestandaardiseerd door PulseNet USA.

**Zoopnet.** Zoopnet is een Europese database (ook vanuit Med-Vet-Net opgericht), waarbij humane en veterinaire data van *Cryptosporidium* en *Giardia* zijn samengebracht met als doelstelling: (i) het harmoniseren van moleculaire methodes voor detectie en het onderscheiden van humane en niet-humane pathogenen, (ii) het opzetten dan wel in stand houden van collecties van DNA en cysten/oocyten *Giardia* en *Cryptosporidium*, (iii) het faciliteren van validatiestudies binnen de deelnemende laboratoria, (iv) het identificeren van een panel van onderscheidende markers (species, genotype en subtype) en (v) het ontwikkelen van een online database.

**Food Borne Viruses in Europe en NoroNet.** Het Food Borne Viruses in Europe (FBVE) netwerk is een netwerk van virologen en epidemiologen in dertien Europese landen dat

bestaat sinds 1999. Het netwerk deelt surveillance (eerst FBVE, later DIVINE-net) en onderzoeksdata (eerst FBVE, later EVENT) van voedselgerelateerde virussen, en was daarbij in eerste instantie vooral gericht op norovirus. In een latere fase kwam daar in toenemende mate de verzameling van hepatitis A-data bij. De database van het FBVE-netwerk is opgenomen in het moleculair platform. Inmiddels is FBVE samengevoegd met NoroNet.

**EFSA en ECDC (onder andere het Food and Waterborn Disease (FWD) network).**

OSIRIS- en LSI-meldingen komen op patiëntniveau via TESSY in de database bij het ECDC. Op geaggregeerd niveau komen zij in de jaarrapportages van ECDC en EFSA, in de laatste tezamen met die uit voedsel en landbouwhuisdieren. Een deel van de informatie wordt ook gerapporteerd aan de WHO en de OIE. Dit geldt niet alleen voor sporadische infecties maar ook voor geregistreerde voedsel- en watergerelateerde explosies. Vooral nog zijn deze netwerken vooral gericht op bacteriële infecties.



## 3 Virussen

### 3.1 Enterovirussen<sup>1</sup>

#### Auteurs

Dr. ir. L.P.B. Verhoef (RIVM), dr. H.G.A.M. van der Avoort (RIVM), dr. S.A. Rutjes (RIVM), dr. ir. E. Duizer (RIVM) en prof. dr. M.P.G. Koopmans (RIVM)

#### Inleiding

Enterovirussen (non-polio) zijn geassocieerd met een groot aantal verschillende acute ziektebeelden als meningitis, encefalitis, respiratoire aandoeningen, blaasjes, myocarditis, en conjunctivitis, maar ook met persisterende infecties als cardiomyopathie en diabetes mellitus. De ernst van het ziektebeeld verschilt zeer. Ongeveer 80% van de infecties verloopt subklinisch, maar bij pasgeborenen kan het ziektebeeld zeer ernstig, en soms dodelijk zijn. Enterovirussen volgen de oro-fecale infectieroute. De voornaamste besmettingsroute is via persoon-op-persoon-transmissie of via water. Besmetting via voedsel komt voor, zoals blijkt uit anekdotische rapportages. Van de kleine fractie infecties waarin de besmettingroute bekend is, blijkt een deel verbonden aan recreatieve activiteiten buitenshuis, zoals zwemmen in natuurwater. Af en toe worden uitbraken gerapporteerd die te maken hebben met fecaal verontreinigd recreatiewater of met schelpdieren die met enterovirussen besmet zijn (12), maar dit wordt niet systematisch onderzocht. Sinclair et al. (13) hebben het aantal waterborne disease outbreaks veroorzaakt door virussen geïnventariseerd; zij vonden in de periode 1950-2006 55 van zulke uitbraken, 26 waren gerelateerd in zwemmen in oppervlaktewater, 28 aan zwemmen in zwembaden en 1 aan recreatie in een fontein. Drie van de oppervlaktewater-gerelateerde uitbraken werden veroorzaakt door enterovirussen (*Coxsackie* en *Echo*). Dat is ook lastig vanwege de lange incubatietijd en langdurige uitscheiding van enterovirussen. Door de globalisering van de voedselmarkt is een diffuse uitbraak door met enterovirussen besmet voedsel denkbaar, en af en toe gerapporteerd (12, 14).

Voedsel is tot op heden sporadisch beschreven als mogelijke bron, en wordt in Nederland niet systematisch nagevraagd, waardoor weinig bekend is over de omvang van transmissie via voedsel.

#### Relevantie van de kiemsurveillance voor de volksgezondheid en potentiële interventie maatregelen

Er bestaat geen therapie of gerichte interventie bij non-polio-enterovirusinfecties. Effectiviteit van antivirale middelen voor behandeling van EV-infectie is niet bewezen. Diagnostiek wordt vaak aangevraagd als onderdeel van de differentiaaldiagnose bij polio, andere neurologische klachten, of een sepsis-achtig ziektebeeld bij jonge kinderen. Bij een aantal ernstige ziektebeelden wordt, zodra de diagnose enterovirusinfectie gesteld is, gestopt met toediening van antibiotica. Goede hygiëne is momenteel de enig aangewezen maatregel om de uitbreiding van viruscirculatie in een gezin, ziekenhuis of kinderdagverblijf te stoppen.

<sup>1</sup> Op basis van RIVM rapport 240031001/2006 *Surveillance van pathogenen in Nederland*, hoofdstuk 4.7 door dr. H.G.A.M. van der Avoort (RIVM)

Door de afwezigheid van een behandelmethodede van mogelijk ernstige aandoeningen, is herkenning van clusters en een gemeenschappelijke bron des te belangrijker. Met de opkomst van moleculaire typeringstechnieken behoort bronopsporing tot de mogelijkheden van de nabije toekomst. Het verkrijgen van inzicht in de enterovirus-populatie die in Nederland voorkomt is hiervoor een eerste vereiste.

### **Huidige kiemsurveillance**

Enterovirussen in patiënten: EV-diagnostiek gebeurt in 22 diagnostische laboratoria, waarvan 66/22 moleculair testen. Bij een aantal ziektebeelden is detectie van het virus of delen daarvan dicht bij de infectiehaard gebruikelijk: liquor bij neurologische ziektebeelden, blaasjes of traanvocht bij aantasting van huid of oog. Serotype-specifieke serologie is vanwege de grote verscheidenheid aan virustypen, de genetische en antigene variabiliteit binnen serotypen, de gebleken kruisreactiviteit en het voorkomen van vele asymptomatische infecties weinig geschikt voor diagnostische doeleinden of onderzoek naar transmissieroute of bij bronopsporing

Er zijn momenteel twee surveillancesystemen die inzicht geven in het voorkomen van enterovirussen, en daarmee is de kiemsurveillance dekkend voor geheel Nederland.

Eenzijds worden via de virologische weekstaten tussen de 700 en 1200 enterovirusinfecties bij patiënten gemeld vanuit de diagnostische laboratoria. Anderzijds wordt, in het kader van het polio-eradicatieprogramma van de WHO, systematisch feces getest in de perifere laboratoria op aanwezigheid van enterovirussen. De uitkomst hiervan wordt naar het RIVM gerapporteerd. Het RIVM voert de genotypering en rioolwatersurveillance uit.

Enterovirussen in water: Ten behoeve van de drinkwaterproductie worden op projectbasis metingen in het oppervlaktewater uitgevoerd op diverse innamepunten maar niet regulier bij bijvoorbeeld grensovergangen. Drinkwaterbedrijven die drinkwater maken van oppervlaktewater moeten met behulp van een risicoanalyse bepalen of het water voldoet aan de wettelijke risico-eis die stelt dat per jaar minder dan 1 op 10.000 personen een infectie mag oplopen door consumptie van ongekookt drinkwater. Omdat de enterovirusconcentratie in drinkwater te laag is om direct te kunnen bepalen, wordt de concentratie bepaald in het oppervlaktewater dat wordt ingenomen voor de productie van drinkwater, en wordt de efficiëntie van de zuivering bepaald. Aan de hand van deze gegevens wordt de concentratie in het drinkwater berekend en kan het infectierisico geschat worden. Drinkwaterbedrijven moeten deze risicoschatting elke drie jaar opnieuw uitvoeren, en dus ook elke drie jaar opnieuw de kwaliteit van het innamewater bepalen. Bij de sporadisch gerapporteerde uitbraken door met afvalwater besmet oppervlaktewater blijkt dat recreatie een mogelijke risicofactor is (1, 15).

Enterovirussen in voedsel: Puntmetingen wijzen uit dat enterovirus in schelpdieren kunnen worden aangetroffen. Er vindt geen surveillance plaats voor enterovirussen in voedsel.

### **Responsetijd van huidige kiemsurveillance**

De responsetijd voor routine enterovirusdiagnostiek varieert tussen de een en veertien dagen en is sterk afhankelijk van de methodiek, van de concentratie van het virus in het patiëntenmonster, van het serotype van het enterovirus, van de wijze waarop de diagnostiek wordt uitgevoerd, en van de urgentie van de vraag. Bij acute vraag is de aanwezigheid van enterovirussen of een deel daarvan (antigeen/RNA) binnen 24 uur vast te stellen. Voor het aantonen van enterovirussen in monsters uit riool of oppervlaktewater is twee dagen extra tijd nodig, aangezien er een (> honderdvoudige) concentratiestap nodig is alvorens detectie kan starten. Genotypering wordt gedaan door sequentie-analyse, hiervoor is routinematig ongeveer een week nodig, bij emergencies kan dit binnen twee dagen.

## Isolaten

**Humaan:** Tot eind jaren '80 was de collectie van isolaten systematisch inclusief epidemiologische achtergrondgegevens, aangezien de primaire diagnostiek tot die tijd door het RIVM werd uitgevoerd. Vanaf eind jaren '80 is deze afhankelijk van de monsters en isolaten die de perifere laboratoria insturen. De procedure van bewaren van isolaten bij de perifere laboratoria verschilt per laboratorium. Op verzoek van het RIVM worden isolaten bewaard, en zijn de isolaten en achtergrondinformatie opvraagbaar voor verder onderzoek. Het RIVM ontvangt van 10/22 laboratoria de isolaten van positieve kweek, om deze te typeren. Van 4/22 laboratoria ontvangt het RIVM feces, voor enterovirusbepaling en typering. De overige 6 laboratoria gebruiken moleculaire typeringstechnieken en rapporteren de sequenties aan het Moleculair Platform. Bij het RIVM worden isolaten, fecesmonsters en sequenties uit feces en water opgeslagen.

**Voedsel:** Er is geen systematische collectie van voedsel voor detectie van enterovirussen.

**Water:** Er is geen systematische collectie van isolaten uit water. Wel worden systematisch enterovirusconcentraties bepaald in oppervlaktewater wat gebruikt wordt voor drinkwaterproductie. Deze virusdetectie gebeurt met behulp van een zogenoemde plaqueassay, waarbij de plaques wel getypeerd zouden kunnen worden. In de praktijk gebeurt dit echter niet, omdat dit voor de vraagstelling niet van belang is.

## Typering

Volgens de klassieke typering werden de typen ingedeeld op basis van de groeimogelijkheden op cellijnen, en met neutralisatietesten met type-specifieke antisera. De klassieke typering levert onvoldoende informatie voor het kunnen koppelen van patiënten, en is alleen mogelijk indien een opvallend type gevonden wordt. Momenteel wordt moleculaire typering op basis van homologie meer en meer toegepast. In die gevallen waar typering om medische, wetenschappelijke of epidemiologische redenen gewenst is, en de typering in het perifere laboratorium niet mogelijk is, worden typering op het RIVM uitgevoerd. Dit gebeurt bijvoorbeeld bij persisterende infecties, of wanneer bronopsporing wenselijk is in het geval van clusters van patiënten. De moleculaire typering met sequentie is beter geschikt dan serotypering voor bronopsporing en verkrijgen van inzicht in de viruspopulatie die in Nederland voorkomt, en de variatie binnen typen. Omdat verwacht wordt dat moleculaire typering in de toekomst vaker gebruikt zal worden heeft het RIVM een typeringstool ontwikkeld, in samenwerking met het CDC Atlanta. Deze tool kan door laboratoria over de hele wereld gebruikt worden om op uniforme wijze namen of nummers toe te kennen aan typen. Bij veel voorkomende typen wordt ook gekeken naar recombinatie als marker voor een mogelijke link tussen patiënten.

## Databases

In de virologische weekstaten worden de resultaten van typering maandelijks gerapporteerd. In het Moleculair Platform voert een deel van de laboratoria sequentiedata in. De verwachting is dat vanaf 2011 een groter deel van de laboratoria meer sequentiedata zal kunnen aanleveren, wanneer een geschikte PCR-methode naar de laboratoria toe gecommuniceerd zal worden. Momenteel wordt door het RIVM, in samenwerking met CDC, bepaald welk fragment en welke lengte van de sequentie informatief is voor public health doeleinden.

## Presentatie van gegevens

1. Terugrapportage van diagnostiek.
2. Wetenschappelijke publicaties in het kader van promotieonderzoek en bij bijzondere bevindingen in samenwerking met perifere laboratoria.
3. Terugrapportage van moleculair platform.



### **Acties**

Wanneer een cluster gevonden wordt in bijvoorbeeld een kinderdagverblijf, worden hygiëne-maatregelen genomen. Aangezien geen therapie mogelijk is van de (soms ernstige) enterovirus gerelateerde ziekten, is preventie van infectie wenselijk, bijvoorbeeld door bronopsporing en eliminatie. Om de waarschijnlijkheid van een link te kunnen bepalen, is inzicht nodig in de viruspopulatie die in Nederland voorkomt. Dit zal met de komst van het Moleculair Platform vanaf 2010 mogelijk worden.

### **Geschatte kosten van de huidige kiemsurveillance**

De kosten voor de kiemsurveillance van enterovirusinfecties uit fecesmonsters vallen onder de poliovirus-surveillance. Alle virologische laboratoria werken hieraan, op verzoek van de IGZ, vrijwillig mee. Het aanleveren van surveillancedata voor poliovirus-isolaties uit andere bronnen via weekstaten is geheel afhankelijk van de bereidwilligheid van de perifere laboratoria. De kosten voor extra typeringen van om klinische, epidemiologische of wetenschappelijke redenen belangrijke isolaten en analyse van de data worden geschat op € 30.000. Hierin is de bereiding van de unieke RIVM-typeringsreagentia, het beheer van de historische collectie en van de RIVM-celkweekfaciliteit en de celbank nog niet meegenomen.

### **Lacunes in huidige kiemsurveillance**

De afhankelijkheid van de bereidwilligheid van de 22 laboratoria voor het aanleveren van data is de grootste lacune: de weekstaten zijn zelden compleet (gemiddeld 70%). Met de recente invoering van het nieuwe meldingssysteem zijn in principe extra mogelijkheden geschapen voor het aanleveren van epidemiologische data rondom specifieke ziektebeelden en/of verwekkers. De deelname van de laboratoria is en blijft zonder verplichting.

### **Nut van typering voor besluitvorming in voedselveiligheid**

We hebben nauwelijks aanwijzing dat voedsel een rol speelt bij enterovirus-infecties. De leeftijd waarop deze infecties voorkomen doet vermoeden dat de voornaamste verspreidingsroute fecaal-oraal is. Toch kan het in vervuild water voorkomen, waardoor het theoretisch mogelijk is dat diffuse uitbraken door met enterovirus besmet voedsel plaatsvinden.

Uit typering blijkt echter dat er grote regionale verschillen zijn in het voorkomen van de varianten. In Azië circuleren bijvoorbeeld varianten van enterovirus, die in Europa niet voorkomen. Het is mogelijk dat deze via voedsel worden geïmporteerd in Europa. Aangezien er geen behandeling mogelijk is van infecties door enterovirussen, en deze virussen ernstige ziekte kunnen veroorzaken bij jonge kinderen, is preventie van infectie wenselijk. De opkomst van moleculaire typering zal hierbij een belangrijke rol kunnen spelen. Vanwege gebrek aan achtergrondinformatie van de enterovirus-populatie in Nederland is het momenteel nog lastig te bepalen in welke mate het vinden van een gerelateerde stam iets zegt over een gemeenschappelijke bron, en of voedsel daarin een rol van betekenis speelt. De moleculaire typering zal vanaf 2011 in toenemende mate ingevoerd worden in Nederland. Hiermee zal mogelijk inzicht verkregen kunnen worden in de mate waarin voedselgerelateerde besmettingen een rol spelen.

### **Conclusies**

Enterovirus-typering wordt in toenemende mate uitgevoerd in medisch microbiologische laboratoria (MML's), en er is een centrale database op het RIVM. Omdat er geen gerichte behandelingsmethoden zijn, en overdracht van de verschillende enterovirussen op gelijkwaardige wijze (fecaal-oraal) plaatsvindt, is het belang van kiemsurveillance voor de openbare gezondheidszorg beperkt, maar wordt bronopsporing met behulp van kiemsurveillance des te belangrijker om ziektegevallen te kunnen voorkomen. Met de komst van het Moleculair Platform zal duidelijk kunnen worden welke typen in Nederland van belang zijn, en of mogelijk clusters veroorzaakt worden door een

gemeenschappelijke bron. De rol van voedsel in de verspreiding van enterovirussen is nog onduidelijk en zou nader moeten worden onderzocht.

<b>Mogelijke toepassingen van moleculaire typering in surveillance van enterovirus</b>	
Detectie van (diffuse) uitbraken	Ja*
Bronattributie van sporadische gevallen	Onbekend
Tracering in voedselketen	Onbekend
In kaart brengen van (zoönotische) transmissie-routes	Ja
Pathogeen-eigenschappen: (niet-)zoönotische typen, verschillen in pathogeniciteit	Ja

*\*via onderzoek*

## 3.2 Hepatitis A-virus<sup>2</sup>

### Auteurs

Dr. ir. L.P.B. Verhoef (RIVM), dr. H. Vennema (RIVM), dr. ir. E. Duizer (RIVM) en prof. dr. M.P.G. Koopmans (RIVM)

### Inleiding

Onderzoek bij de GGD Amsterdam heeft de basis gelegd voor moleculaire typering van hepatitis A-virus (HAV) stammen in Nederland. Daaruit is afgeleid dat bepaalde – onderling verschillende – transmissiecycli worden gevonden tussen homoseksuele mannen en reizigers naar HAV-endemische gebieden, hoewel dit onderscheid niet absoluut is (16-18). Daarnaast zijn er met enige regelmaat voorbeelden van transmissie van hepatitis A via voedsel of water (19, 20). De kans hierop neemt toe met afnemende immuniteit in de bevolking, hoewel verspreiding van hepatitis A met goede en tijdige hygiënische maatregelen te bestrijden is. Besmetting van voedsel kan zowel tijdens de productie als tijdens de bereiding plaatsvinden. Door de globalisering van de voedselmarkt bestaat de kans op internationale uitbraken door een gemeenschappelijke bron, vooral wanneer besmetting vroeg in de voedselketen optreedt. De voedselbron wordt met de gebruikelijke bron- en contactsporing zelden gevonden vanwege de lange incubatietijd van twee tot zes weken.

De klinische attack rate is vooral bij kinderen laag. Bij ouderen neemt de fractie symptomatisch geïnfecteerden en de kans op een ernstig ziekbeeld toe. Effectieve vaccins voor HAV zijn beschikbaar. Deze worden gebruikt indien (verwachte) expositie optreedt, zoals reizen naar endemische gebieden, en bij bepaalde risicoberoepen zoals homoseksuelen. Algemene vaccinatie wordt op dit moment niet nodig gevonden vanwege de afnemende incidentie en de veronderstelde lage kosteneffectiviteit van algemene vaccinatie (21). Vaccinatie is ook nog preventief na blootstelling, dus vroeg opsporen van patiënten is nuttig.

### Relevantie van de kiemsurveillance voor de volksgezondheid en potentiële interventie maatregelen

De ernst van infectie met HAV neemt toe naarmate de infectie op latere leeftijd wordt opgelopen. Recente analyse van de serosurvey *Pieter 2* op basis van een representatieve steekproef van de Nederlandse bevolking laat zien dat de seroprevalentie in Nederland afneemt (22). Gezien de grootte van de gevoelige populatie in Nederland is het risico van (grootschalige) voedsel- en watergerelateerde HAV-infecties en uitbraken zeker aanwezig en mogelijk toenemend. Vaccinatie tegen HAV is effectief en resulteert in ten minste 25 jaar bescherming, en vermoedelijk levenslang. Dreigende ziekte tijdens een uitbraak is na expositie nog te voorkomen met vaccinatie, aangezien het menselijk lichaam eerder reageert op het vaccin (direct) dan op het virus (twee tot zes weken) (23). Omdat landelijke pre-exposure vaccinatie niet wordt overwogen is veiligheid van voedsel en andere omgevingsbronnen cruciaal. Bronopsporing is mogelijk door het verkregen inzicht in de diversiteit van de HAV-varianten die nationaal en internationaal voorkomen. Tevens is het belangrijk te noemen dat Nederland veel producten importeert uit gebieden met een intermediaire HAV-prevalentie.

### Huidige kiemsurveillance

Hepatitis A in patiënten: De diagnostische laboratoria melden IgM-positief bevonden patiënten aan GGD'en volgens de meldingsplicht. De GGD registreert deze meldingen in

<sup>2</sup> Op basis van RIVM rapport 240031001/2006: *Surveillance van pathogenen in Nederland*, hoofdstuk 4.1 door dr. M. Koopmans (RIVM), dr. Y van Duynhoven (RIVM) en dr. S. Bruisten (GGD A'dam)

OSIRIS. Het betreft ongeveer tweehonderd gevallen per jaar in Nederland. In het geval van kleine uitbraken, die meestal binnen gezinnen plaatsvinden, wordt ook wel feces verzameld, omdat dit niet invasief is. De diagnostische laboratoria voeren over het algemeen geen (moleculaire) typering uit. De kiemsurveillance is begonnen bij de GGD Amsterdam maar is daar afgebouwd vanwege beëindiging van een onderzoeksproject. Ten behoeve van vragen betreffende mogelijke bronnen en verspreiding van HAV is de moleculaire typering overgenomen door het RIVM.

Momenteel wordt incidenteel op basis van vragen vanuit de GGD'en typering uitgevoerd in het kader van bronopsporing. GGD Zuid-Holland-West is gestart met een landelijk project waarbij gekeken wordt naar risicogroepen voor HAV-infectie in Nederland, en maakt daarbij gebruik van gegevens die gerapporteerd worden in OSIRIS en typeringdata van het RIVM. Deze systematische moleculaire surveillance van ziektegevallen met een onbekende bron in Nederland is succesvol gebleken, en heeft geleid tot de identificatie van semi-gedroogde tomaten als mogelijk gemeenschappelijke bron van uitbraken in drie verschillende landen (20, 24). Eind 2010 is deze aanpak weer gestopt. Wel wordt op aanvraag hepatitis A-typering gedaan, meestal ten behoeve van clusteronderzoek voor de GGD.

Hepatitis A in voedsel: Er is geen sprake van reguliere monitoring van voedsel. Wanneer bij een uitbraak aan voedsel gedacht wordt, wordt bronopsporing gedaan door de NVWA samen met de GGD en het RIVM. Als een voedselbron verdacht is, is deze vaak niet meer te achterhalen omdat de infectie twee tot zes weken na consumptie tot uiting komt. Bij de NVWA worden schelpdieren gemonitord, waarbij ook met regelmaat HAV gedetecteerd wordt.

Hepatitis A in water: Er is geen sprake van reguliere monitoring van oppervlaktewater voor recreatie en drinkwaterproductie bijvoorbeeld op overheidsmeetpunten bij de grensovergangen van grote rivieren of andere belangrijke toegangsgebieden zoals (lucht)havens.

### **Responsetijd van huidige kiemsurveillance**

Op basis van de serologische diagnostiek kan de medische behandeling en vaccinatie al afdoende worden gehandeld. Voor verdere typering is over het algemeen geen spoed nodig. Indien gevraagd (indicatie GGD) kan binnen een tot twee weken het resultaat van moleculaire typering geleverd worden, bij spoedaanvragen sneller (een tot twee dagen). Het RIVM en de NVWA kunnen ook HAV in voedsel detecteren en typeren. Detectie van HAV in water vindt plaats bij het RIVM.

### **Isolaten**

HAV is niet of moeilijk kweekbaar, en daarom is er geen systematische biobank. Wel worden materialen van HAV positieve patiënten (serum, feces) en RNA en sequenties bewaard bij het RIVM. Voor de sequenties en achtergrondgegevens wordt een internationale database beheerd die is ontwikkeld in het kader van door de EU gefinancierde projecten.

### **Typering**

De mogelijkheden voor typering en de keuze voor de gewenste typeringsmethode is afhankelijk van het niveau van endemiciteit van HAV. In hoog endemische gebieden wordt vaak een dominant circulerend genotype gevonden, terwijl in laag endemische landen (zoals Nederland) de diversiteit van de gevonden virussen groter is doordat ze vanuit verschillende bronnen worden geïntroduceerd (bijvoorbeeld reizigers). Moleculaire typering gebeurt door middel van PCR en sequencing, waarbij in internationaal verband is onderzocht welke delen van het genoom geschikt zijn voor typering. Bij moleculaire typering met als doel de herkomst van de stam te bepalen kan worden volstaan met een

korte sequentie. Echter, om overdracht via bijvoorbeeld voedsel van in Nederland circulerende HAV-stammen te kunnen vaststellen, is een gedetailleerder niveau van typering nodig door langere sequenties te bepalen. Het is mogelijk hele genomen van HAV te verkrijgen om hier onderzoek naar te doen, maar momenteel wordt dit niet gedaan omdat hier geen geld voor beschikbaar is.

### **Databases**

In het Europese onderzoeksproject EVENT, dat inmiddels is beëindigd, is een database voor HAV ontwikkeld. Deze database wordt opgenomen in het Moleculair Platform, waar voor Nederland vooral het RIVM aan rapporteert, aangezien overige laboratoria niet typeren. De typeringstool voor staat gepland voor 2012 om beschikbaar te komen via het moleculair platform.

### **Presentatie van gegevens**

1. Terugrapportage van typering aan inzender.
2. Internationaal worden gegevens periodiek en op aanvraag teruggerapporteerd.

### **Acties**

Bij bijzonderheden met mogelijk internationale consequenties wordt gebruikgemaakt van een actieve, internationale e-maillijst die gebruikt kan worden als 'rapid alert system'. Daarmee worden ook de Rapid Alert System for Food and Feed (RASFF-)meldingen onder de aandacht gebracht waarvoor uitwisseling van data wenselijk is ten behoeve van bronopsporing.

Bij uitbraken in Nederland wordt een vragenlijst afgenomen in het kader van bronopsporing. Verder wordt contactonderzoek verricht, en de mogelijk blootgestelde personen worden gevaccineerd. Dit is opgenomen in de richtlijnen van LCI.  
(<http://www.rivm.nl/cib/infectieziekten-A-Z/infectieziekten/HepatitisA/index.jsp>)

### **Geschatte kosten van de huidige kiemsurveillance**

HAV in patiënten (RIVM): per jaar € 27.000 voor kiemsurveillance op ingestuurde HAV-monsters. Aanvullend is voor actieve surveillance, implementatie en onderhoud van de genotyperingmethode op jaarbasis ongeveer € 30.000 nodig.

### **Lacunes in huidige kiemsurveillance**

Om een basis te ontwikkelen voor zinvolle kiemsurveillance in het kader van bronopsporing is het nodig om een representatieve steekproef van HAV-varianten uit patiënten die in Nederland worden gediagnosticeerd te typeren. Deze informatie dient als achtergrond voor eventuele onderzoeken naar gerelateerde cases. De steekproef is niet volledig random, gezien de dominantie van de nazomerpiek ten gevolge van reizigersverkeer in het najaar. Verhoudingsgewijs zullen van deze seizoenspiek minder stammen getypeerd worden. Voor de surveillance zal via de werkgroep klinische virologie gevraagd worden om deelname. Op jaarbasis worden binnen het RIVM maximaal circa 150 stammen getypeerd.

In verband met de lange incubatieperiode is een voedselbron lastig traceerbaar. Als de voedingsbron al gevonden wordt, is detectie van virussen in voedsel gecompliceerd, waardoor enerzijds een negatieve test weinig zegt, en anderzijds weinig bekend is over de achtergrond viruspopulatie in voedsel. Aangezien HAV een stabiel virus is met weinig mutaties, is een langere sequentie nodig om uitbraken aan elkaar te linken, en om uitbraken aan een gemeenschappelijke voedselbron te linken. Internationaal worden nog steeds kortere sequenties gedetecteerd, wat het identificeren van internationale links bemoeilijkt. Identificatie van een voedselbron zal om deze redenen afhankelijk blijven van een combinatie van epidemiologische en moleculaire gegevens, en gebaat zijn bij een algoritme met evidence-based indicatoren, zoals dubbelinfecties ten gevolge van contaminatie via rioolwater.

**Nut van typering voor besluitvorming in voedselveiligheid**

Genotypering van HAV is relevant voor de openbare gezondheidszorg omdat er verschillende transmissieroutes zijn, er een toenemend cohort onbeschermden mensen is en preventie/interventie mogelijk is. Genotypering is hierbij een essentiële techniek voor bron- en contactopsporing en wordt structureel gedaan door het RIVM.

**Conclusies**

De huidige kiemsurveillance is in het kader van voedselveiligheid nuttig om voort te zetten want de stabiliteit van het virus maakt bronopsporing mogelijk, en er is sprake van een toenemend cohort onbeschermden mensen. Genotypering is hierbij een essentiële techniek voor bron- en contactopsporing en wordt structureel gedaan door het RIVM. Een representatief aantal HAV-stammen zal op jaarbasis door het RIVM geanalyseerd worden en als referentiemateriaal gebruikt worden voor bron- en contactopsporing. Op basis van moleculaire clusters van patiënten met een onbekende bron in Nederland zal gerichte bronopsporing mogelijk worden waarbij ook verdacht voedsel getest kan worden. Aangezien internationale voedseluitbraken door een gemeenschappelijke bron aannemelijk zijn, en voedsel vaak niet meer aanwezig is wanneer symptomen optreden, is het van belang internationaal aan te sturen op de detectie van langere sequenties. Met betrekking tot voedselveiligheid kan monitoring inzicht geven in de aanwezigheid van HAV in voedsel.

<b>Mogelijke toepassingen van moleculaire typering in surveillance van hepatitis A</b>	
Detectie van (diffuse) uitbraken	Ja
Bronattributie	Ja
Tracering in voedselketen	Ja
In kaart brengen van (zoönotische) transmissieroutes	Ja
Pathogeen-eigenschappen: (niet-)zoönotische typen, verschillen in pathogeniciteit	Ja

### 3.3 Hepatitis E-virus<sup>3</sup>

#### Auteurs

Dr. ir. L.B.P. Verhoef (RIVM), dr. H. Vennema (RIVM), dr. ir. M. Bouwknecht (RIVM), dr. ir. E. Duizer (RIVM) en prof. dr. M.P.G. Koopmans (RIVM)

#### Inleiding

Historisch werden HEV-infecties vooral gediagnosticeerd bij reizigers naar tropische en subtropische gebieden. Bij nadere typering bleken dit overwegend HEV genotype 1-(gt1) infecties te betreffen. Sinds tien tot vijftien jaar wordt een vierde genotype in mensen gevonden in veronderstelde hepatitis E-vrije regio's zoals Nederland, namelijk genotype 3 (gt3). Tegenwoordig is duidelijk dat het merendeel van de humane HEV-infecties in de geïndustrialiseerde landen van Europa, Amerika en Azië/Japan worden veroorzaakt door HEV GT-3-virussen. Inmiddels is ook duidelijk dat virussen van dit genotype wereldwijd in varkens gevonden wordt (25), zoals genotype 4 in China en omgeving (26).

Incidenteel (circa tien keer per jaar pcr positief EN en twintig keer per jaar serologisch) wordt HEV aangetoond als oorzaak van hepatitis bij mensen in Nederland die niet op reis zijn geweest. In de meeste gevallen betreft dat personen met onderliggend lijden (27). Bij immuungestoorde patiënten kan de infectie chronisch worden, met jarenlange viraemie en klachten (28). Het is onbekend hoe HEV in Nederland wordt overgedragen en of er sprake is van transmissie uit een zoönotisch reservoir, aangezien tot nu toe steeds verschillende virussen gevonden zijn bij dier en mens. Uit de mate van verwantschap van de animale en humane virussen is echter aannemelijk dat er sprake moet zijn van lokale verspreiding (29). In Japan is overdracht van HEV gt3 beschreven door consumptie van hertenvlees (30) en onvoldoende verhit varkensvlees (31). Daarnaast is overdracht van HEV via bloedtransfusie beschreven. De consumptie van rauw varkensvlees in worst is verondersteld als mogelijke bron van infectie in Nederland, wel risicofactor in Duitsland echter tot dusver zonder overtuigend bewijs (32).

#### Relevantie van de kiemsurveillance voor de volksgezondheid en potentiële interventie maatregelen

Kiemsurveillance bij HEV heeft primair tot doel om inzicht te geven in mogelijke bronnen van HEV-infecties die in Nederland worden opgelopen (dieren, voedsel, water, bloedtransfusie). Dit inzicht is nodig om te kunnen adviseren over de noodzaak tot gerichte preventie over te gaan (bijvoorbeeld voedsel recall, screening van bloeddonaties op HEV en voorlichting). Gezien de hoge kans op complicaties bij infectie van zwangeren met HEV 1 (gerapporteerde case fatality rate tot 25%) is inzicht in transmissieroutes en bronopsporing gewenst. Wel valt op dat tot nu toe gevonden HEV gt3-cases vooral ouderen zijn en patiënten met al bekende problemen (onder andere leverziekten, kanker, hartpatiënten). Dit roept de vraag op of HEV gt3 mogelijk minder pathogeen is dan bijvoorbeeld gt1. Doordat recent enkele chronische gevallen van hepatitis E zijn gevonden (28) is de aandacht onder klinici toegenomen en wordt moleculaire diagnostiek in toenemende mate gedaan in centra die gespecialiseerd zijn in transplantatie patiënten. Daarmee neemt het aantal herkende HEV-gevallen toe, maar bronnen zijn nog steeds onbekend.

<sup>3</sup> Op basis van RIVM rapport 240031001/2006: *Surveillance van pathogenen in Nederland*, hoofdstuk 4.3 door dr. M. Koopmans (RIVM) en dr. T. Herremans (RIVM))

### **Huidige kiemsurveillance**

Hepatitis E in patiënten: Diagnostiek van HEV vindt plaats in enkele laboratoria in Nederland en is voornamelijk op basis van serologie, waarvoor geen typenpecifieke assays beschikbaar zijn. Sommige ziekenhuizen sturen een serum van IgM-positief bevestigde patiënt naar het RIVM voor PCR en typering. Het aantal aanvragen voor diagnostiek op HEV was de afgelopen tien jaar redelijk stabiel met honderd tot tweehonderd patiënten per jaar, met enkele uitschieters boven de driehonderd patiënten in 2005 en 2006. Dat onderdiagnostiek van HEV een mogelijk probleem is, blijkt uit de projectmatige screening van hepatitis non-A-B-C monsters (33), waarbij blijkt dat 7% van de onverklaarde hepatitisgevallen toe te schrijven is aan hepatitis E vooral van gt3 dat ook in varkens voorkomt (34).

Hepatitis E in voedsel: Om de bronnen en transmissieroutes van HEV in Nederland te onderzoeken zijn in projectverband nieuw gevonden HEV-virussen in varkens en in andere mogelijke dierreservoirs zoals ratten en wild gedeeltelijk gesequenced. Deze activiteiten vonden plaats in het kader van een Europees onderzoek en werden medegefinancierd door de NVWA. De NVWA financiert tevens het opstellen van een risicoprofiel voor HEV naar bronnen van endemische HEV-patiënten in Nederland en onderzoek naar de mogelijkheden voor bewakingssystematiek. De humane activiteiten worden niet door de NVWA gefinancierd en zijn ontwikkeld in een ander Europees samenwerkingsverband (EVENT). Daarvoor is een Europese database ontwikkeld en beschikbaar. Deze financiering is beëindigd.

### **Responsetijd van huidige kiemsurveillance**

Typering van HEV gevonden bij de mens gebeurt binnen een week, omdat het vinden van gt3-infectie bij een persoon, die niet in het buitenland is geweest, aanleiding kan zijn voor brononderzoek. Bij spoedaanvragen kan typering sneller gedaan worden (een tot twee dagen).

### **Isolaten**

Het RIVM bewaart serum, fecessuspensies, RNA en de gedetecteerde sequentie in zowel patiëntenmateriaal als voedsel. In Europees verband worden (vooral humane en varkens-) sequenties bewaard voor vergelijking en bronopsporing.

### **Typering**

Indien patiëntenmateriaal met positieve serologie ontvangen wordt op het RIVM, vindt systematisch typering plaats. Alle ELISA-positieve sera (IgM en/of IgG) worden door middel van PCR en sequencing getypeerd, met een slagingskans van ongeveer 50%. Dit laatste wordt mogelijk veroorzaakt doordat serologie langer positief blijft dan dat het virus detecteerbaar is. Het viremisch stadium van HEV is kort, detectie in feces zal waarschijnlijk langer mogelijk zijn.

### **Databases**

Binnen het CIB is een database waarin zowel humane als dierlijke en omgevingssequenties verzameld worden. Deze database wordt aangevuld met sequenties uit Italië, Spanje, Denemarken, Hongarije, Frankrijk en Zweden, in het kader van het FBVE-netwerk. Hierbij is te zien dat HEV gt3-stammen uit verschillende landen soms clusteren maar dat ieder land, met uitzondering van Italië, een 'eigen' tak in de fylogenetische boom heeft. Opmerkelijk is vooral dat HEV gt3-sequenties van varkens en mensen uit een land vaak meer homologie vertonen dan bijvoorbeeld humane sequenties uit verschillende landen. Dit maakt dat het in principe mogelijk is om op basis van sequentiehomologie een importgerelateerde voedselbron te traceren. Voor het onderhoud van deze database is geen structurele financiering.



### **Presentatie van gegevens**

- Terugrapportage uitkomst serologie, moleculaire detectie en typering aan de inzendende laboratoria.
- De typeringsresultaten worden gebruikt voor surveillance-doeleinden door het RIVM.
- Rapportage op basis van case-reports, ook semi-kwantitatieve RT-PCR data in Infectieziekten Bulletin.
- Publicaties in internationale tijdschriften.

Bovenstaande heeft betrekking op humane surveillance.

### **Acties**

Wanneer een patiënt positief is voor HEV gt3 vindt, indien mogelijk qua bemensing en financiën, bronopsporing plaats. Echter, doordat HEV zelden een uitbraak veroorzaakt en een lange variabele (een tot zeven weken) incubatietijd heeft is bronopsporing lastig en vooralsnog beperkt tot anekdotische gevallen. Op Europees niveau werd binnen EVENT een database opgebouwd van sequenties uit mensen en varkens, waarin sequenties vergeleken kunnen worden om mogelijke bronnen te achterhalen.

### **Geschatte kosten van de huidige kiemsurveillance**

Momenteel is er geen financiering voor surveillance van HEV. De geschatte kosten zijn ongeveer € 18.000 voor typering bovenop de kosten voor diagnostiek, op jaarbasis, gebaseerd op vijftig positieve monsters voor typering. Expertise, onderhoud en uitvoering van analyses, inclusief databasebeheer en exclusief bron- en contactonderzoek, zijn nog niet in deze kosten opgenomen.

### **Lacunes in huidige kiemsurveillance**

Structurele financiering voor de karakterisering van humane HEV-cases ontbreekt. Herhaalde periodieke screening of continue prevalentie en typering van HEV gt3-varkens ontbreekt (NVWA). De incidentie van hepatitis E is tot nog toe onduidelijk, en zal worden onderzocht in een serosurvey onder een representatieve steekproef van de Nederlandse bevolking. Vanwege gerapporteerde problemen met de verschillende commerciële serologische methoden voor anti-HEV IgM- of IgG-detectie verschijnen regelmatig nieuwe of aangepaste kits op de markt. Hierdoor is vergelijking in de tijd en tussen landen lastig (32), en harmonisatie van methoden is nodig.

### **Nut van typering voor besluitvorming in voedselveiligheid**

Uit eerste analyse van de database van EVENT is gebleken dat ieder deelnemend land, met uitzondering van Italië, een eigen fylogenetisch cluster van hepatitis E-virussen gt3 heeft. Dit geeft aan dat HEV-typering geschikt is om de herkomst van een (geïmporteerde) infectiebron te achterhalen. Dit kan de bronopsporing faciliteren, om een mogelijke bron van infectie van de markt te halen opdat volgende ziektegevallen voorkomen kunnen worden. Gezien de ernst van de ziekte, namelijk grote kans op complicaties bij zwangeren en recipiënten van bloed, is het nodig om mogelijke bronnen te achterhalen en inzicht te krijgen in de transmissieroute. Met deze kennis kunnen effectieve bestrijdingsmaatregelen geïmplementeerd worden.

### **Conclusies**

Naast HEV-infectie in reizigers is recent duidelijk geworden dat ook in Nederland blootstelling aan HEV plaatsvindt. De virussen die gevonden worden in de Nederlandse patiënten lijken sterk op virussen die bij Nederlandse varkens en Nederlands wild, zoals zwijnen en herten, zijn gevonden. De incidentie, bronnen en transmissieroutes van HEV in Nederland zijn echter niet bekend. De beschikbare expertise en basisgegevens zijn bruikbaar voor traceren van een importgerelateerde voedselbron. Gezien de grote kans op complicaties bij zwangeren en recipiënten van bloed is het nodig om deze bronnen en transmissieroutes te achterhalen om zo effectieve bestrijding mogelijk te maken.

Structurele financiering voor karakterisering en bronopsporing van humane HEV is gewenst.

<b>Mogelijke toepassingen van moleculaire typering in surveillance van hepatitis E</b>	
Detectie van (diffuse) uitbraken	Ja*
Bronattributie	Ja
Tracering in voedselketen	Ja
In kaart brengen van (zoönotische) transmissieroutes	Ja
Pathogeen-eigenschappen: (niet-)zoönotische typen, verschillen in pathogeniciteit	Ja

\*potentieel

### 3.4 **Norovirus<sup>4</sup>**

#### **Auteurs**

Dr. ir. L.P.B. Verhoef (RIVM), dr. H. Vennema (RIVM), dr. S.A. Rutjes, dr. ir. E. Duizer (RIVM) en prof. dr. M.P.G. Koopmans (RIVM)

#### **Inleiding**

Norovirussen (NoV) zijn de meest vóórkomende veroorzakers van gastro-enteritis (GE) in Nederland en verantwoordelijk voor circa 640.000 zieken en 1100 DALYs in 2006 (35). Norovirussen verspreiden zich via de fecaal-orale route, in de meeste gevallen direct van persoon tot persoon maar ook via water en voedsel, zoals schelpdieren en zacht fruit, maar ook voedsel dat bereid is door een geïnfecteerd persoon. Norovirussen zijn kleine RNA-virussen zonder envelop met een hoge besmettelijkheid, hoge resistentie tegen inactivatie en langdurige overleving in het milieu. Besmetting van voedsel kan zowel tijdens de productie als tijdens de bereiding plaatsvinden. Door de globalisering van de voedselmarkt bestaat de kans op internationale uitbraken door een gemeenschappelijke bron, vooral wanneer besmetting vroeg in de voedselketen optreedt.

Doordat norovirusinfectie meestal een mild ziekteverloop heeft, worden de directe kosten binnen de gezondheidszorg ten gevolge van sporadische norovirusinfecties geschat op slechts 2 miljoen euro. Norovirussen zijn echter niet alleen de belangrijkste veroorzaker zijn van sporadische GE, maar tevens de belangrijkste veroorzaken van uitbraken. Norovirussen blijken verantwoordelijk te zijn voor honderden uitbraken van gastro-enteritis per jaar, waarvan 36% in ziekenhuizen en 34% verpleeghuizen. Als de grote aantallen verloren werkuren en overige indirecte kosten worden meegeteld, lopen de geschatte kosten op tot 36 miljoen euro, 10% van het jaarlijkse totaal van de kosten voor GE. Bovendien wordt in toenemende mate chronische norovirusinfectie vastgesteld bij patiënten met onderliggend lijden. Er zijn geen ziekteelastschattingen van uitbraken per land. Dit is een van de doelstellingen van het global burden of foodborne disease-netwerk, een samenwerking tussen groepen over de hele wereld die zich bezighouden met schattingen van ziekteelast van voedselgerelateerde pathogenen (FERG, WHO).

#### **Relevantie van de kiemsurveillance voor de volksgezondheid en potentiële interventie maatregelen**

Uit moleculair biologische typering blijkt dat de humane norovirussen kunnen worden ingedeeld in drie genogroepen (genogroep I, II en IV). GGI en II bestaan beide weer uit meerdere genotypen, waarbij nieuwe varianten van het genotype II.4 (GII.4) verantwoordelijk zijn voor wereldwijde epidemische seizoenen (36-39). Het tijdig herkennen van deze nieuwe varianten is de doelstelling van het global NoroNet, een samenwerking tussen groepen over de hele wereld die zich bezighouden met virologische surveillance van norovirussen ([www.noronet.nl](http://www.noronet.nl)). Vroege herkenning van nieuwe varianten binnen NoV GII.4 zou kunnen leiden tot een waarschuwing aan instellingen om de hygiënemaatregelen stringenter toe te passen en/of te kiezen voor stringenter hygiënemaatregelen, zoals is gebeurd in het winterseizoen 2004-2005 (40).

Hoewel GII.4 het meest voorkomende type is, wordt dit genotype relatief minder vaak gezien in voedselgerelateerde uitbraken (2). Een vroege herkenning van non-GII.4 bij mensen zou daarom kunnen leiden tot gerichte verhoging van inzet van een GGD en NVWA om een mogelijke voedselbron te achterhalen voor verdere typering voor (internationale) vergelijking, wanneer de capaciteit van een GGD beperkt is.

<sup>4</sup> Op basis van RIVM rapport 240031001/2006: *Surveillance van pathogenen in Nederland*, hoofdstuk 4.12 door dr. ir. E. Duizer (RIVM), dr. Y. van Duynhoven (RIVM) en dr. I.L.A. Boxman (NVWA))

Typering tot op sequentieniveau van in voedsel gevonden norovirus en patiënten, in combinatie met een epidemiologische link, is de enige methode om besmet voedsel aan patiënten (uitbraken) te kunnen koppelen. In dat soort gevallen geeft typeringsinformatie een indicatie voor de mogelijke transmissieroute of het reservoir en dus de mogelijkheid tot interventie door middel van bijvoorbeeld een recall van besmet voedsel. Aangezien in voedsel volgens andere methoden virus gedetecteerd wordt dan in patiëntenmateriaal en aangezien voedsel geïmporteerd of geëxporteerd kan zijn, is het van belang, maar ook gecompliceerd, om typeringsresultaten internationaal en tussen laboratoria te matchen (41, 42).

### **Huidige kiemsurveillance**

**Norovirus in patiënten:** Met de komst van de Commissie Openbare diagnostiek en Microbiologie (COM) en Regionale Arts Consulents (RAC) in 2008 is de detectie van norovirus overgegaan van uitbraakdiagnostiek bij het RIVM naar zowel uitbraak- als patiëntendiagnostiek bij de perifere laboratoria. Diagnostiek bij uitbraken kan worden vergoed uit OGZ-gelden. Typering wordt door de perifere laboratoria niet routinematig gedaan. Op verzoek van GGD kunnen positieve monsters doorgestuurd worden naar het RIVM voor typering. Hiervoor is geen structurele financiële dekking, maar wanneer de monsters ingestuurd naar het RIVM zijn voorzien van de gevraagde informatie kan dat voor 2011 op kosten van het ministerie van Volksgezondheid, Welzijn en Sport (VWS) in het kader van het CIB-project Virale Diagnostiek. Omdat het in de praktijk lastig blijkt om goede informatie te krijgen en vanwege de decentralisatie van de NoV laboratoriumdetectie is de norovirus-surveillance (sinds 1994 operationeel) dan ook zonder verdere ingrepen niet meer operationeel. Inmiddels is gestart met typeren van een kleine steekproef van norovirus positieve opgenomen patiënten bij een aantal laboratoria in TypeNed. Naar verwachting zal dit systeem de basis trends in diversiteit van norovirussen gaan monitoren.

**Norovirus in voedsel:** Bij de NVWA-Oost (Zutphen) vindt monitoring van schelpdieren en andere levensmiddelen plaats op de aanwezigheid van norovirus. Ook worden restanten van voedselgerelateerde uitbraken onderzocht op de aanwezigheid van norovirus. De uitslag van de typering van norovirus op voedsel wordt altijd vergeleken met patiëntendata in samenwerking met het RIVM-LIS. Ook RIVM-LZO kan norovirus in voedsel (vooral schelpdieren) detecteren en typeren, maar dit gebeurt meer in onderzoeksverband. De gegevens van de NVWA zijn beschikbaar in de norovirus database van het RIVM, waarin sequenties met beperkte achtergrondgegevens worden gedeeld. In 2004 is een reguliere monitoring uitgevoerd van mosselen en oesters, en in 2008 van keukens van voedselbereidingsplaatsen voor derden, beiden gefinancierd door de NVWA.

**NoV in dierreservoirs:** Er is geen structurele surveillance van dierreservoirs voor NoV. De NVWA heeft onderzoek gefinancierd naar het zoönotisch potentieel van diverse calicivirussen. Onderzoek naar eventuele zoönotische transmissie van onder andere norovirus heeft ook plaatsgevonden binnen het EU medegefinancierd project EVENT. Hoewel nauw verwante sequenties worden gevonden in mensen en varkens, is geen bewijs geleverd voor zoönotische transmissie van norovirussen, en is dat naar verwachting uitzonderlijk. Wel bestaat in theorie de mogelijkheid van genetische recombinatie door vermengen van genen van dierlijke en humane norovirussen bij gelijktijdige blootstelling en infectie van een gastheer.

**NoV in water:** RIVM-LZO heeft technieken voor detectie en typering van NoV in water. Op projectbasis worden in diverse soorten water, zoals oppervlaktewater wat gebruikt wordt voor de productie van drinkwater, recreatiewater of rioolwater, metingen uitgevoerd. Er is geen structurele surveillance voor NoV in water.

### **Responsetijd van huidige kiemsurveillance**

In de perifere laboratoria vindt (doorsturen van monsters voor) typering plaats op verzoek van de GGD. Alle monsters die opgestuurd worden naar het RIVM worden via de normale diagnostiekroute direct onderverdeeld in GI, GII en GII.4. Dit resultaat is in principe binnen vijf werkdagen bekend. De aanvullende typering van NoV kan alleen op basis van sequencen; er wordt naar gestreefd dit binnen twee weken na binnenkomst van het monster op het RIVM af te ronden. Dit is voldoende snel voor (meerjarige) signalering van trends. Bij specifieke verdenking (bij bijvoorbeeld betrokkenheid van voedsel of de opkomst van een hoog virulente stam) zou dit echter veel sneller moeten. Typering kan met een doorlooptijd van twee dagen gedaan worden, maar dat vergt een daartoe geschikte infrastructuur en bijbehorende financiering.

Norovirus in voedsel (NVWA): Aangezien virussen in voedsel niet repliceren, gaat het bij detectie in voedsel om een lage dosis, waardoor zowel detectie als typering bemoeilijkt kunnen worden. Bij verdenking van virale besmetting van voedsel kan binnen vijf werkdagen getypeerd worden, maar kan in drukke perioden langer duren.

### **Isolaten**

Norovirus is niet kweekbaar, en daarom is er geen biobank van isolaten. Wel bewaart het RIVM patiëntenmateriaal (bij 4 °C) en het RNA (bij -20 °C). Het RIVM beheert tevens een wereldwijde NoV sequentiedatabase. Het bewaren van monsters in de perifere laboratoria verschilt per laboratorium. De monsters opgeslagen bij het RIVM zijn opvraagbaar voor verder onderzoek, als dat niet al door het RIVM zelf gebeurt. Met de meeste laboratoria is er een goede samenwerking, waarbij monsters opgevraagd kunnen worden voor verder onderzoek.

Detectie van norovirus in voedsel vindt plaats met nested RT-PCR, volgens gepubliceerde protocollen (43). Als een gevolg van de rechtspositie van de NVWA zijn de monsters opgeslagen bij dit instituut niet vrij toegankelijk. Sequenties zijn beschikbaar voor vergelijking met sequenties gevonden in patiënten.

### **Typering**

Aangezien norovirus tot nu toe niet kweekbaar is, is men voor typering aangewezen op genotypering met behulp van PCR-technieken. Van alle ingezonden monsters wordt bij het RIVM eerst de diagnose bevestigd door middel van een multiplex PCR (44), waarbij in één test naast norovirus ook sapovirus, rotavirus, astrovirus en adenovirus kunnen worden aangetoond. Voor norovirus wordt door middel van detectie met PCR al gedeeltelijke typering verwezenlijkt, namelijk norovirus genogroep I, genogroep II, en genotype II.4. Omdat moleculaire typering vaak gebruikt werd met verschillende naamgevingen, heeft het RIVM een consensus nomenclatuur ontwikkeld met diverse onderzoeksgroepen in de wereld. Deze nomenclatuur wordt toegepast in een typeringstool, welke beschikbaar is via het Moleculair Platform. Deze tool kan door laboratoria over de hele wereld gebruikt worden om op uniforme wijze namen of nummers toe te kennen aan typen.

### **Databases**

De database voor gecombineerde epidemiologische en moleculaire data van zowel humane- als voedsel- en veterinaire monsters is ondergebracht in het Moleculair Platform. Dit is een databasestructuur die vrij toegankelijk is via internet voor deelnemende laboratoria. Het Moleculair Platform is deels ontwikkeld als vervolg op de database van het FBVE-netwerk, waarin sinds 1999 Europese landen uitbraken rapporteren. Eind 2009 jaar zullen de Nederlandse perifere laboratoria, die in staat zijn zowel detectie als typering uit te voeren, de mogelijkheid krijgen hun data toe te voegen en te analyseren. Verder zijn er verschillende Europese landen die hun gegevens in deze database blijven toevoegen. De database wordt beheerd door het RIVM. De database is voor deelnemers vrij toegankelijk voor het systematisch toevoegen en analyse van data.

### **Presentatie van gegevens**

1. Terugrapportage diagnostiek en typeringsresultaten naar inzender.
2. Publicaties in internationale tijdschriften volgend uit verschillende aio-projecten en trendanalyse.
3. Overzichtsrapportage data moleculair platform naar deelnemers.
4. Aantal noroviruscases wordt gerapporteerd in de virologische weekstaten.
5. Internet en mailinglist NoroNet, voor communicatie van nieuwe ontwikkelingen en rapid alerts binnen een internationaal netwerk.

### **Acties**

Er zijn actieve, internationale maillijsten, zoals NoroNet die gebruikt kunnen worden als 'rapid alert system'. Daarmee worden ook de officiële RASFF-meldingen onder de aandacht gebracht waarvoor (inter)nationale uitwisseling van data wenselijk is ten behoeve van bronopsporing. Ook leiden sommige rapid alerts binnen het netwerk tot een RASFF-melding. Bij grote uitbraken, of uitbraken waarbij gedacht wordt aan voedsel, wordt contact opgenomen met de meldende instantie om de mogelijke bron bevestigd te krijgen. Wanneer voedsel een mogelijke transmissieroute is, wordt in Nederland ook de NVWA ingeschakeld door de betrokken GGD, of het RIVM, en voedsel getest voor aanwezigheid van norovirus.

### **Geschatte kosten van de huidige kiemsurveillance**

NoV in patiënten (RIVM): per jaar, totaal € 22.000 niet-structureel uit RIVM (CIb) middelen, gebaseerd op typering van vijftien monsters in aanvulling op diagnostiek waarvoor regulier budget beschikbaar. De kosten voor onderhoud van de database en uitvoeren van analyses zijn hierin nog niet meegenomen. NoV in Voedsel (NVWA): schatting per jaar € 20.000 aan kiemsurveillance (typering/sequensen NoV in schelpdiersurveillance en klachtengerelateerde monsters).

### **Lacunes in huidige kiemsurveillance**

Er is geen structurele (VWS-)financiering voor NoV kiemsurveillance en voor het managen van de wereldwijde database. De kosten voor de Nederlandse surveillance zouden structureel binnen het werkprogramma van het CIb moeten worden opgenomen. Nederland is internationaal voorloper in dit veld en van daaruit zou het bijdragen aan financiering van de wereldwijde database een belangrijke stimulans geven, temeer daar dezelfde structuur en hetzelfde netwerk gebruikt worden of kunnen worden voor meerdere enterale virussen die relevant zijn voor voedselveiligheid (hepatitis A, hepatitis E, enterovirussen).

Het kunnen opvoeren van de snelheid van norovirusdiagnostiek en typering, in geval van bijvoorbeeld voedselverdachte uitbraken om onderbouwde voorstellen voor product recall te kunnen doen uitgaan, is ook afhankelijk van structurele financiering.

De betekenis van matchende sequenties is een lacune. De waarschijnlijkheid dat identieke sequenties van een gemeenschappelijke bron afkomstig zijn, is afhankelijk van de lengte van de sequentie en de target regio van het genoom. Detectie van virussen in voedsel is gecompliceerd, waardoor enerzijds een negatieve test weinig zegt, en anderzijds weinig bekend is over de achtergrond viruspopulatie in voedsel. Identificatie van een voedselbron zal om deze redenen afhankelijk blijven van een combinatie van epidemiologische en moleculaire gegevens, en gebaat zijn bij een algoritme met evidence-based indicatoren, zoals dubbelinfecties ten gevolge van contaminatie via rioolwater.

Naast typering van het virus zou toevoeging van gedeeltelijke typering van de host (bloedgroep en secretorstatus) kunnen bijdragen aan betere inzichten en de transmissie en inschatting van bijvoorbeeld attack rates van norovirus (45, 46).

### Nut van typering voor besluitvorming in voedselveiligheid

Om effectieve maatregelen te kunnen implementeren, is het noodzakelijk de transmissieroute te herkennen. Daarbij is het noodzakelijk het relatieve aandeel van de verschillende transmissieroutes in kaart te brengen, om de kosteneffectiviteit van dergelijke acties te kunnen bepalen. Dit geldt vooral voor de zogeheten 'diffuse uitbraken', die moeilijk te detecteren zijn doordat uitbraken simultaan in verschillende landen door een gemeenschappelijke voedselbron veroorzaakt worden. Door de toenemende globalisering van de voedselmarkt neemt de kans op dergelijke uitbraken toe. Retrospectieve analyse van tien jaar FBVE-data laat zien dat mogelijk 11% van de gerapporteerde uitbraken diffuse voedselgerelateerde uitbraken betreft (4). Moleculaire typering draagt bij aan de herkenning van deze uitbraken, waarmee bronopsporing en -eliminatie mogelijk is, om de ziektelast te beperken. Daarnaast geeft moleculaire typering inzicht in de populatiedynamica en de mogelijkheid epidemische seizoenen tijdig te herkennen.

De variabele norovirussen zijn minder geschikt dan bijvoorbeeld hepatitis A en E om geografische herkomst van een sequentie te herleiden. Ook een attributiemethode op reservoir niveau, zoals bij *Salmonella*, of op geografisch niveau, zoals bij hepatitis A, is op norovirus niet van toepassing. Norovirussen zijn niet op basis van hun sequentie in te delen op herkomst uit een specifieke voedselbron. Wel is er sprake van genotype profielen die verschillend zijn voor voedselgerelateerde en persoon-op-persoontransmissie (3). Ook is er sprake van verdachte voedselgroepen, zoals schelpdieren, frambozen en sla, die vaak als veroorzakers van voedselgerelateerde uitbraken gezien worden. Daarbij levert de vergelijking van internationaal gedetecteerde sequenties interessante clusters op, die daarmee toe te schrijven zijn aan een gemeenschappelijke voedselbron (4). Het epidemiologisch herkennen van de transmissieroute wordt bij norovirusuitbraken bemoeilijkt, doordat persoon-op-persoontransmissie het overneemt van introductie door voedsel. Ook om deze reden is de bijdrage van moleculaire typering essentieel.

### Conclusies

De bestaande surveillance voor norovirus, zoals deze bestond van 1994 tot 2009, heeft in enkele gevallen geleid tot gedetailleerde beschrijvingen van de spreiding van norovirus, zowel door patiëntpopulaties als via de voedselketen. Grondige analyse van de hiermee ter beschikking gekomen data heeft veel kennis over mogelijke transmissie via voedsel en de mogelijkheid voor het linken van internationale uitbraken opgeleverd. De hiermee verkregen kennis kan mogelijk toegepast worden op de data die beschikbaar zijn voor andere pathogenen. Structurele kiemsurveillance is van belang om tijdig te kunnen waarschuwen bij bijvoorbeeld de opkomst van een nieuwe mogelijk pandemische variant (GII.4) of om te kunnen ingrijpen als er sprake is van mogelijk uitgebreide verspreiding van een besmette batch fruit. Structurele financiering is nodig voor continuïteit en snellere responsetijd.

<b>Mogelijke toepassingen van moleculaire typering in surveillance van norovirus</b>	
Detectie van (diffuse) uitbraken	Ja
Bronattributie	Nee
Tracering in voedselketen	Ja
In kaart brengen van (zoönotische) transmissieroutes	Ja
Pathogeen-eigenschappen: (niet-)zoönotische typen, verschillen in pathogeniciteit	Ja

### 3.5 Rotavirus<sup>5</sup>

#### Auteurs

Dr. ir. L.B.P. Verhoef (RIVM), ing. J.H.J. Reimerink (RIVM), dr. A. Kroneman (RIVM), dr. ir. E. Duizer (RIVM) en prof. dr. M.P.G. Koopmans (RIVM)

#### Inleiding

Rotavirus staat bekend als een veel voorkomende oorzaak van gastro-enteritis bij jonge kinderen, met kans op een ernstig verloop vanwege uitdrogingsgevaar. Toch werd in de SENSOR-studie gevonden dat gastro-enteritis door rotavirus bij volwassenen even vaak voorkomt als bij kinderen van 1 tot 4 jaar. In deze studie werd geschat dat circa 190.000 gevallen van gastro-enteritis per jaar worden veroorzaakt door rotavirus, leidend tot circa 12.000 bezoeken aan huisartsen en enkele duizenden ziekenhuisopnames per jaar van jonge kinderen (47, 48). De primaire transmissieroute van rotavirus is fecaal-orale persoon-op-persoontransmissie, hoewel in gebieden met slechte hygiëne ook transmissie via water en voedsel mogelijk is (49). Door de globalisering van de voedselmarkt bestaat op deze wijze de kans op internationale uitbraken door een gemeenschappelijke bron, vooral wanneer besmetting vroeg in de voedselketen optreedt. Voor rotavirus is zoönotische transmissie en/of reassortment van humane en animale stammen ook mogelijk (50).

Voor rotavirus is sinds kort weer een vaccin beschikbaar. Besluit over invoering van dit vaccin is nog niet genomen, wel een KEA. Momenteel worden in het kader van EuroRotaNet, een netwerk binnen Europa, typeringsgegevens verzameld, om de verschillende typen in Europa en de invloed van invoer van vaccinatieprogramma's op de viruspopulatie te monitoren (51). Bij vaccinatie wordt uitgegaan van bescherming tegen de serotypen G1-4 (52). Er wordt geclaimd dat er crossprotectie is tegen andere genotypen, maar de mate waarin, is nauwelijks onderzocht.

#### Relevantie van de kiemsurveillance voor de volksgezondheid en potentiële interventie maatregelen

Op basis van beschikbare literatuur over de incidentie van het rotavirus, de te verwachten diversiteit en aannames voor effectiviteit van vaccinatie in het voorkomen van infectie met specifieke genotypen rotavirus, kan onderzocht worden na hoeveel tijd een eventuele verdringing meetbaar is. Monitoring van de rotaviruspopulatie op nationaal niveau is gebleken onvoldoende inzicht te geven in de verschuiving van genotypen, aangezien de veranderingen in kleine aantallen resulteren. Om deze reden vindt sinds 2005 systematische kiemsurveillance van circulerende virusstammen in Europees verband plaats in het kader van het EU-project EuroRotaNet. Dit is een netwerk van zestien laboratoria in vijftien Europese landen. De deelname van Nederland in dit project is gewenst voor het beantwoorden van de volgende vragen:

1. Hoe is de huidige verdeling van rotavirussubtypen in de Nederlandse bevolking?
2. Wat is de te verwachten effectiviteit van rotavirusvaccinatie als die ingevoerd zou worden?

De Nederlandse resultaten van EuroRotaNet 2005-2008 zijn beschreven (51), en kunnen gezien worden als nulmeting vóór de invoering van vaccinatie. Een lastige vraag is of de eventuele verdringing van bestaande rotavirustypen bij introductie van vaccinatie is te voorspellen. Er zijn beperkte gegevens voorhanden over effectiviteit van vaccinatie ter

<sup>5</sup> Op basis van RIVM rapport 240031001/2006: *Surveillance van pathogenen in Nederland*, hoofdstuk 4.12 door dr. M. Koopmans (RIVM) en J. Reimerink (RIVM)



voorkoming van rotavirus waarbij gekeken is naar type-specifieke effectiviteit (G1-4 versus G9).

### **Huidige kiemsurveillance**

Rotavirus in patiënten: Momenteel is een kiemsurveillance operationeel op basis van diagnostiek van uitbraken die verdacht zijn voor virale gastro-enteritis, en naar het RIVM gezonden worden. Door middel van de multiplex PCR worden verschillende virussen gediagnosticeerd, waaronder rotavirus. Deze PCR is niet genotype-specifiek, en de PCR-producten worden niet standaard gesequenced voor moleculaire typering. Typering wordt gedaan door middel van reverse lineblot. In ziekenhuizen wordt rotavirus gediagnosticeerd door middel van ELISA. De medisch microbiologische laboratoria sturen in het kader van het EuroRotaNet-project de positieve fecesmonsters door naar het RIVM voor typering met reverse lineblot.

Rotavirus in voedsel: Er vindt geen systematische monitoring plaats van rotavirus in voedsel bij het RIVM.

Rotavirus in water: Reguliere monitoring van rotavirussen in oppervlaktewater voor recreatie en drinkwaterproductie vindt niet plaats, terwijl puntmetingen uitwijzen dat rotavirus frequent in rioolwater, oppervlaktewater en oesters kan worden aangetroffen. Onduidelijk is of en in welke mate deze transmissieroutes een rol spelen.

### **Responsetijd van huidige kiemsurveillance**

De uitslag van uitbraakdiagnostiek is over het algemeen binnen vijf werkdagen bekend. De typering van ELISA-positieve monsters duurt gemiddeld vijf dagen. Typering kan met een doorlooptijd van twee dagen gedaan worden, maar dat vergt een daartoe geschikte infrastructuur en bijbehorende financiering.

### **Isolaten**

Het RIVM bewaart patiëntenmonsters en RNA. Het bewaren van monsters in de medisch microbiologische laboratoria verschilt per laboratorium. De monsters opgeslagen bij het RIVM zijn opvraagbaar voor verder onderzoek, als dat niet al door het RIVM zelf gebeurt. Met de meeste laboratoria is er een goede samenwerking, waarbij monsters opgevraagd kunnen worden voor verder onderzoek, indien gewenst.

### **Typering**

Bij het RIVM worden GE-uitbraken gediagnosticeerd door middel van Multiplex PCR (44), waarbij in één test naast rotavirus verschillende andere virussen gedetecteerd worden. Typering gebeurt door middel van reverse lineblot. Rotavirussen van groep A worden op basis van antigene verschillen in twee oppervlakte-eiwitten onderverdeeld in subtypen, de G-typen (op basis van diversiteit in VP7), en de P-typen (VP4). Beide eiwitten, maar vooral het G-eiwit, induceren neutraliserende antilichamen na infectie. De meest voorkomende subtypen uit de groep A-rotavirussen zijn: G1P8, G2P4, G3P8 en G4P8 (53).

### **Databases**

Uitslagen van uitbraakdiagnostiek en typering worden gerapporteerd in het Laboratorium Informatie Management Systeem (LIMS). Verder worden de genotypen, gedetecteerd bij uitbraak-surveillance en de medisch microbiologische laboratoria, gerapporteerd aan EuroRotaNet via een website met beperkte toegang voor deelnemende laboratoria. De data van andere landen zijn tevens beschikbaar voor analyses. In de database wordt geen informatie opgeslagen over voedsel als mogelijke transmissieroute, aangezien het uitgangspunt is dat het persoon-op-persoontransmissie betreft.

### **Presentatie van gegevens**

1. Terugrapportage diagnostiek en typeringsresultaten inzender.
2. Publicaties in internationale tijdschriften volgend uit EuroRotaNet.
3. Internet en mailing lijst EuroRotaNet voor communicatie van nieuwe ontwikkelingen.

### **Acties**

Op Europees niveau wordt de dynamiek in de rotaviruspopulatie in de gaten gehouden, en hoe deze populatie verandert na de invoer van vaccinatie in verschillende Europese landen. Hiermee kan bepaald worden of rotavirusgenotypen voorkomen die niet of minder door het vaccin gedekt worden. Op nationaal niveau wordt gehandeld volgens het 'diagnostisch algoritme gastro-enteritis' (54). Wanneer op basis van typering blijkt dat een ziekenhuis een persisterend rotavirusprobleem is, zal de ziekenhuishygiëne grondig aangepakt worden.

### **Geschatte kosten van de huidige kiemsurveillance**

Kosten voor onderhoud EuroRotaNet en typering op Nederlandse monsters worden geschat op € 33.000 voor typering, uitgaande van jaarlijks vijfhonderd ingezonden positieve monsters. De kosten voor onderhoud van de database en uitvoeren van analyses zijn hierin nog niet meegenomen.

### **Lacunes in huidige kiemsurveillance**

De genotypering kan slechts in beperkte mate gebruikt worden voor het identificeren van gelinkte uitbraken. Sequenties zouden inzicht geven in transmissieroutes, maar deze worden niet standaard bepaald. Een systematische steekproef van de monsters zou geanalyseerd moeten worden met behulp van de bestaande genetische typeringsmethoden (multiplex RT-PCR aangevuld met sequencing). Deze steekproef wordt, indien mogelijk door het jaar verspreid verzameld, met aandacht voor een evenredige verspreiding over stedelijke en plattelandsgebieden (in verband met mogelijke zoönotische rotavirussen).

### **Nut van typering voor besluitvorming in voedselveiligheid**

Aangezien typering op basis van reverse lineblot gedaan wordt en sequenties niet routinematig bepaald worden, is een link tussen uitbraken lastig hard te maken. Voor de bijzondere genotypen is een link tussen uitbraken of een gemeenschappelijke bron soms wel mogelijk. De rol van voedsel bij ziektegevallen in Nederland is niet duidelijk. Om deze redenen is de huidige gebruikte typering voor rotavirus niet direct van nut voor besluitvorming in de voedselveiligheid.

### **Conclusies**

De rol van voedsel als transmissieroute voor rotavirus binnen Nederland is onvoldoende duidelijk. Daarbij levert de huidige genotypering van rotavirus onvoldoende bewijs om een voedselbron te kunnen identificeren. Om deze redenen is het uitvoeren van genotypering en sequencing op een representatieve steekproef van de in Nederland geïsoleerde rotavirussen gewenst.

Op nationaal niveau geeft rotavirussurveillance onvoldoende inzicht in verschuivingen in genotypen van de rotaviruspopulatie. Om deze reden is het EU-project EuroRotaNet gestart, waarbinnen op Europees niveau verschuivingen in genotypen waargenomen kan worden. Binnen Europa wordt het rotavirusvaccin in toenemende mate gebruikt. Door de surveillance-activiteiten van EuroRotaNet kan tevens bepaald worden of rotavirusgenotypen voorkomen, die niet of minder door het vaccin gedekt worden.

<b>Mogelijke toepassingen van moleculaire typering in surveillance van rotavirus</b>	
Detectie van (diffuse) uitbraken	Onbekend
Bronattributie	Onbekend
Tracering in voedselketen	Onbekend
In kaart brengen van (zoönotische) transmissieroutes	Ja
Pathogeen-eigenschappen: (niet-)zoönotische typen, verschillen in pathogeniciteit	Ja

## 4 Bacteriën

### 4.1 *Campylobacter* spp.

#### **Auteur**

Dr. W. van Pelt (RIVM)

#### **Inleiding**

*Campylobacter* infectie bij de mens wordt veroorzaakt door thermotolerante *Campylobacter* spp. De infectieuze dosis is laag (55), geschat wordt dat deze bij jonge kinderen gemiddeld 15 cfu bedraagt. De species die het meest geassocieerd zijn met infectie in Nederland (56) maar ook in de rest van de EU (57) zijn *C. jejuni* (92%) gevolgd door *C. coli* (7%), en *C. lari* (1%), maar ook van andere *Campylobacter*-species zoals *C. upsaliensis*, is bekend dat zij de mens kunnen infecteren.

De incubatieperiode in de mens is gemiddeld twee tot vijf dagen. Patiënten kunnen milde tot ernstige symptomen hebben met als gebruikelijke klinische symptomen waterige, soms bloederige diarree, maagkramp, koorts, hoofdpijn en misselijkheid. Normaal gesproken gaat de infectie vanzelf over. Minder gebruikelijk zijn extra-intestinale infecties of post-infectiecomplicaties zoals reactieve artritis en neurologische aandoeningen. Infecties met bepaalde serotypen van *C. jejuni* worden gezien als de belangrijkste reden voor het ontstaan van het Guillain-Barrésyndroom, een polioachtige verlamming van de ademhaling, een neurologische aandoening die zelfs de dood tot gevolg kan hebben.

Thermotolerante *Campylobacter* spp. zijn wijdverspreid in de omgeving. De belangrijkste reservoirs is het spijsverteringskanaal van wilde en tamme vogels (kip) en zoogdieren. Maar komen ook frequent voor bij landbouwhuisdieren zoals pluimvee, runderen, varkens en schapen; huisdieren zoals honden en katten; wilde vogels en in open water. Dieren worden zelden ziek van een infectie.

De bacterie kan gemakkelijk besmetting veroorzaken van voedsel, waaronder vlees, rauwe melk en zuivel; besmetting van vis, visproducten, mosselen en verse groente komt minder voor. Sporadische infecties bij de mens betreffen vooral contact met pluimvee, consumptie van kip, onbehandeld drinkwater en contact met huisdieren en andere dieren. Grote uitbraken zijn beschreven, veroorzaakt door besmette rauwe melk en besmet drinkwater (58), de laatste overigens nooit in Nederland.

In Nederland werden in 2008 ongeveer 6400 gevallen van *Campylobacter* infectie in het laboratorium bevestigd, corresponderend met naar schatting 77.500 gevallen in de algemene bevolking en 45 sterfgevallen als gevolg van de doorgemaakte infectie. In de afgelopen jaren is geen sprake van een duidelijke toe- of afname van *Campylobacter* infectie (56). De directe en indirecte medische kosten per jaar worden geschat op ongeveer 27 miljoen euro en de ziektelast op 1800 DALYs.

#### **Relevantie van een kiemsurveillance voor de volksgezondheid en potentiële interventie maatregelen**

Met behulp van de ook voor *Salmonella* gebruikte early warning-applicatie op de surveillancedatabase vindt signalering plaats van verheffingen in de incidentie van *Campylobacter*-infecties op genus niveau. Bijzondere verheffingen worden direct onderzocht en besproken tijdens het signaleringsoverleg en zo nodig gemeld aan de opdrachtgever ten behoeve van bronopsporing en/of outbreak investigation and management.

De surveillance heeft ook de mogelijkheid gegeven tot formeel epidemiologisch onderzoek (de CaSa-studie) naar risicofactoren voor *Campylobacter* infectie (59) en van genetische factoren die mogelijk bijdragen aan chronische sequelae na een infectie (60).

Tijdens de CaSa-studie in 2002/2003 is een isolatenbank (CVI: prof. Wagenaar, dit veterinaire laboratorium is het nationaal referentielaboratorium) opgezet welke humaan 2500 isolaten omvat en enkele honderden isolaten van honden en katten van de patiënten. Deze isolatenbank heeft voor diverse microbiologische onderzoeken zijn nut bewezen (61, 62, Nierop-Groot, 2010). Behalve voor signalering is de surveillance van *Campylobacter* vooral van belang voor het volgen van trends in het voorkomen en van de ontwikkeling van resistentie zowel bij de mens als bij pluimvee en de koppeling daarvan (63, 64). Om soortgelijke redenen wordt vanuit de streeklaboratoria voor de periode juni 2009-mei 2009 wederom een isolatenbank opgebouwd.

Moleculaire typering maakt het mogelijk trends in de geschatte bijdrage aan de humane *Campylobacteriose* van de diverse veterinaire bronnen alsmede de rol van de omgeving bij de transmissie te schatten, net als bij *Salmonella*. Dit geeft onder meer inzicht in waar te prioriteren en de mogelijkheid later te kunnen evalueren wat de effecten zijn van genomen interventie maatregelen. Een *Proof of principle* tot bronnenattributie met MLST op het Nederlandse humane materiaal lijkt gelukt (65).

Het volgen van de resistentieontwikkeling van *Campylobacter* tegen quinolonen is van belang daar dit middel de eerste keuze is bij reisgerelateerde gastro-enteritis wanneer de diagnose *Campylobacteriosis* nog niet bekend is. Hetzelfde geldt voor het volgen van de resistentieontwikkeling tegen macroliden, middelen van eerste keus bij gediagnosticeerde *Campylobacter*-infecties. Het zicht houden op het gebruik van quinolonen, met name in de pluimveehouderij, is daartoe van belang. Dit gebeurt jaarlijks in de MARAN-rapportage (66).

De resultaten van de meldingen, humane kiemsurveillance en alimentaire kiemsurveillance uitgevoerd door de NVWA, worden jaarlijks nationaal en internationaal (EFSA/ECDC) gepubliceerd (56, 57, 67, 68).

Doordat de risicofactoren voor infectie multifactorieel zijn en hun relatieve bijdrage grotendeels nog onbekend, ligt naast consumentenvoorlichting, voorsnog het accent op het reduceren van het risico op (kruis)besmetting van en door kippenvlees. In Nederland zijn aanwijzingen gevonden voor besmetting van de omgeving van een pluimveehouderij welke mogelijk ook een belangrijke rol speelt in het risico voor infectie van de mens, daarom lijkt reductie van verspreiding van *Campylobacter* tijdens de gehele primaire productiefase van belang.

### **Huidige kiemsurveillance**

Er bestaat in Nederland geen gecentraliseerde kiemsurveillance (bijvoorbeeld door een NRL *Campylobacter*) maar wel worden er voor het LSI-project (V/210221/01/TR) sinds 2004 vanuit de voormalige streeklaboratoria algemene demografische gegevens van de patiënt gerapporteerd en in OSIRIS ingevoerd (datum van monstername, postcode, geboortedatum, geslacht, aanvrager (huisarts/specialist)) en wordt tevens aangegeven of de infectie in het buitenland is opgedaan (69). Daarnaast worden gegevens over het isolaat geregistreerd, indien bekend: de species en resistentie tegen fluoroquinolonen, tetracycline en macroliden. Dit systeem heeft een dekking van 52% zoals in het CaSa-onderzoek is gebleken. Daarnaast bestaat sinds 1995, een eenvoudige surveillance van de weekfrequenties van positieve bevindingen uit de deelnemende laboratoria (70). Ten behoeve van de monitoring van de ontwikkeling van antibioticumresistentie van *Campylobacter* in landbouwhuisdieren is er naast de humane ook voor deze bronnen een isolatenbank bij het CVI opgebouwd. Beide isolatenbanken zijn in 2009 en 2010 met behulp van MLST getypeerd voor bronnenattributie en nader veterinair en humaan epidemiologisch onderzoek. Ook vanaf 2011 zullen voor dat doel uit humane en veterinaire bron en de omgeving, isolaten worden getypeerd. Voor de bronnenattributie moest tot nu toe nog gebruik worden gemaakt van buitenlands referentiemateriaal. Daarnaast worden in de PVE-monitoring sinds 1998 in diverse schakels ongeveer 150 koppels vleeskuikens per week op *Campylobacter* onderzocht. Door de NVWA worden uit

de retail nog eens 1500 vleesmonsters van vleeskuikens per jaar onderzocht en ongeveer 1200 monsters van kalfs- rund-, varkens- en lamsvlees (68).

### **Responsetijd van huidige kiemsurveillance**

Signalering vindt circa een tot vier weken na het optreden van de eerste ziektegevallen plaats. De responsetijd van de surveillance is via de weekfrequenties in theorie één week, meer gedetailleerde microbiologische en demografische informatie komt echter nog eens een maand later pas ter beschikking. Door de afwezigheid van een voor epidemiologische doeleinden bruikbare subtypering worden zelfs middelgrote verheffingen zelden opgemerkt. Bijzondere verheffingen worden direct onderzocht meestal op aangeven van een GGD of de NVWA, in samenwerking met EPI en eventueel het CVI (55).

### **Isolaten**

Zie Tabel 2 en overige secties.

### **Typering**

Zie Tabel 2.

De vraag is in hoeverre een moleculaire typering als MLST behulpzaam zou kunnen zijn voor epidemiologische doeleinden. In ieder geval is door de bewerkelijkheid en de kosten van deze typering, MLST op dit moment niet geschikt voor grootschalige monitoring, hooguit in heel specifieke tijdelijke projecten of voor incidenteel broncontact traceringsonderzoek bij outbreaks. Dit is echter om diezelfde reden ook nooit uitputtend voor dat doel onderzocht. Het potentieel daarvoor lijkt er wel te zijn, de typering omvat tot dusverre meer dan 3000 sequence typen die meer of minder verschillen afhankelijk van de diverse dierlijke bronnen, regio's en tijd. Dit, ondanks dat dit genen omvat die slechts kleine veranderingen toelaten (het core-genoom) maar met als voordeel dat grote herschikkingen zoals dat verder in het genoom van *Campylobacter* zeer veel voorkomt zelden kunnen slagen en dus zelden worden aangetroffen. Tegelijk houdt dit in dat variatie in deze altijd aanwezige genen slecht correleren met antigene, virulentie en survival verschillen tussen *Campylobacter*-stammen die los van deze huishoudgenen vrijelijk tussen *Campylobacter*-stammen kunnen worden uitgewisseld (het hypervariabele deel van het genoom). Het idee bestaat dat het uitbreiden van de zeven standaard huishoudgenen voor MLST met het fla-gen daar in zekere mate in tegemoet zou kunnen komen. AFLP-typering lijkt de twee werelden van het core-genoom en het hypervariabele deel in zich te verenigen en correleert in ieder geval volledig met MLST. Maar de methode is slecht te standaardiseren/digitaliseren en ook kostbaar. Bovendien is van de fragmenten de functies van de achterliggende genen onbekend en zou dus volledig geijkt moeten worden met een op sequencing gebaseerde techniek.

### **Databases**

Zie Tabel 2 en overige secties.

### **Presentatie van de gegevens**

Zie Tabel 2 en overige secties.

### **Acties**

Zie Tabel 2 en overige secties.

### **Geschatte kosten van de huidige surveillance**

Voor de LSI-rapportage wordt jaarlijks € 30.000 gereserveerd als declaratie voor de registrerende laboratoria. Eenzelfde bedrag wordt gereserveerd voor MLST-typering van enkele honderden humane isolaten ten behoeve van bronnenattributie.

### Lacunes in huidige kiemsurveillance

De volgende problemen spelen er met de huidige surveillance van *Campylobacter*:

- A.** Er is geen systematische kiemsurveillance van humane, veterinaire en omgevingsbronnen. Buitenlands onderzoek maakt duidelijk dat kiemsurveillance in combinatie met MLST-typering handvatten geeft voor het doorgronden van de transmissie van *Campylobacter* (71-74) en het volgen van de effecten van bestrijdingsmaatregelen.
- B.** Er is geen voor epidemiologische doeleinden bruikbare subtypering. Dit maakt dat zelfs middelgrote verheffingen zelden worden opgemerkt en brontracering met de gebruikelijke laboratoriummethoden niet mogelijk is.
- C.** In tegenstelling tot de meeste Europese landen is *Campylobacter* in Nederland niet aangifteplichtig en zijn de volledigheid, tijdigheid (een tot vijf weken), dekking (52%), epidemiologische en klinische informatie derhalve beperkt.
- D.** Doordat *Campylobacter* niet aangifteplichtig is moet bij uitbraken een langdurig proces van toestemmingen doorlopen worden (laboratorium, huisarts) voordat contact mag worden gelegd met de patiënt. Dit beperkt de effectiviteit van elk nader onderzoek aan *Campylobacter*.
- E.** Het ontbreekt de laboratoria aan duidelijke richtlijnen voor optimale diagnostiek van thermotolerante *Campylobacters* waardoor informatie over andere *Campylobacters* dan *C. jejuni* en *C. coli* niet verkregen wordt.
- F.** De plaats van moleculaire diagnostiek voor *Campylobacter*-infecties dient nog vastgesteld te worden
- G.** Er is geen gestandaardiseerde gevoeligheidsbepaling voor *Campylobacters*, wat aanleiding geeft tot onjuiste informatie over landelijke resistentie data (62).

### Nut van typering voor besluitvorming in voedselveiligheid

Zie de sectie *Relevantie van een kiemsurveillance voor de volksgezondheid en potentiële interventiemaatregelen*.

### Conclusies

1. Continuering van de surveillance van humane *Campylobacter*-infecties is noodzakelijk voor een tijdige signalering en adequate bestrijding/onderzoek van outbreaks van *Campylobacteriose*.
  - Aanpassing van regelgeving is noodzakelijk om sneller de patiënt te mogen bereiken voor brononderzoek bij explosies.
2. Kiemsurveillance uit zowel humane als veterinaire én omgevingsbronnen is noodzakelijk voor epidemiologisch onderzoek, transmissieonderzoek en attributieanalyses en is verplicht voor EU-rapportages.
  - Ook de resistentie monitoring is daarom noodzakelijk.
3. Naast kweek is de uitbreiding van de typeringstechnieken met epidemiologisch bruikbare moleculaire-typering belangrijk voor het detecteren en onderzoeken van explosies, bronopsporing en -attributie en Europese samenwerking.

<b>Mogelijke toepassingen van moleculaire typering in surveillance van <i>Campylobacter</i></b>	
Detectie van (diffuse) uitbraken	Ja
Bronattributie	Ja
Tracering in voedselketen	Ja
In kaart brengen van (zoönotische) transmissieroutes	Ja
Pathogeen-eigenschappen: (niet-)zoönotische typen, verschillen in pathogeniciteit	Ja

## 4.2 Clostridium difficile

### Auteurs

Dr. D.W. Notermans (RIVM), dr. B.H.B. van Benthem (RIVM), drs. M. Hensgens (LUMC) en dr. E.J. Kuijper (LUMC)

### Inleiding

*Clostridium difficile* is een bekende ziekenhuisbacterie, geassocieerd met het gebruik van antibiotica. Het ziektebeeld varieert van een milde diarree tot een levensbedreigende pseudomembraneuze colitis. Vroeger werd het ziektebeeld beschreven als '*C. difficile* associated diarrhoea (CDAD)', maar tegenwoordig veelal als '*C. difficile* infection (CDI)'. De ziekte wordt veroorzaakt door de uitscheiding van enterotoxines door *C. difficile* (75).

PCR-ribotype 027 is een virulente *C. difficile*-stam, die de afgelopen jaren in de Verenigde Staten en Canada tot epidemieën in ziekenhuizen heeft geleid. In 2005 werd bekend werd dat dit ribotype ook in Engeland in veel ziekenhuizen epidemieën veroorzaakte en werd het ook in Nederland geconstateerd (76). *C. difficile* PCR-ribotype 027 veroorzaakt vaker een ernstig ziektebeeld van CDI met ook een verhoogde mortaliteit, door een twintigmaal hogere productie van toxine A en B door een deletie in het downregulerende gen TcdC (77). Ook wordt een aanzienlijk hoger percentage recidieven (47%) gezien dan bij CDI door andere ribotypen (20%) (78). Behalve in ziekenhuizen is het type 027 ook in verpleeghuizen gevonden waar het ook enkele uitbraken heeft veroorzaakt (79). De afgelopen jaren is het aandeel van PCR-ribotype 027 dat door het typeerlaboratorium in het Leids Universitair Medisch Centrum (LUMC) is gevonden, gedaald van 68% in 2005 naar 3% in 2009. Type 001, 014 en 078 worden de afgelopen jaren in toenemende mate gevonden in Nederland, in 28%, 9% en 9%, respectievelijk, van de getypeerde isolaten in 2009 (80). Ook in een Europese surveillancestudie in 2009 werden deze drie typen het meest frequent gevonden (81).

Ofschoon CDI van oudsher beschouwd werd als een ziekenhuisprobleem, is de afgelopen jaren ook gezien dat CDI buiten het ziekenhuis kan worden opgelopen. Met de opkomst van type 078 is verdere aandacht gekomen voor de mogelijke zoönotische en voedseloverdraagbare aspecten van CDI (79, 82, 83). Zo blijkt dit type 078 ook veelvuldig bij biggen voor te komen en diarree te veroorzaken, een bevinding zowel in Nederland als in andere landen gedaan (84-87). Bij kalveren lijkt dit type ook ziekte te kunnen veroorzaken (84, 88). Op diverse soorten vlees en zelfs op rauwe groente is *C. difficile* aangetroffen, zowel type 078 als andere typen (89-92). Nadere typering met MLVA laat zien dat de type 078-isolaten van varkens en van mensen zeer nauw verwant zijn, wat een directe transmissie, dan wel een gemeenschappelijke bron suggereert (86, 93).

Het type 078 beschikt over dezelfde microbiologische virulentie-eigenschappen als type 027 en kan hetzelfde ernstige ziektebeeld geven. Het wordt echter gevonden bij wat jongere patiënten en komt vaker voor bij niet (recent) in het ziekenhuis opgenomen patiënten (94). Interim resultaten van een ZonMW-onderzoek (2009-2013) van LUMC, CIB en Universiteit van Utrecht naar de verwekkers van diarree bij patiënten die een huisarts bezoeken, laat zien dat in ongeveer 2% *C. difficile* wordt gevonden (95). Hierbij is in ongeveer 40% geen duidelijke predisponerende factor zoals voorafgaand antibioticagebruik. Het meest voorkomende type was type 078. Ook laten de interim resultaten van een onderzoek bij varkenshouders zien dat bij hen dragerschap van type 078 zeer frequent voorkomt.



### **Relevantie van de kiemsurveillance voor de volksgezondheid en potentiële interventie maatregelen**

1. Een tijdige signalering van nieuwe typen en de daarmee geassocieerde virulentie en incidentie en de daaropvolgende maatregelen kunnen de ziektelast van *C. difficile* in Nederlandse zorginstellingen beperken. De afgelopen vijf jaar hebben aangetoond dat introductie van nieuwe virulente ribotypen een reële bedreiging vormt voor onze in toenemende mate vergrijzende (ziekenhuis)populatie.
2. Inmiddels zijn er ook berichten verschenen dat ruim een derde van de patiënten met CDI buiten de zorginstelling, geen bekende risicofactor voor CDI hebben, zoals een onderliggende ziekte, recente ziekenhuisopname of antibioticagebruik (96, 97). Dit betekent dat de eerstelijnsgezondheidszorg steeds vaker te maken krijgt met CDI bij patiënten met diarree buiten een zorginstelling verworven. De typen die hierbij worden geïsoleerd, wijken af van de typen die in zorginstellingen worden gevonden. Er zullen richtlijnen moeten komen om huisartsen te helpen gericht onderzoek naar CDI in te stellen bij karakteristieke ziektebeelden.
3. Met de herkenning van door *C. difficile* veroorzaakte diarree onder diverse diersoorten en de aanwezigheid van de bacterie op voedsel parallel aan de toegenomen humane incidentie van type 078 met grote genetische verwantschap tussen dierlijke en humane isolaten, is verder onderzoek naar transmissiewegen belangrijk.

### **Huidige kiemsurveillance**

Sinds juli 2005 kunnen ziekenhuizen en medisch microbiologische laboratoria op epidemiologische en/of klinische gronden isolaten of toxinepositieve faeces insturen voor nadere typering. Ziekenhuizen waar type 027 is aangetoond kunnen enkele monsters inzenden om het verdere beloop te volgen. Dit is nog steeds mogelijk. Daarnaast heeft van 2006 tot en met 2009 in zestien ziekenhuizen een ZonMW gefinancierd epidemiologisch onderzoek gelopen naar *C. difficile*, waarbij de deelnemende ziekenhuizen isolaten konden insturen voor typering.

Sinds juni 2009 is de surveillance van *C. difficile* gewijzigd. Deze was voorheen gericht op ziekenhuisuitbraken met verdenking op ribotype 027. In de huidige opzet is een over het hele land verspreide selectie van ziekenhuizen gevraagd te participeren. In het kader van de surveillance wordt van elke patiënt of episode een monster ingestuurd voor verdere typering door het LUMC. Naast klinische gegevens van cases worden ook maandelijkse incidenties verzameld. Sinds begin 2010 doen hier twintig ziekenhuizen aan mee.

### **Responsetijd van huidige kiemsurveillance**

Bij het insturen van monsters voor typering wordt ernaar gestreefd om binnen vijf dagen een uitslag per e-mail te rapporteren. Indien het PCR ribotype 027 wordt geconstateerd, is er een telefonisch contact met de arts-microbioloog waarbij tevens support van het CIB en LUMC wordt aangeboden.

### **Isolaten**

De afgelopen jaren zijn antigeentesten en meer recent PCR direct op faeces als diagnostische methoden steeds belangrijker geworden. Toch hebben sinds 2005 veel laboratoria de kweek geïntroduceerd om stammen beschikbaar te krijgen voor nadere typering uit positief getest materiaal.

### **Typering**

Voor Nederland is de standaard typeringsmethode PCR-ribotypering, waarmee meer dan driehonderd verschillende typen kunnen worden onderscheiden. Hiervoor wordt met PCR de intergenic spacer regions tussen het 23S en het 16S rRNA-gen geamplificeerd. Door variatie in lengte van deze multipel aanwezige regio ontstaat na gelelektroforese een bandenpatroon (98, 99). Dit kan tegenwoordig ook geanalyseerd worden door middel

van capillaire elektroforese op een DNA-sequencer (100). Een centrale database van typen is aanwezig bij het 'anaeroob' referentielaboratorium in Cardiff van de Engelse Health Protection Agency (HPA). Het ECDC heeft aan het LUMC, RIVM/CIB en Cardiff financiële ondersteuning gegeven om een Europees netwerk op te richten dat aansluit bij TESSY en gebruik gaat maken van een gestandaardiseerde CE-PCR ribotypering. Hiervoor is inmiddels ook met het CDC contact gelegd. Verder onderscheid binnen PCR-ribotypen kan gemaakt worden met MLVA (101).

#### **Presentatie van gegevens**

1. Terugrapportage van typeringsresultaten per isolaat naar inzenders.
2. Jaarlijkse meeting met de deelnemende centra om de gegevens te presenteren en bediscussiëren.
3. Bij uitbraken een volledige karakterisering van de toxine-genen van het isolaat en een MLVA-typering.
4. Jaarlijks overzicht in vorm van een wetenschappelijke rapportage aan alle deelnemende centra.
5. Publicaties in (inter)nationale tijdschriften volgend uit verschillende onderzoeksprojecten en trendanalyse.

#### **Geschatte kosten van de huidige kiemsurveillance**

Voor 2011 is een bedrag gereserveerd van € 93.000 vanuit het CIB voor het LUMC voor *C. difficile*-typering.

#### **Lacunes in huidige kiemsurveillance**

Met de huidige opzet van de landelijke surveillance worden in circa 20% van de ziekenhuizen systematisch alle *C. difficile* monsters getypeerd. De huidige surveillance vindt plaats in over het land verspreide ziekenhuizen.

#### **Nut van typering voor besluitvorming in voedselveiligheid**

De precieze betekenis van de bevindingen van *C. difficile* bij vee en op voedsel voor de epidemiologie is niet duidelijk. Er zijn discrepanties van de bevindingen van het voorkomen van *C. difficile* in voedselproducten tussen de Verenigde Staten, Canada en Europa. De overeenkomst tussen PCR-ribotype 078 van humane en van varkensoorstamming met behulp van aanvullende typering (MLVA), suggereert een directe transmissieroute of een gemeenschappelijke bron.

De situatie vertoont veel parallellen met de vee-gerelateerde MRSA en de ESBL-bevattende *Escherichia coli*-stammen bij kippen. Bij verder gezonde mensen kan blootstelling wel tot dragerschap leiden maar deze is in verreweg de meeste gevallen asymptomatisch. Meestal pas bij bijkomende problemen, ziekenhuisopname, antibioticagebruik veroorzaken deze bacteriën problemen.

#### **Conclusies**

Nadat in 2005 bleek dat het virulentere *C. difficile* type 027 in Nederland in een aantal ziekenhuizen ook tot aanzienlijke problemen leidde is de alertheid op CDI sterk toegenomen. In de afgelopen periode zijn de epidemieën van ribotype 027 beteugeld maar is een toename van het nieuwe, eveneens virulente, met veehouderij geassocieerde ribotype 078 gesignaleerd. Ook lijkt CDI buiten de zorginstellingen voor te komen bij patiënten die niet duidelijk een risicofactor bezitten. De huidige surveillance in een groot aantal verspreide ziekenhuizen geeft inzicht in de ziektelast door *C. difficile* en de daarmee geassocieerde PCR-ribotypes.

<b>Mogelijke toepassingen van moleculaire typering in surveillance van <i>C. difficile</i></b>	
Detectie van (diffuse) uitbraken	Ja
Bronattributie	Nee
Tracering in voedselketen	Nee
In kaart brengen van (zoönotische) transmissieroutes	Ja*
Pathogeen-eigenschappen: (niet-)zoönotische typen, verschillen in pathogeniciteit	Ja

\*via onderzoek

### 4.3 **Coxiella burnetii**

#### **Auteurs**

Dr. I. Janse (RIVM), dr. D.W. Notermans (RIVM), dr. A. de Bruin (RIVM) en dr. B.J. van Rotterdam (RIVM)

#### **Inleiding**

Q-koorts is een bijna uitsluitend van dier op mens overdraagbare, zeer besmettelijke zoönose, veroorzaakt door de bacterie *C. burnetii* die wereldwijd voorkomt. Vele gedomesticeerde en wilde dieren, inclusief zoogdieren, vogels, reptielen en geleedpotigen kunnen drager zijn van deze ziekteverwekker, maar runderen, geiten en schapen zijn de belangrijkste reservoirs. Bij deze dieren is de infectie normaal gesproken asymptomatisch, met uitzondering van een toename van abortussen of doodgeboorte.

Zowel symptomatische als asymptomatische dieren kunnen grote hoeveelheden *C. burnetii* uitscheiden bij de bevalling. Ook via feces, melk en urine kan *C. burnetii* uitgescheiden worden. *C. burnetii* is bestand tegen hitte, uitdroging en veel ontsmettingsmiddelen. Deze eigenschappen zorgen ervoor dat het organisme in staat is om langere periodes te overleven in het milieu en door de wind verspreid kan worden. Teken kunnen belangrijk zijn in de transmissie onder wilde dieren, en kunnen ook infecties verspreiden naar gedomesticeerde herkauwers. In Nederland is er echter geen aanwijzing dat teken hierin een belangrijke rol spelen (102).

Bij de mens komt Q-koorts voor in een acute vorm (onder andere pneumonie en hepatitis) of in een ernstige chronische vorm (onder andere endocarditis of bloedvat-infectie) die volgt op een eerdere infectie die onopgemerkt kan zijn gebleven. In de acute vorm is de ziekte goed te behandelen met antibiotica; voor de chronische vorm is zeer langdurige behandeling met antibiotica nodig. De meeste besmettingen bij mensen gebeuren na blootstelling aan herkauwers, met name wanneer de dieren zijn bevallen. Mensen raken voornamelijk besmet via aerosolen, sporadisch speelt ook de overdracht door onder andere tekenbeten, via de huid, en door inname van ongepasteuriseerde melk of ander besmet materiaal een rol. Transmissie via melk of melkproducten speelt waarschijnlijk een verwaarloosbare rol (103, 104). Orale transmissie is waarschijnlijk veel minder effectief dan respiratoire. Bij de huidige epidemie in Nederland blijkt dat de meerderheid van de gevallen bij de mens niet gebonden zijn aan bezoeken of beroepsmatige blootstelling op boerderijen. Verschillende locaties van clusters van humane gevallen in Nederland laten zien dat er een verband bestaat met de aanwezigheid van melkgeiten- en schapenbedrijven in deze gebieden (105, 106).

De huidige epidemie in Nederland begon met bijna tweehonderd bevestigde ziektegevallen in 2007. In 2008 kwam de epidemie groter terug en over een breder gebied verspreid. Er werden duizend patiënten met Q-koorts gemeld, vooral uit het zuidoosten van het land. Er werd een aantal maatregelen genomen, hygiënische regels aan de mestverwerking en vrijwillige vaccinatie van melkgeiten in een beperkt gebied. Begin 2009 werden deze maatregelen uitgebreid met verplichte vaccinatie van alle melkgeiten en -schapen in heel Noord-Brabant en enkele aangrenzende gebieden, verplichte hygiënische voorzorgen voor alle melkgeiten en -schapenkudden in heel Nederland, controle van knaagdieren, behandeling van mest en beperking van mens-geitcontacten. Desondanks was de epidemie in 2009 weer groter en werden (nog steeds voornamelijk uit de zuidelijke provincies) ruim 2300 ziektegevallen van Q-koorts gemeld. Eind 2009 werd besloten tot de eenmalige maatregel om alle drachtige dieren op Q-koortspositieve melkgeiten- en melkschapenbedrijven te ruimen. Daarnaast geldt voor meer dan 55.000 vrouwelijke dieren een levenslang fokverbod. Het aantal gemelde

Q-koorts ziektegevallen is in 2010 (503 tot en met 21 december, waarvan 393 met een eerste ziektedag in 2010) duidelijk lager dan in 2008 en 2009, en er deed zich geen piek voor in de meldingen na het lammerseizoen. Ook in 2010 lag het aantal meldingen aanzienlijk hoger dan wat in 2007 als 'zeer hoog' ervaren werd. Voor 2011 lijkt het aantal lager uit te komen. Voor alle getallen zie [http://rivm.nl/Onderwerpen/Ziekten\\_Aandoeningen/Q/Q\\_koorts](http://rivm.nl/Onderwerpen/Ziekten_Aandoeningen/Q/Q_koorts).

### **Relevantie van de kiemsurveillance voor de volksgezondheid en potentiële interventie maatregelen**

Voor de behandeling van patiënten is typering niet van belang, want er bestaat geen gedifferentieerde behandeling afgestemd op verschillende typen *C. burnetii*.

*Coxiella burnetii* DNA kan aangetoond worden in veel landbouwhuisdieren, wilde dieren en in het milieu (107). Ook is in commercieel verkrijgbare melk en melkproducten *Coxiella* DNA aantoonbaar, zowel in Nederland als in de Verenigde Staten (108, 109). Een nauwkeurig onderscheid tussen typen zou het opsporen van bronnen en nemen van interventie maatregelen kunnen vergemakkelijken. Typering is ook van belang om te kunnen nagaan of bepaalde typen vooral geassocieerd zijn met bepaalde gastheren.

Bronopsporing gebeurt op het moment door het leggen van epidemiologische verbanden tussen humane clusters en de aanwezigheid van vooral geitenbedrijven met een geschiedenis van abortussen en detectie van *C. burnetii* in monsters afkomstig van deze bedrijven (melk en/of vaginale swabs). Echter, een eenduidige link tussen een potentiële bron en een humaan cluster van ziektegevallen is nog nooit bevestigd met typeringsgegevens.

### **Huidige surveillance**

De huidige surveillance vindt plaats op basis van de gemelde patiënten en door een aantal gerichte seroprevalentiestudies onder diverse risicogroepen. Melding gebeurt op basis van een laboratoriumbevestigd geval met bijpassende klinische verschijnselen. De klinische verschijnselen zijn echter weinig specifiek en zijn bij een aanzienlijk aantal (ongeveer de helft) van de geïnfecteerde personen afwezig. Detectie van een *C. burnetii*-infectie wordt uitgevoerd met serologie en/of met qPCR. Dit gebeurt in verschillende ziekenhuis- en/of huisartsenlaboratoria.

De alertheid van behandelaars op mogelijke Q-koortsgevallen is in 2010 groter geworden, de vraag om microbiologische diagnostiek is groter en de diagnostische methoden zijn verbeterd, waardoor het aandeel gemiste diagnostiek kleiner is geworden. Door het toegenomen Q-koortsserologie-onderzoek, dat voorheen niet werd gedaan bij patiënten met milde klachten, komen nu ook meldingen binnen van acute Q-koorts waarbij er weliswaar een aanwijzing is voor een ooit eerder doorgemaakte infectie, maar er geen relatie hoeft te zijn met een recent ziektebeeld. Achteraf lijkt het aantal ziektegevallen in de jaren voor 2007 al aanzienlijk hoger te zijn geweest dan men toen vermoedde, omdat er in die jaren niet altijd aan Q-koorts werd gedacht, zeker niet bij mild verlopende luchtweginfecties. Een retrospectieve analyse van de ziekenhuisopnamecijfers van 2005 en 2006 suggereert dat in Nederland mogelijk kleine clusters van pneumonieën rond melkgeitenbedrijven met abortusproblematiek in zuid-oost Nederland over het hoofd zijn gezien.

Een deel van de recent geregistreerde patiënten met milde Q-koortsachtige verschijnselen kan de infectie in werkelijkheid eerder doorgemaakt hebben. Desondanks zijn er geen sterke aanwijzingen dat er nu relatief meer milde gevallen van Q-koorts zijn, want het aantal ziekenhuisopnames onder gemelde patiënten is niet afgenomen in de periode 2008-2010.

Bij geiten vindt er een continue monitoring plaats in tankmelk.

### **Responsetijd van huidige kiemsurveillance**

Niet van toepassing.

### **Isolaten**

Het kweken van *C. burnetii* is erg lastig, deels omdat het organisme intracellulair groeit en deels omdat het een als BSL3-geclassificeerd pathogeen betreft. De kweek moet daarom met strikte biologische veiligheidsmaatregelen omgeven zijn en vindt plaats op cellijnen. Celvrije kweek is wel beschreven in de literatuur, maar is moeilijk op te zetten. Er zijn in Nederland nog geen laboratoria die dit kunnen. Ook het uitwisselen van isolaten is niet makkelijk omdat het organisme geclassificeerd voorkomt op de lijst van pathogenen die mogelijk gebruikt kunnen worden voor een bioterroristische aanslag. Distributie ervan is daarmee sterk beperkt en bestellen van stammen in stammencollecties is uiterst moeilijk dan wel onmogelijk.

### **Typering**

Typering van *C. burnetii* wordt niet systematisch uitgevoerd. Of een bepaald monster getypeerd wordt en op welke manier dit gebeurt, hangt af van de herkomst van het monster. De problemen om het organisme te kweken bemoeilijken de typering ervan. Omzeilen van de kweek door direct patiëntenmateriaal te gebruiken voor moleculaire typering is in principe mogelijk, maar bij verreweg de meeste acuut geïnfecteerden is de hoeveelheid DNA in beschikbare materialen, zoals aangetoond met een detectie-PCR, te laag voor verdere typering.

Moleculaire typering op patiëntenmateriaal en op dierlijk- en omgevingsmateriaal wordt uitgevoerd in het kader van een aantal onderzoeksprojecten. Er zijn verschillende typeringsmethoden beschreven, waarvan MLVA (110-112) en MLST (113)) de meest gebruikte zijn. Voor MLVA is echter nog geen gestandaardiseerd protocol en verschillende laboratoria gebruiken verschillende loci, zodat resultaten niet één op één vergelijkbaar zijn. Voor MST is meer materiaal nodig en het is nog niet duidelijk of de resolutie van deze methode voldoende is. De resultaten tot dusverre laten zien dat er maar een beperkt aantal typen te onderscheiden is in de huidige epidemie in Nederland (111, 114, 115). Verder is er weinig bekend over welke typen er circuleren onder andere dieren dan geiten, of met de huidige typeermethoden specifieke geitenstammen te onderscheiden zijn van stammen bij koeien of schapen. Deze zaken beperken de mogelijkheden tot bronopsporing tot het niveau van individuele bedrijven in Nederland.

### **Databases**

Er zijn databases met gegevens van MLVA- en MST-analyse van *C. burnetii*-stammen. MLVA: <http://minisatellites.u-psud.fr/MLVAnet/>; MLST <http://ifr48.timone.univ-mrs.fr/>

### **Presentatie van gegevens**

RIVM-rapporten  
Wetenschappelijke publicaties

### **Acties**

Acties zijn ad hoc. Het ruimen van geitenbedrijven is gebaseerd op een combinatie van veterinaire gegevens (abortusgeschiedenis) en een tankmelkscreening op de aanwezigheid van *C. burnetii*-DNA. Er is bij deze maatregelen geen gebruikgemaakt van typeringsgegevens.

### **Geschatte kosten van de huidige kiemsurveillance**

Alle typering vindt plaats in het kader van verschillende onderzoeksprojecten die plaatsvinden in verschillende ziekenhuizen (CWZ, JBZ) en instituten (RIVM, CVI). Een schatting van de kosten is niet te geven.

### **Lacunes in de huidige kiemsurveillance**

De kennis van *C. burnetii* is beperkt doordat de ziektelast wereldwijd, maar vooral in Nederland tot voor kort zeer gering was, en doordat er moeilijk met het organisme gewerkt kan worden door de hoge pathogeniciteit en lastige kweekomstandigheden. Het organisme is aangemerkt als potentieel bioterroristisch agentia en in het kader hiervan is er de afgelopen jaren, vooral in de Verenigde Staten, onderzoek aan het organisme gedaan. Onder meer zijn de sequenties van een aantal stammen opgehelderd, hetgeen waardevolle informatie voor het verbeteren van detectie- en typeringsmethodes heeft opgeleverd.

Om een betrouwbaar en gedetailleerd overzicht te krijgen van de verschillende typen in patiënten en potentiële bronnen (onder meer verschillende diersoorten, bedrijven, geografische locaties, wild, omgeving), is veel onderzoek nodig. Beschikbare typeergegevens tot nu toe zijn vooral afkomstig van geiten en deze laten een dominant type bij verreweg de meeste dieren van verschillende bedrijven zien (115, 116). Bronattributie tot specifieke bedrijven zal daardoor waarschijnlijk niet mogelijk zijn. Het is ook niet bekend of het dominante type dat in geiten gevonden wordt zich inmiddels ook verspreid heeft naar andere diersoorten.

Verder onderzoek is ook nodig om de bestaande methoden beter op elkaar af te stemmen en om deze te verbeteren. De diverse protocollen die gebruikt worden voor klinisch, veterinaire en omgevingsonderzoek moeten beter op elkaar afgestemd worden om vergelijking van de resultaten mogelijk te maken. Afstemming tussen de verschillende uitvoerders is wenselijk op het gebied van monsteropwerking en analysetechnieken. Vooral van belang is overeenstemming over de gebruikte typeringsmethodes, en de invulling ervan. Bijvoorbeeld, wanneer MLVA-typering toegepast wordt moeten er duidelijke afspraken komen over welke loci gebruikt worden, maar ook over wat een repeat is op een bepaalde locus (welke sequentie is de basis en hoeveel variatie is toegestaan om nog als repeat te gelden). Naast afstemming is onderzoek nodig naar verbeteringen van de gebruikte technieken. Technieken om een hogere resolutie te verkrijgen, als voorbeeld kan genoemd worden een SNP-typering met voor Nederland relevante, onderscheidende SNP's. En technieken waarmee getypeerd kan worden met een kleinere hoeveelheid monster als uitgangsmateriaal. Dit laatste is van groot belang vanwege de vaak beperkende hoeveelheid materiaal.

### **Nut van typering voor besluitvorming in voedselveiligheid**

Typering met de huidige methodes zal zeer moeilijk zijn in voedselproducten door de lage te verwachten hoeveelheden materiaal. Daarbij is, zoals hierboven beschreven, de rol van overdracht van infectie via voedsel zoals melk(producten) erg twijfelachtig. Het is dan ook niet te verwachten dat typering een belangrijke rol zal gaan spelen bij besluitvorming betreffende voedselveiligheid.

### **Conclusies**

Er is op het moment alleen detectie maar geen kiemsurveillance voor *Coxiella* geïmplementeerd in Nederland. Dit betreft zowel humaan materiaal als voedsel. Typeringsmethoden voor *Coxiella* worden op het moment ontwikkeld in diverse Nederlandse onderzoeksinstituten en ziekenhuizen (MLVA-, MLST-, MST- en SNP-typering). Met een uitontwikkelde typeringsmethode gecombineerd met kiemsurveillance kan de rol van voedsel in de overdracht van *Coxiella* binnen de Nederlandse situatie in kaart worden gebracht.

<b>Mogelijke toepassingen van moleculaire typering in surveillance van <i>C. burnetii</i></b>	
Detectie van (diffuse) uitbraken	Ja*
Bronattributie van sporadische gevallen	Ja*
Tracering in voedselketen	Nee
In kaart brengen van (zoönotische) transmissieroutes	Ja*
Pathogeen-eigenschappen: (niet-)zoönotische typen, verschillen in pathogeniciteit	Ja*

\* Hiervoor is wel een verbetering van de typering noodzakelijk: hogere resolutie voor de Nederlandse genotypen



#### 4.4 Shiga toxineproducerende *Escherichia coli* (STEC)<sup>6</sup>

##### Auteurs

Dr. I.H.M. Friesema (RIVM), dr. ir. A.E. Heuvelink (NVWA), dr. E. Franz (RIVM), dr. D.W. Notermans (RIVM) en dr. W. van Pelt (RIVM)

##### Inleiding

Shiga-toxineproducerende *Escherichia coli* (STEC), waarvan STEC behorend tot serogroep O157 de meest bekende is, is de belangrijkste verwekker van hemorragische colitis en het hemolytisch-uremisch syndroom (HUS), een ernstige complicatie gekenmerkt door de trias hemolytische anemie, trombocytopenie en acuut nierfalen. Daarnaast kan het ongecompliceerde diarree veroorzaken. Aangezien er geen effectieve behandeling is, is preventie van STEC-infecties cruciaal voor de bestrijding. Infecties met STEC worden veroorzaakt door besmet voedsel, zoals (rund)vlees, rauwe melk, rauwe groenten of fruitsap, besmet water, een besmette omgeving, verspreiding van persoon op persoon, en contact met (mest van) dieren. In Nederland vormen STEC-infecties een beperkt volksgezondheidsprobleem. In de periode 1999-2009 was de incidentie van laboratoriumbevestigde STEC-O157-infecties 2,2 tot 3,5 ziektegevallen per miljoen inwoners per jaar (117), exclusief de landelijk explosies van 2005 (118), 2007 (119) en 2009 (120). De gemiddelde ziektelast door STEC O157 in de Nederlandse bevolking wordt geschat op 116 DALY's per jaar (121). Sinds december 1999 is ziekte veroorzaakt door STEC (dus niet alleen STEC O157) meldingsplichtig voor laboratoria (groep C). Door verbetering en algemene beschikbaarheid van methoden voor detectie van ook de STEC-non-O157-serotypen, worden sinds 2007 ook de STEC-non-O157 in de intensieve surveillance meegenomen. In 2008 was de dekking van de laboratoriumbevestigde STEC-non-O157 ongeveer 27% (122). Op basis van de surveillancegegevens van 2008-2009 wordt geschat dat de incidentie van STEC-non-O157 ongeveer 3,5 keer hoger is dan de incidentie van STEC-O157-infecties. De berekeningen in het Nationaalkompas zouden voor 2008 uitkomen op een ziektelast van 132 DALY's en minder dan 1 miljoen euro aan directe en indirecte ziektekosten voor STEC-O157.

Sinds april 1997 vindt een gestructureerde surveillance van zoönosenverwekkers bij landbouwhuisdieren plaats, waarbij onder meer koppels melkkoeien en vleeskalveren worden onderzocht op het vóórkomen van STEC-O157. In de periode 2000-2004 varieerde het besmettingspercentage voor melkkoeien van 9 tot 14% van de koppels per jaar. In de periode 2005-2008 lag het percentage op 4 tot 5% en in 2009 was 2% van de koppels positief. Het percentage positieve koppels vleeskalveren fluctueerde de afgelopen jaren tussen 9 en 24%, waarbij de kiem vaker wordt aangetroffen op bedrijven met rosé vleeskalveren dan op bedrijven met witvleeskalveren. Naast de surveillance bij landbouwhuisdieren wordt door de Voedsel en Waren Autoriteit ook onderzoek verricht naar het vóórkomen van STEC in vlees(producten) en andere levensmiddelen, in het kader van handhaving dan wel signalerend onderzoek. Jaarlijks worden circa 1300 tot 1400 monsters rauw vlees van verschillende herkomst onderzocht op STEC-O157 en 0 tot 2 van deze monsters positief bevonden. De pathogeen is geïsoleerd uit rundvlees, kalfsvlees, varkensvlees en schapen/lamsvlees. Bovendien worden risicovolle producten als filet americain (circa duizend per jaar) en gefermenteerde worst (circa zeshonderd per jaar) onderzocht, waarvoor eenzelfde besmettingspercentage wordt gevonden. Een enkele keer is de pathogeen ook aangetoond in ander voedsel, bijvoorbeeld in rauwe groenten (123) en ook in feces van in het wild levende dieren (124). De rol van runderen als bron voor infecties met STEC-O157 vanuit de omgeving is recent ook epidemiologisch aangetoond voor Nederland (117).

<sup>6</sup> Op basis van RIVM rapport 240031001/2006: *Surveillance van pathogenen in Nederland*, hoofdstuk 5.10 door dr. ir. A.E. Heuvelink (NVWA), dr. Y.T.H.P. van Duynhoven (RIVM) en dr. W.J.B. Wannet (RIVM)

### **Relevantie van de kiemsurveillance voor de volksgezondheid en potentiële interventie maatregelen**

Kiemsurveillance van STEC-infecties is primair van belang voor het identificeren van clusters van mogelijk gerelateerde patiënten. De afgelopen jaren hebben zich in tal van Westerse landen grote uitbraken van STEC-infectie voorgedaan. In Nederland zagen we in 2005 de eerste landelijke explosie van STEC-O157 met in totaal 21 laboratoriumbevestigde patiënten en 11 mogelijke patiënten met als meest waarschijnlijke bron filet américain (118). In 2007 was er opnieuw sprake van een landelijke explosie, ditmaal met 41 laboratorium-bevestigde patiënten en daarnaast 9 laboratoriumbevestigde patiënten in IJsland met sla als meest waarschijnlijke bron (119). In 2007 was er tevens een lokaal cluster van 9 laboratorium-bevestigde patiënten waarbij alle patiënten aangaven (mogelijk) filet américain te hebben gegeten. Filet américain was ook de meest waarschijnlijke bron in de meest recente landelijke explosie waarbij 20 laboratorium-bevestigde patiënten betrokken waren (120). Explosies met STEC-non-O157-serotypen zijn in Nederland nog niet gedetecteerd. Het (vroegtijdig) identificeren van explosies is van belang om de infectiebron op te kunnen sporen, zodat bijvoorbeeld het besmette voedsel uit de handel genomen kan worden. Een tweede doel van de kiemsurveillance is dan ook het identificeren van de waarschijnlijke bron van infectie, zowel van individuele STEC-infecties als clusters, door vergelijking van de humane stammen met STEC-stammen gevonden in verdachte dierlijke of alimentaire bronnen (125-128). Zo werd in de afgelopen jaren voor een aantal patiënten diercontact als bron aannemelijk gemaakt, wat onder andere heeft geleid tot het opstellen van een hygiëncode voor kinderboerderijen. Bij vergelijking van STEC-O157-isolaten uit Nederlandse slachtrunderen ( $n=57$ ) en HUS-patiënten ( $n=33$ ) op basis van hun faagtypen en *stx*-genotyperingsresultaten konden 21 verschillende STEC-O157-typen worden geïdentificeerd, waarvan er slechts 5 zowel bij runderen als bij patiënten werden aangetoond. Van de 33 humane isolaten waren er 30 (90,9%) van typen die ook bij runderen werden aangetoond, terwijl slechts 20 (35,1%) van de 57 runderisolaten tot typen behoorden die ook bij de patiënten werden gevonden. De overeenkomst tussen runder- en humane isolaten ondersteunt eerdere bevindingen dat runderen een belangrijk reservoir van potentieel humaanpathogene STEC-O157 vormen. Het is echter onduidelijk waarom bepaalde typen vaker worden geassocieerd met ziekte bij de mens dan andere typen. In de gerefereerde studie vormden *Stx2*-producerende stammen van faagtypen 2 en 4 circa 75% van de humane isolaten, terwijl deze typen slechts 7% van de runderisolaten deel uitmaakten.

Ten slotte is de kiemsurveillance van belang om eventuele verschuivingen in het aandeel van verschillende subtypen van STEC-O157 en andere STEC-serotypen te kunnen signaleren en bestuderen. De verschillende serotypen en subtypen kunnen verschillen in virulentie. Behalve voor continue waakzaamheid op mogelijke uitbraken, worden de resultaten van de meldingen, humane kiemsurveillance en veterinaire en voedselkiemsurveillance, jaarlijks nationaal en internationaal (EFSA/ECDC) gepubliceerd (55-57, 67, 68, 122). Bij de grote Duitse O104-uitbraak in mei 2011 heeft de kiemsurveillance zijn waarde bewezen. Ofschoon de Nederlandse O104-patiënten niet primair via de kiemsurveillance zijn ontdekt, was door de aanwezigheid van de kiemsurveillance het CIb wel in staat snel en gericht te adviseren en snelle laboratoriumconfirmatie te bieden.

### **Huidige kiemsurveillance**

In Nederland bestaat sinds 1999 een landelijk dekkende surveillance van laboratoriumbevestigde infecties met STEC-O157 en sinds 2007 een (nog) niet landelijke dekking van laboratoriumbevestigde STEC-non-O157-infecties gecoördineerd door het RIVM. Elke positieve bevinding van STEC (op basis van fecesonderzoek of serologie) wordt door het laboratorium gemeld aan de lokale GGD. Daarnaast stuurt het laboratorium de STEC-isolaten naar het RIVM voor bevestiging en typering (jaarlijks 35 tot 100 STEC-O157-isolaten naar aanleiding van een positieve kweek op (CT-)SMAC en

in 2010 van circa 300 patiënten een tot vijf isolaten na een positieve PCR of commerciële kit-uitslag, waarbij alle STEC-O-typen gedetecteerd kunnen worden). De Voedsel en Waren Autoriteit verzamelt waar mogelijk monsters op de verdachte locatie of van het verdachte voedsel van de gemelde patiënten en subtypeert de eventuele STEC-isolaten analoog aan de humane isolaten. Middels vergelijking van de subtyperingsresultaten wordt dan bepaald of het de aannemelijke bron voor infectie van de patiënt is geweest. Ten slotte worden periodiek de humane isolaten opgestuurd naar het CVI voor bepaling van de antibioticumgevoeligheid van de humane STEC-O157-stammen. Analoog hieraan worden de dierlijke en alimentaire STEC-O157 getest op antibioticumgevoeligheid door het CVI en de NVWA. Van beide worden de resultaten gepubliceerd in MARAN (66).

### **Responsetijd van huidige kiemsurveillance**

In de laatste jaren varieert het mediane interval tussen de eerste ziektedag en de datum van afname van de vragenlijst tussen de 13 en 21 dagen voor de STEC-O157-infecties. Voor STEC-non-O157 was de mediaan in september 2008 30 tot 33 dagen. Met name de (niet beïnvloedbare) tijd die verstrijkt tussen het bezoek aan de huisarts, insturen van feces en het stellen van de diagnose en de tijd die de GGD nodig heeft om de patiënt te achterhalen en te interviewen dragen hieraan bij. Door het relatief grote aantal onbevestigde PCR-positieve monsters is het moeilijk om vóór de bevestiging alle patiënten al te benaderen, waardoor vaak gewacht werd op deze bevestiging. Aangezien dit voornamelijk STEC-non-O157-patiënten betreft, ligt vooral hier de mediaan hoger. Vanaf het moment van afname van het fecesmonster zal iets meer dan een week verstrijken voor het isolaat het RIVM bereikt. Serotypering vindt vervolgens op continue basis plaats. PFGE wordt batchgewijs uitgevoerd. Bij een eventuele verdenking van een explosie/cluster op grond van epidemiologische informatie kan tussentijds een PFGE worden toegevoegd.

### **Isolaten**

Het RIVM bewaart de ingestuurde isolaten. Het bewaren van monsters en isolaten in de medisch microbiologische laboratoria verschilt per laboratorium. De isolaten opgeslagen bij het RIVM zijn opvraagbaar voor verder onderzoek. De NVWA bewaart de veterinaire en alimentaire isolaten die bij hen onderzocht zijn.

### **Typering**

De typering bestaat uit het bepalen van het O:H-serotype en het met PCR aantonen van de belangrijkste virulentiefactoren: Shiga toxine type 1- en type 2-genen, inclusief type 2f, het *E. coli* attaching-and-effacing-gen en het EHEC-hemolysine-gen. Ten slotte worden periodiek van de O157-isolaten DNA-fingerprints gemaakt door middel van PFGE om de verwantschap tussen humane isolaten onderling en met isolaten uit verdachte bronnen te kunnen bestuderen. Standaard worden DNA-fingerprints van STEC-O157-isolaten gemaakt, waarbij *XbaI* gebruikt wordt als restrictie-enzym. Dit kan waar nodig uitgebreid worden met een tweede alternatief restrictie-enzym (*BlnI*) om deze isolaten verder te subtyperen. STEC-O157 is nog steeds het meest voorkomende serotype. De belangrijkste non-O157-typen in 2007-2009 zijn O26 (14%), O113 (9%), O63 (8%), O91 (8%) en O103 (6%).

### **Moleculaire typering**

Zie Tabel 2.

Er kan worden overwogen om de karakterisering uit te breiden met MLVA (129, 130). Deze methode is onder andere geschikt gebleken om uitbraken te detecteren en is sneller, goedkoper en minder arbeidsintensief dan PFGE. Daarnaast kan complementair gebruik van MLVA en PFGE tot een verdere verfijning van de clusterindeling leiden. De gegevens kunnen eenvoudig worden gedigitaliseerd, opgeslagen en internationaal worden uitgewisseld. De beperkte stabiliteit in ruimte en tijd in klonale lijnen maakt

MLVA echter minder geschikt voor earlywarning algoritmes en bronnenattributie-analyse die gegevens over langere periodes benodigen.

Over de bruikbaarheid van MLST voor STEC is weinig bekend. Het voordeel zou kunnen zijn dat endemische en geïmporteerde stammen beter uit elkaar gehouden kunnen worden; de relevantie van de veterinaire stammen en hun voorkomen in de omgeving beter bestudeerd kan worden en een beter inzicht kan worden verkregen met betrekking tot de relatiesequences type/clonal complex en pathogeniciteit, virulentie en survival. Verschillende studies hebben genetische en fysiologische verschillen tussen *E. coli*-O157-isolaten van verschillende herkomst aangetoond en genetische markers geïdentificeerd waarvan de frequentie van voorkomen verschilt tussen *E. coli*-O157-isolaten uit enerzijds patiënten en anderzijds runderen (131).

### Databases

Uitslagen van de typering worden gerapporteerd in het LIMS. Patiënt- en typeringsgegevens kunnen worden ingebracht in de Bionumerics database PulseNet Europe (huidige species: *Listeria*, *Salmonella*, *Shigella*, *Campylobacter* en STEC) dat in 2004 gestart is door het Network of Excellence 'Med-Vet-Net', gefinancierd onder het EC 6th Framework Programme, Priority Area Food Safety and Quality. In de database kunnen PFGE-gegevens van zowel patiëntisolaten als veterinaire en voedselisolaten ingevoerd worden. Zo kunnen de fingerprints uitgewisseld worden en kan de database op regelmatige momenten centraal en geautomatiseerd geanalyseerd worden. De meldingen door de GGD-en worden geregistreerd in OSIRIS. Daarnaast worden vragenlijsten van de patiënten ingevuld die ingevoerd worden in een Access-database.

### Presentatie van gegevens

1. Terugrapportage typeringsresultaten inzender.
2. Jaarrapportage gepubliceerd in Infectieziekten Bulletin.
3. Kwartaalrapportages aantallen STEC-infecties aan ECDC.
4. Jaarrapportage aan EFSA.
5. Wetenschappelijke publicaties.

### Acties

Acties zijn ad hoc. Bij het vermoeden van een uitbraak wordt contact opgenomen met de betrokken GGD voor een meer gedetailleerd onderzoek naar de mogelijke bron. Bij één betrokken GGD ligt in principe het initiatief bij de betreffende GGD, in het geval van meerdere GGD'en neemt meestal het RIVM het initiatief voor verder onderzoek. Wanneer voedsel of contact met dieren een mogelijke transmissieroute is, wordt in Nederland ook de NVWA ingeschakeld door de betrokken GGD, of het RIVM. Dit kan ook als er sprake is van een individuele patiënt. Zie ook Tabel 2 en de overige secties.

### Geschatte kosten van de huidige kiemsurveillance

RIVM: De kosten voor de kiemsurveillance voor STEC bedragen voor 2011 € 93.000. Hiervan is € 55.000 bestemd voor labwerk en interpretatie van de labuitslagen (LIS/RIVM), hetgeen echter niet toereikend is voor het sterk toegenomen aantal inzendingen van de laatste jaren. € 38.000 is bestemd voor surveillance & analyses/jaarrapportages (EPI).

NVWA: De kosten van de alimentaire en veterinaire STEC-O157-kiemsurveillance uitgevoerd door de NVWA bedragen circa € 300.000 per jaar (inclusief bevestiging virulentiegenen; exclusief bemonsteringen), waarvan circa € 20.000 voor de PFGE-typering.

### Lacunes in huidige kiemsurveillance

- A. Detectiegraad: het is bekend dat er in Nederland een selectief testbeleid bestaat voor STEC-O157, met name gericht op jonge kinderen en/of klinische criteria zoals bloederige diarree of HUS. Dit verschilt echter van laboratorium tot laboratorium. Hoewel de testactiviteit in de Nederlandse laboratoria nog steeds gestaag toeneemt

(in 1996 werd 1,9% van alle bij de streeklaboratoria aangeboden fecesmonsters onderzocht op STEC-O157, in 2004 10%), leidt de selectie binnen aangeboden fecesmonsters en het gebruik van kweekmethoden met een relatief lage sensitiviteit tot een onderschatting van de incidentie. Met de opname van STEC-PCR in de gastro-enteritispanelen zijn meerdere laboratoria minder gaan selecteren, en testen alle binnengekomen feces op hun gastro-enteritis panel inclusief STEC. Dit leidt met name tot een verdere stijging van het aantal, non-O157, waarvan de klinische en OGZ-relevantie waarschijnlijk steeds minder is.

- B.** Bevestiging van isolaten: steeds meer laboratoria stappen over op PCR-technieken voor de detectie van STEC. Ongeveer de helft van deze isolaten (een tot vijf per patiënt) die worden ingestuurd, kunnen niet bevestigd worden. De reden hiervan is onduidelijk, al lijkt de PCR gevoeliger te zijn aangezien vooral de monsters met een hoge ct-waarde (= laag positief) niet bevestigd kunnen worden. Daarom is sinds 2011 aan de labs gevraagd om van monsters met een lage hoeveelheid DNA ( $Ct > 35$ ), die een lage kans op kweek bevestiging hebben, geen isolaten meer in te sturen voor de surveillance. Het aantal bevestigde STEC-O157-infecties is constant gebleven, over het aantal STEC-non-O157 valt nog weinig te zeggen wat stabiliteit betreft, maar het grootste probleem zijn de grote aantallen onbevestigde isolaten waarvan de status onduidelijk is.
- C.** Snelle karakterisering: Voor betrouwbaar brononderzoek en eventuele interventies bij besmettingen van voedselproducten zijn kortere intervallen in de kiemsurveillance (PFGE op continue basis) van groot belang. Hierbij dient echter een afweging te worden gemaakt of de meerkosten van frequenter uitvoeren van een PFGE opwegen tegen de baten. In voorkomende gevallen, zoals een uitbraak, kan PFGE aanvullende informatie verschaffen.
- D.** Subtypering van de isolaten met faagtypering heeft voordelen in verband met internationale vergelijkbaarheid van typeringsresultaten. Omdat het opzetten van de faagtypering en het onderhoud binnen RIVM/LIS te arbeidsintensief is, wordt de voorkeur gegeven aan het in voorkomende gevallen opsturen van isolaten voor faagtypering naar een buitenlands laboratorium (bijvoorbeeld HPA Londen, UK).

### Nut van typering voor besluitvorming in voedselveiligheid

Aangezien typering zowel voor patiënten als in voedsel wordt uitgevoerd, kan er een vergelijking plaatsvinden. Op deze wijze kunnen directe linkjes tussen patiënt en bron plausibel worden gemaakt, maar ook meer algemeen gezocht worden naar overeenkomsten en verschillen in voorkomende typen bij patiënten en in voedsel en bronnenattributie worden uitgevoerd. Dit laatste wordt momenteel nog niet gedaan.

### Conclusies

STEC-infecties vormen tot op heden in Nederland een beperkt volksgezondheidsprobleem. Echter, door het risico op het ontstaan van uitbraken en de ernst van de ziekte moet het vóórkomen nauwlettend worden gevolgd. De waarde van de huidige STEC-surveillance heeft zich reeds bewezen voor STEC-O157, door het kunnen identificeren van verschillende clusters en drie nationale uitbraken en een aantal succesvolle brononderzoeken en interventies. STEC-non-O157-infecties lijken over het algemeen minder ernstig te verlopen, maar van bepaalde serotypen is bekend dat zij wel ernstige ziekte en uitbraken kunnen veroorzaken. Bij de grote Duitse O104-uitbraak in mei 2011 was het CIb mede dankzij de kiemsurveillance in staat snel advies en laboratoriumconfirmatie te bieden. Aandachtspunten voor verbetering zijn de primaire diagnostiek (het selectieve testbeleid en de beperkte sensitiviteit van de kweekmethoden), de onduidelijke en waarschijnlijk beperkte specificiteit van het met PCR aantonen van alle toxine-gedragers, het bekorten van de verschillende intervallen en het uitbreiden van de subtyperingstechnieken.

<b>Mogelijke toepassingen van moleculaire typering in surveillance van STEC</b>	
Detectie van (diffuse) uitbraken	Ja
Bronattributie	Ja
Tracering in voedselketen	Ja
In kaart brengen van (zoönotische) transmissieroutes	Ja
Pathogeen-eigenschappen: (niet-)zoönotische typen, verschillen in pathogeniciteit	Ja

## 4.5 *Listeria monocytogenes*<sup>7</sup>

### Auteurs

Dr. I.H.M. Friesema (RIVM), dr. D.W. Notermans (RIVM/LIS), dr. ir. A.E. Heuvelink (NVWA) en dr. A. van der Ende (RBM/AMC), dr. W. van Pelt (RIVM/EPI)

### Inleiding

*Listeria monocytogenes* is een wijdverspreid ubiquitair voorkomende Gram-positieve bacterie, die in staat is om onder diverse, voor andere voedselpathogenen ongunstige, omstandigheden te overleven en te groeien. Zo kan de bacterie groeien bij koelkasttemperatuur, hoge zoutconcentraties en lage pH. Vooral kant-en-klare producten die zonder verhitting gegeten kunnen worden, kunnen daardoor een bron van humane infectie worden.

Bij volwassenen uit listeriose zich, na een incubatieperiode van drie tot zeventig dagen, meestal als meningitis, encefalitis of sepsis. Meer zeldzame vormen zijn endocarditis, conjunctivitis en gastro-enteritis (beschreven incubatieperiode voor laatste is 20 tot 31 uur). Bij infecties van het centrale zenuwstelsel zijn ernstige neurologische restverschijnselen mogelijk. Zwangeren met een *Listeria*-infectie zijn zelf veelal symptomloos of hebben een aspecifiek griepachtig ziektebeeld of koorts. Ernstige complicaties bij zwangeren zijn zeldzaam en betreffen dan met name bacteriëmie. Bij zwangeren met listeriose leidt circa een op de vijf zwangerschappen tot een spontane abortus of doodgeboorte en van de resterende, vaak premature, neonaten ontwikkelt circa twee derde neonatale listeriose. Dit betreft bij de vroege vorm (nul tot vijf dagen na geboorte) veelal pneumonie en sepsis en bij de late vorm vooral meningitis (132). Onderzoek in Nederland over de periode 1995-2003 toont dat de incidentie van listeriose laag is: twee ziektegevallen per miljoen inwoners per jaar (133). Specifiek voor klinisch ernstige meningitis en sepsis was dit één per miljoen inwoners per jaar voor elk. De incidentie van zwangerschapsgerelateerde listeriose was 1,3 tot 2,4 per 100.000 zwangerschappen met een duur van 24 weken of langer (inclusief levend en doodgeboren neonaten) (0,17 tot 0,34 per miljoen inwoners). De overall mortaliteit voor listeriose is 18%. In 2005, het eerste jaar van de intensieve surveillance, was er een piek in de incidentie (5,6 per miljoen inwoners). In 2006 en 2007 kwam de incidentie uit op 3,9 tot 4,0 per miljoen inwoners en is in 2008 verder gedaald naar 3,2 per miljoen inwoners. In 2009 is de incidentie weer iets gestegen naar 4,8 per miljoen inwoners. Het sterftepercentage was in 2005 18%, steeg in 2006 naar 28% en daalde vervolgens naar 17% in 2007, 11% in 2008 en 8% in 2009. In de periode 2005-2009 werden 21 zwangeren met listeriose gemeld, in 9 gevallen eindigde dit in een miskraam of de sterfte van een baby. Bij een groot deel van de patiënten (circa 50 tot 70%) is er sprake van een predisponerende factor, met name maligniteiten en gebruik van immunosuppressiva (133). Hoewel de ziekte in Nederland en andere Europese landen (134)relatief zeldzaam is, behoort listeriose wel tot de belangrijkste oorzaken van voedselgerelateerde sterfte (135, 136).

De berekeningen in het Nationaalkompas zouden voor 2008 uitkomen op een ziektelast van 198 DALY's en 2 miljoen euro aan directe en indirecte ziektekosten.

<sup>7</sup> Op basis van RIVM rapport 240031001/2006: *Surveillance van pathogenen in Nederland*, hoofdstuk 5.8 door dr. Y.T.H.P. van Duynhoven (RIVM), dr. W. Wannet (RIVM) en dr. A van der Ende (RBM/AMC)

### **Relevantie van de kiemsurveillance voor de volksgezondheid en potentiële interventie maatregelen**

Een combinatie van diverse subtyperingstechnieken voor *L. monocytogenes* wordt vanuit VGZ-perspectief primair van belang geacht voor het identificeren van clusters van mogelijk gerelateerde patiënten oftewel voor het opsporen van explosies. Vervolgens kunnen dezelfde technieken toegepast worden voor het identificeren van de mogelijke bron van infectie (137, 138). Besmet voedsel kan vervolgens van de markt worden verwijderd om verdere ziektegevallen te voorkomen. Een tweede doel van typering, minder relevant vanuit VGZ-perspectief, is nader onderzoek naar mogelijke verschillen in virulentie tussen verschillende subtypen van *L. monocytogenes*. Er bestaan reeds aanwijzingen voor verschillen in klinisch beloop tussen de diverse serotypen. Zo werd waargenomen dat de *case-fatality rate* relatief lager was voor de (doorgaans oudere) patiënten geïnfecteerd met serotype 1/2b, wat suggereert dat dit een minder virulente stam betreft (56). Daarentegen domineerde serotype 4b sterk bij zwangere, verder gezonde, vrouwen, wat mogelijk juist wijst op een meer virulente stam. Dit wordt gesteund door de verschillen in voorkomen van de serotypen bij patiënten en in voedsel waarbij serotypen 4b gevolgd door 1/2a de meest vóórkomende typen bij humane ziektegevallen zijn, terwijl serotypen 1/2a gevolgd door 3a het meest frequent in voedselproducten wordt gevonden (139). Uit een studie naar het vermogen van de verschillende serotypen om door slijmvliezen en het endotheel te komen, bleek serotype 4b het meest invasief, gevolgd door serotype 1/2b (140). De andere serotypen waren duidelijk minder invasief.

In de intensieve surveillance van *Listeria* zit sinds 2008 een component met vragenlijsten ingevuld door controles (117). Dit heeft de analyse van risicofactoren voor listeriose verdiept en geeft ook op termijn de mogelijkheid serotypen en sequencetypen van clonale complexen in risicoterminen te karakteriseren, met name interessant voor de beoordeling van stammen gevonden in de alimentaire surveillance. Aan de andere kant is de vragenlijst van *Listeria* verkort en volledig geïntegreerd in de OSIRIS-vragenlijst die ingevuld wordt in het kader van de meldingsplicht die sinds december 2008 geldt. Behalve voor continue waakzaamheid op mogelijke uitbraken, worden de resultaten van de meldingen, humane kiemsurveillance en alimentaire kiemsurveillance uitgevoerd door de NVWA in risicoproducten, jaarlijks nationaal en internationaal (EFSA/ECDC) gepubliceerd (56, 57, 67, 68, 141).

### **Huidige kiemsurveillance**

De huidige kiemsurveillance van *L. monocytogenes*, uitgevoerd bij het RIVM/LIS in samenwerking met het Nederlands Referentie laboratorium bacteriële meningitis (RBM) richt zich op serotypering (aantonen van thermostabiele en -labiele antigenen door middel van directe agglutinatie met behulp van specifieke anti-sera) en moleculaire typering middels PFGE. De serotypering wordt reeds vele jaren uitgevoerd, de PFGE is daar in 2004 voor een retrospectief onderzoek (1999-2003) en sinds 2005 structureel aan toegevoegd in het kader van de gestarte intensieve surveillance. In december 2008 is de Infectieziektenwet vervangen door de Wet publieke gezondheid. In deze nieuwe wet is listeriose meldingsplichtig wanneer *L. monocytogenes* is geïsoleerd uit feces, bloed of liquor of (in geval van een zwangerschap) uit materiaal van een foetus, doodgeboren kind, pasgeboren kind of de moeder. De huidige kiemsurveillance is landelijk dekkend. Naast de humane surveillance vindt ook een alimentaire surveillance plaats door de NVWA: een breed palet van risicoproducten wordt onderzocht op de aanwezigheid van *L. monocytogenes*. Uit monitorend onderzoek naar prevalenties van pathogenen op vlees van verschillende herkomst blijkt dat het percentage onverhit vlees besmet met *L. monocytogenes* (> 10 kve/g) de afgelopen jaren uiteenliep van 0,6 tot 2,3%. Omdat gerookte visproducten vaker dan andere producten worden geassocieerd met *L. monocytogenes* voert de NVWA regelmatig onderzoek uit om een actueel inzicht in de microbiologische status van deze producten te blijven behouden. In 2008 en 2009 werden in totaal 1932 monsters gerookte vis onderzocht op aanwezigheid van



*L. monocytogenes*, waarbij beide criteria zoals vermeld in de Vo. (EG) 2073/2005 werden onderzocht, te weten afwezigheid in 25 g en  $\leq 100$  kve/g. Van deze monsters bleek 17,1% positief te zijn voor deze pathogeen, waarbij in 1,3% van de monsters de norm van 100 kve/g werd overschreden. Bovendien werden in 2008 en 2009 in totaal 583 ossenworsten en 1327 gedroogde/gefermenteerde worsten onderzocht op aanwezigheid van *L. monocytogenes*. In 2008 werd deze pathogeen in zeven ossenworsten aangetroffen waarbij twee keer (0,6%) de norm van 100 kve/g werd overschreden (200 kve/g en 3800 kve/g). In 2009 bleken drie monsters ossenworst positief, maar allen onder de norm. Hoewel in 1,3% van de gedroogde/gefermenteerde worsten *L. monocytogenes* werd aangetoond (telling of detectie), werd de norm (100 kve/g) hierbij niet overschreden; het ging hierbij om droge worst / metworst. Van de 593 onderzochte monsters vleeswaren waren er 32 (5,4%) waarin *L. monocytogenes* werd aangetroffen. In geen van de onderzochte monsters werd *L. monocytogenes* boven de 10 kve/g aangetroffen. Dit onderzoek laat zien dat *L. monocytogenes* in vleeswaren wel aanwezig kan zijn, maar dat het besmettingsniveau erg laag ligt. Net als voor gerookte vis geldt, betreft de besmetting van gedroogde/gefermenteerde worsten en vleeswaren met *L. monocytogenes* een nabesmetting. Er dient te worden opgemerkt dat de door de NVWA verzamelde monsters niet op hun THT-datum zijn onderzocht. Aangezien *L. monocytogenes* kan groeien tijdens de opslag is het mogelijk dat producten die redelijk in het begin van hun houdbaarheidsperiode zijn bemonsterd en onderzocht, niet zullen voldoen aan het gestelde criterium van 100 kve/g aan het eind van hun houdbaarheidstermijn. De fenotypische en moleculaire typering en gegevensopslag van de isolaten verkregen bij de alimentaire kiemsurveillance is vergelijkbaar met die voor de humane isolaten. Jaarlijkse worden de PFGE's en serotypen van de humane en alimentaire isolaten naast elkaar gelegd op zoek naar overeenkomsten.

### **Responsetijd van huidige kiemsurveillance**

Vanaf het moment van afname van het patiëntenmateriaal (doorgaans bloed en/of liquor) verstrijken meestal een tot twee weken voor het isolaat het RIVM bereikt. De melding is dan wel in principe na één week in OSIRIS bekend. Serotypering vindt vervolgens op continue basis plaats. PFGE wordt batchgewijs uitgevoerd. Bij een eventuele verdenking van een explosie/cluster op grond van epidemiologische informatie kan tussentijds een PFGE worden toegevoegd. Deze frequentie is gebaseerd op het kleine aantal isolaten (circa vijftig per jaar), het ontbreken van een duidelijk seizoenseffect en de praktische uitvoerbaarheid (op continue basis is erg inefficiënt omdat dezelfde handelingen dan bij herhaling moeten worden uitgevoerd voor hooguit twee stammen per week).

### **Isolaten**

Het RIVM bewaart de ingestuurde isolaten. Het RBM bewaart de monsters die zij via de laboratoria ontvangt. Het bewaren van monsters en isolaten in de medisch microbiologische laboratoria verschilt per laboratorium. De isolaten opgeslagen bij het RIVM en het RBM zijn opvraagbaar voor verder onderzoek. De NVWA bewaart de alimentaire isolaten die bij hen onderzocht zijn.

### **Typering**

Binnen deze surveillance wordt 90 tot 95% van de in Nederland gevonden *L. monocytogenes*-isolaten ontvangen voor nadere typering. De meerwaarde van PFGE wordt duidelijk geïllustreerd binnen het retrospectieve onderzoek van patiëntisolaten uit de periode 1999-2003: terwijl deze isolaten op basis van serotypering werden ingedeeld in slechts zeven serotypen (96% gedekt door de drie meest voorkomende), werden deze op basis van PFGE (*AscI*), ingedeeld in 58 genotypen (133). Echter, binnen 28 clusters met ononderscheidbare PFGE-patronen, werden in twaalf clusters meerdere serotypen aangetroffen. In de huidige surveillance worden clusters van isolaten bepaald aan de hand van PFGE (*AscI* en *Apal*) én serotypering.

## Moleculaire typering

Zie Tabel 2.

**PFGE** (Pulse Field Gel Electrophoresis) is momenteel de gouden standaard voor moleculaire subtypering van *L. monocytogenes* en het herkennen van clusters. De resolutie is echter beperkt en, zoals gezegd, is voor sommige clusters ook de fenotypische typering nodig. Attributieanalyse van de humane met de alimentaire gegevensset kan alleen op basis van similariteit van het PFGE-patroon met de hand geanalyseerd worden, de relatie met het genoom is voor het bandenpatroon onbekend. Derhalve is niet op (fylo-)genetische verwantschap te attribueren, wat geautomatiseerd zou kunnen gebeuren zoals bij *Campylobacter* (74). Attributieanalyse is recent uitgevoerd voor *Listeria* in de UK (142).

**MLST** (Multi Locus Sequence Typing) kan in de toekomst mogelijk gebruikt worden voor op genetische verwantschap gebaseerde attributieanalyse. Deze op sequencing gebaseerde typeringstechniek is nog arbeidsintensief en vooralsnog duur (alhoewel bij de jaarlijkse kleine aantallen dit uiteraard meevalt en dit eenmalig met terugwerkende kracht op projectbasis ook te financieren moet zijn). Het voordeel zou kunnen zijn dat endemische en geïmporteerde stammen beter uit elkaar gehouden kunnen worden en de relevantie van de alimentaire stammen met betrekking tot pathogeniciteit, virulentie en survival-eigenschappen beter beoordeeld kunnen worden.

**MLVA** (Multilocus Variable number tandem repeat Analysis) is een andere op sequencing gebaseerde techniek. Hierbij worden in tegenstelling tot MLST, stukken van het genoom gebruikt die niet relevant zijn voor de survival van *Listeria*. Dit zou een bruikbare aanvulling kunnen zijn, zeker in explosie-situaties. Gebruik van MLVA is weinig arbeidsintensief en levert sneller resultaten, waardoor uitbraakstammen sneller kunnen worden geïdentificeerd. De gegevens kunnen eenvoudig worden gedigitaliseerd, opgeslagen en internationaal worden uitgewisseld. De beperkte stabiliteit in ruimte en tijd in klonale lijnen maakt MLVA echter minder geschikt voor earlywarning algoritmes en bronnenattributieanalyse die gegevens over langere periodes benodigen.

## Databases

Uitslagen van de typering worden gerapporteerd in het LIMS van het LIS. Patiënt- en typeringsgegevens kunnen worden ingebracht in de Bionumerics database PulseNet Europe (huidige species: *Listeria*, *Salmonella*, *Shigella*, *Campylobacter* en STEC) dat in 2004 gestart is door het Network of Excellence 'Med-Vet-Net', gefinancierd onder het EC 6th Framework Programme, Priority Area Food Safety and Quality. In de database kunnen PFGE-gegevens van zowel patiëntisolaten als veterinaire en voedselisolaten ingevoerd worden. Zo kunnen de fingerprints uitgewisseld worden en kan de database op regelmatige momenten centraal en geautomatiseerd geanalyseerd worden. De meldingen door de GGD-en worden geregistreerd in OSIRIS.

## Presentatie van gegevens

1. Terugrapportage typeringsresultaten inzender.
2. Jaarrapportage gepubliceerd in Infectieziekten Bulletin.
3. Kwartaalrapportages aantallen humane listeriose aan ECDC.
4. Jaarrapportage aan EFSA.
5. Wetenschappelijke publicaties.

## Acties

Acties zijn ad hoc. Wanneer voedsel een mogelijke transmissieroute is, kan in Nederland ook de NVWA ingeschakeld door de betrokken GGD, of het RIVM. Zie ook Tabel 2 en overige secties.

### Geschatte kosten van de huidige kiemsurveillance

RIVM: De kosten voor de kiemsurveillance voor *Listeria* bedragen € 40.000. € 20.000 voor labwerkzaamheden en interpretatie (LIS) en € 20.000 voor surveillance & analyses/jaarrapportages (EPI).

NVWA: De kosten van de alimentaire kiemsurveillance uitgevoerd door de NVWA bedragen circa € 420.000 per jaar (exclusief bemonsteringen), waarvan circa € 40.000 voor de typering.

### Lacunes in de huidige kiemsurveillance

- A. De VGZ-relevantie van de stammen uit de alimentaire surveillance is onvoldoende onderzocht. Hiertoe moeten de gegevens uit humane en (historisch bijgewerkte) alimentaire surveillance bij elkaar gevoegd worden.
- B. De typering door de combinatie serologie en PFGE heeft zo zijn beperkingen.

### Nut van typering voor besluitvorming in voedselveiligheid

Aangezien typering zowel voor patiënten als in voedsel wordt uitgevoerd, kan er een vergelijking plaatsvinden. Op deze wijze kunnen directe linken tussen patiënt en bron gelegd worden, maar ook meer algemeen gezocht worden naar overeenkomsten en verschillen in voorkomende types bij patiënten en in voedsel. Dit laatste wordt momenteel nog niet gedaan. Zie de sectie: *Relevantie van de kiemsurveillance voor de volksgezondheid en potentiële interventie maatregelen*.

### Conclusies

Bijna alle in Nederland gemelde isolaten van *L. monocytogenes* worden gekarakteriseerd door middel van sero- én moleculaire (PFGE-) typering. Door middel van een combinatie van deze typeringen zijn clusters te onderscheiden.

Gestreefd moet worden naar een nationale database voor typeringsresultaten van stammen en hun achtergrondgegevens uit zowel humane als alimentaire kiemsurveillance. Moleculaire typering gebaseerd op sequencing (MLST) zou de *Listeria*-kiemsurveillance in velerlei opzicht kunnen verbeteren, bijvoorbeeld: snelheid van typering; clusterherkenning; bronnenattributieanalyse; epidemiologisch inzicht in verschillen van (clusters van) stammen in virulentie, pathogeniciteit en survival; internationale samenwerking met betrekking tot grensoverschrijdende explosies en regionale herkomst/verspreiding van stammen.

<b>Mogelijke toepassingen van moleculaire typering in surveillance van <i>Listeria</i></b>	
Detectie van (diffuse) uitbraken	Ja
Bronattributie	Ja
Tracering in voedselketen	Ja
In kaart brengen van (zoönotische) transmissieroutes	Ja
Pathogeen-eigenschappen: (niet-)zoönotische typen, verschillen in pathogeniciteit	Ja

## 4.6 **Salmonella spp.**<sup>8</sup>

### **Auteurs**

Dr. W. van Pelt (RIVM), M. Heck (RIVM)

### **Inleiding**

*Salmonella spp.* vormen wereldwijd nog steeds een belangrijke oorzaak van gastro-enteritis (57). In Nederland werden in 2008 naar schatting 2575 gevallen van salmonellose in het laboratorium bevestigd, corresponderend met naar schatting 43.000 gevallen in de algemene bevolking en 46 sterfgevallen als gevolg van de doorgemaakte infectie. De directe en indirecte medische kosten worden geschat op ongeveer 11 miljoen euro en de ziektelast op 1040 DALYs.

Het geschatte totaal aantal laboratoriumbevestigde gevallen is gedurende de laatste tien jaar afgenomen van circa 3900 tot circa 2400 gevallen per jaar in 2009. *Salmonella* wordt frequent gevonden als verwekker bij voedselgerelateerde explosies (143-145). De explosie in de Isalaklinieken is een klassiek voorbeeld van voedselbereiding met besmette rauwe eieren in een kwetsbare groep patiënten met veel slachtoffers en enkele sterfgevallen (146). Een zeer omvangrijke, diffuus verspreide explosie vond plaats tijdens en vlak na de aviaire influenza-epidemie in pluimvee. Dankzij faagtypering en antibiotica-resistentietesten bij zowel de patiënten-isolaten als isolaten uit veterinaire en alimentaire reservoirs kon aangetoond worden dat de explosie het gevolg was van import van besmette Spaanse eieren (62). Dit heeft geleid tot het aanscherpen van de kwaliteit van de labeling naar herkomst van de geïmporteerde eieren. Om zicht te kunnen houden op de *Salmonella*-problematiek vindt een divers panel (humaan, veterinair, alimentair) aan surveillance-activiteiten plaats. Daarnaast wordt informatie verkregen uit bronnen welke minder voor de volksgezondheid relevant lijken zoals reptielen en amfibieën die steeds meer als huisdier worden gehouden (68, 147).

### **Relevantie van de kiemsurveillance voor de volksgezondheid en potentiële interventie maatregelen**

Kiemsurveillance (sero-, faag- en genotypering en resistentiebepaling) van humane *Salmonella*-isolaten is cruciaal voor early warning. Aangezien een groot deel van de *Salmonellae de serovars Enteritidis* of *Typhimurium* betreft, is zonder verdere subtypering een epidemische toename van één subtype niet te detecteren. Het in 1996 geïmplementeerde early warning algoritme maakt gebruik van sero-, faagtypering en aanvullende antibiotica-resistentiebepalingen. In de afgelopen jaren had van de bijna 1000 signalen per jaar in het signaleringsoverleg een 5% betrekking op *Salmonella*. Daarnaast worden – door toenemend internationaal verkeer en handel – steeds vaker, op het eerste oog niet-gerelateerde, *Salmonella*-clusters in verschillende Europese landen waargenomen. Bij nader onderzoek blijken deze clusters regelmatig wél aan elkaar gerelateerd en kan gericht gezocht worden naar een gemeenschappelijke bron om verdere verspreiding te voorkomen. Vaak blijkt daarbij aanvullende genotypering noodzakelijk. Elk jaar zijn er wel voorbeelden van explosies welke aanleiding hebben gegeven voor verscherpte controle (148), aangepaste regelgeving (149), die het nut tonen van moleculaire typering (150), die aanleiding gaven voor nader voedsel fysiologisch (151) of moleculair onderzoek (152) of een grensoverschrijdende problematiek hadden (153-155).

<sup>8</sup> Op basis van RIVM rapport 240031001/2006: *Surveillance van pathogenen in Nederland*, hoofdstuk 5.7, door dr. A.W. van de Giessen (CIb), dr. W. van Pelt (CIb), dr. Y.T.H.P. van Duynhoven (CIb), dr. W. Wannet (CIb)

Het materiaal heeft ook de mogelijkheid gegeven tot formeel epidemiologisch onderzoek naar risicofactoren voor salmonellose (156) en van genetische factoren die mogelijk bijdragen aan chronische sequelae na een infectie (157). Behalve voor signalering is kiemsurveillance noodzakelijk voor surveillance van trends in *Salmonella*-typen en hun resistentie, zowel bij de mens als in veterinaire en alimentaire reservoirs. Surveillance van *Salmonella*-typen en resistentie monitoring zijn daarom ook verplicht in het kader van EU-regelgeving. Hierover wordt jaarlijks gerapporteerd (56, 66-68).

Aangezien *Salmonellae* veterinair sterk gastheerspecifiek zijn, geeft informatie over sero- en faagtype direct een eerste indicatie over mogelijke reservoirs van infectie. Vanwege deze eigenschap worden de humane typeringsgegevens geïntegreerd met die van de veterinaire en voedselisolaten en jaarlijks gebruikt om de relatieve bijdragen van diverse reservoirs aan de gevallen van humane salmonellose te schatten (158, 159, Aalten, 2010). Deze informatie wordt onder andere gebruikt door de NVWA voor evaluatie van de bestrijding van *Salmonella* in de voedselproductieketens, zoals de bestrijding van *Salmonella* in de pluimveevlees- en eisector. In toenemende mate gebruikt ook EFSA typeringsinformatie voor advisering aan de Europese Commissie. Inzicht in het relatieve belang van reservoirs en transmissieroutes van *Salmonella* is noodzakelijk voor een adequate aanpak van de salmonellose-problematiek.

### Huidige kiemsurveillance

In het kader van het LSI-project vindt sero- en faagtypering plaats van alle eerste *Salmonella*-isolaten (*S. Typhimurium* en *S. Enteritidis*) ingezonden door de voormalige zestien streeklaboratoria voor de Volksgezondheid (met een landelijke dekking van 64%). Vanaf 2007 incidenteel, en met ingang van 2009 integraal, vindt er ook MLVA-typering plaats van *S. Typhimurium* wordt geëxperimenteerd met een MLVA-schema voor *S. Enteritidis*. Dit werd vooral gedaan om bij frequente faagtypen (bijvoorbeeld ST ft506, 507, 508, 510, ARS, OS) nog onderscheid te kunnen maken ten behoeve van broncontacttracering zoals met explosies (met name voor nauwkeurige internationale vergelijking) en het onderscheiden van endemische en importstammen. Sinds februari 2010 heeft MLVA volledig de faagtypering vervangen voor *S. Typhimurium*. Al veel langer vindt incidenteel aanvullende genotypering (PFGE) volgens het gestandaardiseerde PulseNetprotocol plaats (uitwisselbaar met PulseNet), met name voor het differentiëren binnen veel voorkomende serotypen en internationale vergelijking bij explosies. Met behulp van een geautomatiseerde early warning-applicatie op de surveillance-database vindt signalering plaats van verheffingen in de incidentie van *Salmonella*-infecties (tijd, geografisch en demografisch; (160, 161). In geval van bijzondere ontwikkelingen vindt melding aan de opdrachtgever plaats (via het signaleringsoverleg).

In opdracht van de Voedsel en Waren Autoriteit vindt typering plaats van *Salmonella*-isolaten uit veterinaire en alimentaire reservoirs voor bronidentificatie en attributieanalyse. Tevens wordt een selectie van de humane en niet-humane *Salmonella*-isolaten doorgestuurd naar het Centraal Veterinair Instituut voor resistentiebepaling. De typerings- en resistentiedata worden integraal geanalyseerd ten behoeve van nationale en EU-rapportages.

De humane informatie over serotype en gevoeligheidsbepalingen wordt maandelijks ook verstuurd aan het ECDC FWD (Food and Waterborne Disease) surveillance netwerk (opvolger van Enternet). Vanuit dat netwerk worden naast *yearly reports* over de stand van zaken binnen de EU met name ook veel *requests for information/action* verstuurd waarbij signalen worden gecommuniceerd tussen deelnemende landen met verzoek na te gaan of in eigen land eenzelfde situatie wordt waargenomen.

Daarnaast worden in de PVE-monitoring sinds 1998 in diverse schakels ongeveer zeshonderd koppels slachtkuikens per week op *Salmonella* onderzocht. Door de NVWA worden uit winkels nog eens 1500 vleesmonsters van slachtkuikens per jaar onderzocht en ongeveer 1200 van kalfs-, rund-, varkens- en lamsvlees en ongeveer 1300 uit rauw te consumeren rundvlees.

Op projectbasis wordt door LZO (Cib, RIVM) incidenteel onderzoek gedaan naar *Salmonella* in oppervlaktewater, verder is binnen LZO het Nationale (NRL) en het Europese (EURL) Referentie laboratorium voor *Salmonella* gesitueerd. Hoewel binnen het kader van deze referentielaboratoria geen surveillance wordt uitgevoerd, spelen ze wel een belangrijke rol in (onder andere) harmonisatie van methoden voor de surveillance in het veterinaire en alimentaire veld. In de afgelopen vijf jaren werd in de EU-lidstaten een baseline survey uitgevoerd naar de prevalentie van *Salmonella spp.* in koppels leghennen (2004-2005), vleeskuikens (2005-2006), kalkoenen (2006-2007), slachtvarkens (2006-2007), fok- en vermeerderingsvarkens (2008) en vleeskuikenkarkassen (2008). In 2008 liep voorts bij NVWA/RIKILT een omvangrijke surveillance in groente en in 2009 in kruiden. Binnen het EU FP6 project 'Biotracer' zijn typeringen uitgevoerd en tevens nieuwe methoden ontwikkeld, op basis van micro-array, voor het typeren van *Salmonella*. Wat de subtypering van *S. Typhimurium* betreft moet nog onderzocht worden of de als alternatief toegepaste MLVA-typering antwoord geeft of kan geven op alle vragen.

### **Responsetijd van huidige kiemsurveillance**

Met behulp van de early warning-applicatie op de surveillance-database vindt signalering plaats van verheffingen in de incidentie van *Salmonella*-infecties. Deze signalering vindt circa twee tot drie weken na het optreden van de eerste ziektegevallen plaats. Bijzondere verheffingen worden besproken in het signaleringsoverleg en zo nodig gemeld aan de opdrachtgever ten behoeve van bronopsporing en/of *outbreak investigation and management*.

### **Isolaten**

Zie Tabel 2 en overige secties.

### **Typering**

Zie Tabel 2.

**PFGE** (Pulsed Field Gel Electrophoresis) is veel gebruikt om probleem E1 (zie lacunes in de huidige kiemsurveillance) aan te pakken. Deze methode is inmiddels goed internationaal gestandaardiseerd en sluit aan bij die van PulseNet. De methode is tijdrovend. De methode kan inzicht geven in de fylogenetische verwantschap van stammen.

**MLVA** (Multilocus Variable number of tandem repeats Analysis) wordt in Europa toenemend gebruikt, met name voor *S. Typhimurium*. Voor *S. Enteritidis* en voor de hele groep van serotypen wordt in sommige landen deze methode nog uitgetest. Deze moleculaire methode is snel, relatief goedkoop, eenvoudig te digitaliseren en in databases op te slaan en is zeer reproduceerbaar. De keuze van loci voor MLVA is echter serovarspecifiek, zodat de MLVA voor *S. Typhimurium* niet geschikt is voor *Enteritidis*. Het MLVA-patroon verandert echter vrij snel binnen klonale lijnen waardoor stammen van outbreaks met een gemeenschappelijke bron in regio en tijd snel substantieel kunnen gaan verschillen. De methode is wellicht ongeschikt voor bronnenattributie of early-warning algoritmes welke gebruik maken van enige jaren historisch materiaal. Bij een *S. Typhimurium*-explosie van een mogelijk grensoverschrijdend karakter wordt in Europa momenteel zo veel mogelijk, zowel het faagtype, het antibiogram, het PFGE-patroon als ook het MLVA-patroon gemeld in een *request for information* via het FWD-netwerk door het ECDC.

**MLST** (Multilocus Sequence Typing) is erg duur maar reproduceerbaar en digitaliseerbaar. MLST richt zich op huishoudgenen en zou als nadeel hebben dat het de nieuwe klonale lijnen te weinig kan volgen. Deze moleculaire methode blijkt echter recent, afhankelijk van de keuze van de genen, tussen en binnen serotypen te differentiëren onder andere binnen *S. Typhimurium* en *S. Enteritidis*. Aangezien de

methode de fylogenie van *Salmonella* laat reconstrueren aan de hand van een omvangrijke internationale referentie isolatenbank, kan met behulp van slim gekozen SNP's een veel goedkopere en snellere typeermethode dan MLST worden ontwikkeld voor de typering.

### Databases

Zie Tabel 2 en overige secties.

### Geschatte kosten van de huidige kiemsurveillance

De kosten van de kiemsurveillance van humane *Salmonella*-isolaten bedragen circa € 125.000 per jaar (op basis van circa 2000 isolaten per jaar). Sinds 2006 worden de kosten van de typering gedragen door VWS/CIb. De kosten voor de kiemsurveillance van de veterinaire *Salmonella*-isolaten komen ten laste van de NVWA en bedroegen in 2010 € 125.000. Daarnaast vindt typering plaats in opdracht (op ad-hoc basis) voor diervoeders, exotische dieren en een diversiteit aan isolaten uit monsters genomen voor de quality assurance van voedselproducerende bedrijven.

### Lacunes in de huidige kiemsurveillance

Er spelen enkele problemen met de huidige kiemsurveillance van *Salmonella*:

- A. De beperkte dekking van de Nederlandse bevolking (64%) en dito van met name runderen en kalveren (lage aantallen en meestal van zieke dieren). Ook representativiteit is een probleem.
- B. Het grote tijdsverschil tussen monsternamen, isolatiedatum en gereedkomen van de typering. Dit bedraagt twee tot drie weken.
- C. Doordat *Salmonella* niet aangifteplichtig is moet bij uitbraken een langdurig proces van toestemmingen doorlopen worden (laboratorium, huisarts) voordat contact mag worden gelegd met de patiënt. B en C hebben een dramatisch effect op de slagkracht bij de bestrijding.
- D. Steeds meer laboratoria doen in het kader van de kwaliteitscontrole van voedselproducenten zelf de typering en laten dit niet meer op het RIVM doen. Naast de beperkte kwaliteit van die typering verdwijnt centraal ook het zicht op de circulatie van typen in de diverse bedrijfstypen wat de broncontacttracering voor de mens beperkt.
- E. De fenotypische typering van *Salmonella*:
  1. Weinig differentiatie is mogelijk binnen de serotypen anders dan *S. Enteritidis* en *S. Typhimurium*. Wat in voorkomende gevallen kan leiden tot verwarring (vooral ook internationaal) zoals bij *S. Paratyphi B var Java*.
  2. *S. Enteritidis Pts* zijn zeer divers bruikbaar voor broncontacttracering.
  3. De Nederlandse faagtypering wordt niet meer uitgevoerd.
  4. Het Nederlandse faagtyperingssysteem voor *S. Typhimurium* is door gebrek aan menskracht en kennis niet meer geschikt om bronnen en contacten te kunnen onderscheiden. Sinds februari 2010 is daarom overgegaan op MLVA-typering van *S. Typhimurium*.

### Nut van typering voor besluitvorming in voedselveiligheid

Zie met name de sectie: *Relevantie van de kiemsurveillance voor de volksgezondheid en potentiële interventie maatregelen*.

### Conclusies

1. Continuering van de kiemsurveillance van humane *Salmonella*-isolaten is noodzakelijk voor een tijdige signalering en adequate bestrijding van outbreaks van salmonellose.
2. Typering van *Salmonella*-isolaten uit veterinaire én alimentaire reservoirs is noodzakelijk voor epidemiologisch onderzoek, attributieanalyses en verplichte EU-rapportages.

- Ook de samenwerking met het CVI op het gebied van resistentie monitoring dient daarom te worden voortgezet.
3. Naast serotypering en faagtypering voor *S. Enteritidis* (en *S. Typhimurium*) is de uitbreiding van de typeringstechnieken met moleculaire typering belangrijk voor Europese samenwerking en met betrekking tot bronopsporing.
    - Moleculaire typering is ook noodzakelijk om geïmporteerde typen te kunnen herkennen en de herkomst, het ontstaan en verdwijnen van endemische typen te kunnen begrijpen. Er moet gekeken worden naar een typeermethode of een combinatie daarvan om alle vragen te beantwoorden.
  4. Aanpassing van regelgeving is noodzakelijk:
    - om centraal zicht te kunnen houden op circulerende typen gevonden door perifere quality assurance laboratoria;
    - sneller de patiënt te mogen bereiken voor brononderzoek bij explosies.

In zijn algemeenheid zijn snellere, niet-kweekafhankelijke, moleculaire detectiemethoden noodzakelijk om binnen de voedselproductieketen sneller en efficiënter te kunnen ingrijpen. (Bayesiaanse) methoden voor realtime monitoring van de slachtlijn kunnen dan ook in de praktijk worden benut (162). Meer inzicht is nodig in de fylogenetische verwantschappen binnen *Salmonella*. Met name bij *S. Enteritidis* en *S. Typhimurium* zal dit meer inzicht geven over het ontstaan/introductie en verdwijnen van nieuwe subtypen.

<b>Mogelijke toepassingen van moleculaire typering in surveillance van <i>Salmonella</i></b>	
Detectie van (diffuse) uitbraken	Ja
Bronattributie	Ja
Tracering in voedselketen	Ja
In kaart brengen van (zoönotische) transmissieroutes	Ja
Pathogeen-eigenschappen: (niet-)zoönotische typen, verschillen in pathogeniciteit	Ja



## 4.7 Methicilline resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA)<sup>9</sup>

### Auteurs

Dr. X.W. Huijsdens (RIVM), dr. A.W. van de Giessen (RIVM), dr. A.J. de Neeling (RIVM)

### Inleiding

*Staphylococcus aureus* is een bacterie, die bij circa 30% van de mensen buiten het ziekenhuis in de neus voorkomt. Onder bepaalde omstandigheden kan *S. aureus* ziekte veroorzaken. Buiten het ziekenhuis veroorzaakt *S. aureus* huidinfecties waaronder impetigo, steenpuisten en andere ziektes zoals vaginitis (tamponziekte), conjunctivitis, endocarditis en vooral na een voorafgaande griepinfectie, longontsteking met sepsis die dodelijk kan zijn. *S. aureus* is verder een belangrijke en gevreesde verwekker van ziekenhuisinfecties en kan postoperatieve wondinfecties en infecties gerelateerd aan kunstmaterialen, bijvoorbeeld intraveneuze lijnsepsis en infecties van kunstgewrichten geven.

Bij de behandeling van de *S. aureus*-infecties wordt vaak gebruikgemaakt van beta-lactamase resistente penicillines, waaronder flucloxacilline en het nauwverwante oxacilline. Stammen van *S. aureus* die resistent zijn tegen oxacilline, worden methicilline resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA) genoemd. We nemen aan dat MRSA resistent is tegen alle beta-lactam-antibiotica (penicillines en cefalosporines).

Uit onderzoek is gebleken dat slechts 0,03% van de personen die in een Nederlands ziekenhuis werd opgenomen, een MRSA bij zich droeg. Indien deze populatie representatief zou zijn voor heel Nederland, betekent dit, dat er ongeveer 5000 MRSA-dragers in Nederland zijn. Het European Antibiotic Resistance Surveillance Network (EARS-Net) monitort de resistentie van *S. aureus* uit bloedkweken. In veel andere landen, waaronder ook in onze buurlanden, wordt een veel hogere MRSA-prevalentie gevonden. Nederlandse ziekenhuizen voeren daarom een *search and destroy*-beleid, waarbij patiënten met een verhoogd risico voor MRSA-dragerschap worden geïsoleerd en gescreend.

Intensieve surveillance is een belangrijk instrument om nieuwe bronnen van MRSA en eventuele verheffingen snel te kunnen ontdekken en te onderzoeken. Op basis van de resultaten van deze surveillance kunnen vervolgens adviezen gegeven worden om de huidige richtlijnen met betrekking tot de bestrijding van MRSA te toetsen en eventueel aan te passen.

### Relevantie van de kiemsurveillance voor de volksgezondheid en potentiële interventie maatregelen

De beslissing te interveniëren in de kliniek is mede afhankelijk van de vraag of stammen van verschillende patiënten eenzelfde DNA-type hebben, wat wijst op overdracht van MRSA van de ene patiënt op de andere. Interventies die gepleegd kunnen worden zijn: het geïsoleerd verplegen van MRSA-dragers, het opleggen van een tijdelijk werkverbod aan MRSA-positieve medewerkers en het behandelen van dragers met antibiotica om ze MRSA-vrij te krijgen. Bij grootschalige verspreiding kan ook besloten worden tot een opnamestop van nieuwe patiënten op getroffen afdelingen of zelfs tijdelijke sluiting van ziekenhuisafdelingen.

Het mogelijk verhoogd voorkomen van MRSA bij personen buiten het ziekenhuis is een risico voor de *search and destroy*-strategie van MRSA in ziekenhuizen. Onderzoek naar

<sup>9</sup> Op basis van RIVM rapport 240031001/2006: *Surveillance van pathogenen in Nederland*, hoofdstuk 5.6, door dr. A.J. de Neeling (RIVM) en dr. W. Wannet

het vóórkomen en de epidemiologische achtergrond van MRSA-patiënten en -dragers buiten ziekenhuizen wordt dan ook van groot belang geacht. Sinds 2003 is een nieuw type MRSA in ziekenhuizen opgedoken dat gerelateerd is aan de veehouderij. Uit recent onderzoek is gebleken dat dit type MRSA wijd verspreid voorkomt in de Nederlandse intensieve veehouderij en dat personen werkzaam met varkens en kalveren een verhoogd risico op MRSA-dragerschap hebben. Deze resultaten hebben ertoe geleid dat personen in contact met levende varkens of vleeskalveren zijn opgenomen als risicogroep in de MRSA-richtlijn voor ziekenhuizen.

### **Huidige kiemsurveillance**

De continue surveillance van MRSA berust momenteel op onderzoek van ingestuurde isolaten en elektronisch aangeleverde gegevens van lokaal uitgevoerde resistentiebepalingen. Het RIVM/CIb typeert alle eerste isolaten van MRSA die de medisch microbiologische laboratoria kweken en insturen, zonder kosten voor de inzender (de resultaten staan op de website [www.rivm.nl/mrsa](http://www.rivm.nl/mrsa)). Het ISIS-AR-project en EARS-Net verwerken de meldingen van alle *S. aureus* met bijbehorende resistenties (dus ook MRSA) van een groot aantal medisch microbiologische laboratoria met een landelijke dekkinggraad van circa 50% van de routine-diagnostiek. De resultaten staan in de jaarlijkse NethMap-rapporten die men kan downloaden van [www.swab.nl](http://www.swab.nl) en in een jaarlijks artikel in het Infectieziekten Bulletin en op de EARS-Net-website ([www.ecdc.europa.eu/en/activities/surveillance/EARS-Net](http://www.ecdc.europa.eu/en/activities/surveillance/EARS-Net)). Epidemiologische achtergrondgegevens worden verzameld door middel van een enquêteformulier en door telefonisch contact te zoeken met het inzendende laboratorium.

### **Responsetijd van huidige kiemsurveillance**

MRSA-isolaten die de ziekenhuislaboratoria naar het RIVM/CIb hebben gestuurd, worden binnen een paar dagen getypeerd. De resultaten worden per brief gemeld aan de inzender en tevens rechtstreeks op het internet [www.rivm.nl/mrsa](http://www.rivm.nl/mrsa) gepubliceerd (typeringen en incidenties). De rapportage van de resistentiegegevens uit de elektronische surveillance-systemen duurt langer (in de praktijk een jaar). Vanaf januari 2010 wordt elke maand in het Infectieziekten Bulletin een MRSA-overzicht weergegeven.

### **Isolaten**

De MRSA-isolaten worden door het RIVM een aantal jaar bewaard en zijn opvraagbaar voor verder onderzoek.

### **Typering**

Van alle ingezonden monsters wordt bij het RIVM eerst bevestigd dat het daadwerkelijk om een MRSA-isolaat gaat. Er wordt hierbij gekeken naar de aanwezigheid van het *mecA*-gen en het *coa*-gen, en tevens wordt er gekeken of de Panton-Valentine leucocidine (PVL)-genen aanwezig zijn. De huidige typeermethode die gebruikt wordt is de *spa*-typering, waarbij het gevonden *spa*-type gerapporteerd wordt naar de inzender. De verkregen data worden bewaard in een MRSA-database.

### **Databases**

De uitslagen van een typing worden gerapporteerd in het LIMS. Monstercodes en typeergegevens worden tevens ingevoerd in de Bionumerics MRSA-database.

### **Presentatie van gegevens**

1. Terugrapportage typeringsresultaten naar inzender.
2. Publicatie jaaroverzicht MRSA in het Infectieziekten Bulletin.
3. Maandelijks MRSA-overzicht in het Infectieziekten Bulletin.
4. Typing en incidenties MRSA op de RIVM MRSA-website ([www.rivm.nl/mrsa](http://www.rivm.nl/mrsa)).
5. Publicaties in (inter)nationale tijdschriften volgend uit MRSA-onderzoek.

**Acties**

Op dit moment wordt er gekeken of er via het internet sneller en makkelijker data verzameld kan worden naar aanleiding van een MRSA-bevinding. Hierbij kunnen inzenders zelf het isolaat melden. Het is de bedoeling dat de inzenders hun MRSA-isolaten gaan insturen naar een aantal grote typeercentra in Nederland van waaruit één database wordt gebruikt. Hierdoor is het niet noodzakelijk meer om alle isolaten voor typering naar het RIVM te sturen.

**Geschatte kosten van de huidige kiemsurveillance**

De kosten gerelateerd aan het MRSA-surveillanceonderzoek in 2011 bedragen circa € 551.000, waarvan € 319.000 direct gerelateerd aan de typering in het laboratorium.

**Nut van typering voor besluitvorming in voedselveiligheid**

Uit recent onderzoek in de veehouderij naar veegerelateerde MRSA is gebleken dat bij mensen die intensief contact hebben met levend vee, met name varkens, vleeskalveren en vleeskuikens, een verhoogd risico hebben op MRSA-dragerschap (163). Het betreft hier met name veehouders en diens medewerkers en slachthuismedewerkers. MRSA werd eveneens aangetoond op rauw vlees in de detailhandel, maar op basis van epidemiologische gegevens is geconcludeerd dat levensmiddelen geen of een verwaarloosbare rol spelen bij de verspreiding van MRSA onder de bevolking. Vervolgonderzoek naar MRSA in andere sectoren van de veehouderij en naar de transmissieroutes in dierlijke productieketens is nog gaande, waarbij typering een onmisbare tool is. Inzicht in transmissie van veegerelateerde MRSA is van groot belang teneinde de juiste maatregelen te nemen om verspreiding van MRSA tegen te gaan.

**Conclusies**

De surveillance van MRSA is een goedlopend project met een behoorlijke output, zowel direct naar de inzenders per post en via internet, als ook door regelmatige publicaties. Op basis van de continue typering van ingezonden stammen kan snel worden ingespeeld op nieuwe problemen. Voor onderzoek naar de transmissieroutes en interventiemogelijkheden van veegerelateerde MRSA is de typering onontbeerlijk.

<b>Mogelijke toepassingen van moleculaire typering in surveillance van MRSA</b>	
Detectie van (diffuse) uitbraken	Ja
Bronattributie	Ja
Tracering in voedselketen	Ja
In kaart brengen van (zoönotische) transmissieroutes	Ja
Pathogeen-eigenschappen: (niet-)zoönotische typen, verschillen in pathogeniciteit	Ja

## 5 Parasieten

### 5.1 *Echinococcus granulosus*<sup>10</sup>

#### Auteurs

Dr. H. Sprong (RIVM) en dr. J.W.B. van der Giessen (RIVM) en drs. L.M. Kortbeek (RIVM)

#### Inleiding

Echinococcose kent twee verschillende verschijningsvormen, hydatide echinococcose, veroorzaakt door *E. granulosus* en alveolaire echinococcose veroorzaakt door *E. multilocularis*. Beiden zijn parasitaire ziekten die kunnen leiden tot ernstige symptomen en soms ook sterfte als de diagnose niet op tijd wordt gesteld en in een vroeger stadium wordt behandeld. Behandeling is in veel gevallen levenslang en kostbaar, tenzij de patiënt door een adequate operatie vaak goed te genezen is. Hoewel beide parasieten echinococcose bij de mens worden genoemd betreft het twee aandoeningen met een verschillend klinisch beeld en is de prognose en de epidemiologie zeer verschillend. *E. granulosus*, de kleine lintworm van de hond, komt wereldwijd voor. De hond is de eindgastheer en verspreidt de worm via de ontlasting. Wanneer een hond slachtafval van een besmet rund eet, kan hij de eieren verspreiden door het contamineren van grond, gras of veevoer (164). De eitjes zijn infectieus voor mens en dierlijke tussengastheren. Besmette runderen of andere dieren, die als tussengastheer dienen, kunnen elkaar niet besmetten en het blaaswormstadium in het rund is niet infectieus voor de mens. De belangrijkste endemische gebieden zijn Zuid-Amerika, Azië, Afrika, het Middellandse Zeegebied en Oost-Europa (165). Uit moleculair onderzoek is gebleken dat gastheerspecificiteit op tussengastheerniveau gekoppeld is aan verschil in genetische samenstelling van de stammen. *E. granulosus* afkomstig van schapen is bijvoorbeeld verschillend van *E. granulosus*, die uit paarden wordt geïsoleerd. Deze informatie is te gebruiken om de stammen mee te typeren en op deze wijze is ook taxonomisch een andere naamgeving voorgesteld voor *E. granulosus* van paarden (*E. equinus*) en runderen (*E. ortleppi*).

Tot na de Tweede Wereldoorlog kwam er ook in Nederland regelmatig humane echinococcose voor. Door de intensieve veehouderij, veterinaire maatregelen bij slachthuizen en slachtdieren, het periodiek ontwormen van honden en door gebruik van droog- en blikvoer is het aantal endemisch verkregen infecties de laatste veertig jaren drastisch afgenomen. Import van besmette schapen, geiten en runderen uit endemische landen is een risicofactor om de pathogene *E. granulosus* -schapenstam weer te introduceren. Dit kan echter ook gebeuren door honden uit endemische landen mee te nemen of door infectie van honden die zijn meegenomen op vakantie naar endemische gebieden (166). Het aantal humane *E. granulosus*-infecties in Nederland is echter wel afgenomen (167).

#### Relevantie van de kiemsurveillance voor de volksgezondheid en potentiële interventie maatregelen

Echinococcose komt in Nederland vooral voor als importziekte uit het mediterrane gebied en voormalige Oostbloklanden. In het Middellandse Zeegebied komt met name het genotype van schaap veelvuldig voor bij mensen, in Oost-Europa zou ook de

<sup>10</sup> Op basis van RIVM rapport 240031001/2006: *Surveillance van pathogenen in Nederland*, hoofdstuk 6.2, door dr. J. van der Giessen (RIVM) en drs. L. Kortbeek (RIVM)

varkensstam sterk toenemen. Jaarlijks worden er in Nederland ongeveer dertig nieuwe patiënten gediagnosticeerd op basis van serologie. Het aantal nieuwe patiënten per jaar nam van 1997 tot 2008 af van meer dan veertig naar minder dan dertig patiënten per jaar. Bij 95,5% van de 445 patiënten was, afgaand op de achternaam, waarschijnlijk sprake van geïmporteerde ziektecasussen. In Nederland wordt echinococcose voornamelijk gezien als importziekte, waarbij het merendeel van de patiënten afkomstig is uit endemische gebieden rondom de Middellandse Zee. Echinococcose is opgenomen in lijst A van de Zoönosenrichtlijn 2003/99/EC, die surveillance in iedere EU-lidstaat voorschrijft. Humaan is echinococcose niet aangifteplichtig in Nederland, maar wel opgenomen in de community network volgens EU Besluit 2000/96/EC om als zoönose gemonitord te worden in Europa door de EU-landen. *E. granulosus* is relevant om zowel bij de mens als bij dieren in een kiemsurveillance op te nemen. Het is een relatief zeldzame ziekte, waarbij kiemsurveillance gekoppeld aan moleculaire typering inzicht geeft in het voorkomen, de herkomst en verspreiding van in Nederland en Europa circulerende stammen bij de mens en bij slachtdieren. Het kan ook van belang zijn om toename van bepaalde stammen, zoals de in Nederland voorkomende runderstam op te merken. Dit inzicht is nodig om veterinaire beheersmaatregelen zo nodig te kunnen aanscherpen.

#### **Huidige kiemsurveillance**

Humaan is de huidige monitoring niet structureel geregeld. Echinococcose is humaan niet aangifteplichtig volgens de Infectieziektenwet en er is geen systeem in Nederland waarbij systematisch materiaal van gediagnosticeerde humane patiënten systematisch wordt verzameld en onderzocht voor publieke gezondheidrelevante vraagstellingen. Echinococcose is wel aangifteplichtig voor dieren in het kader van de Gezondheids- en welzijnswet voor dieren. Er vindt routinematige monitoring in de slachthuizen (vleeskeuring) plaats. Kiemsurveillance bij dieren gebeurt wel, maar in niet alle gevallen. Verdacht (slachthuis) materiaal wordt naar het NRL-parasieten gestuurd ter identificatie. Dit heeft de afgelopen jaren tot de waarneming geleid dat *E. equinum* in Nederland voorkomt bij paarden zonder een buitenlandanamnese. Al langer was bekend dat de *E. Ortleppi* (runderstam) in Nederland circuleert en slachthuiscontrole kan ons inzicht geven of deze sporadisch voorkomende stam nog aanwezig is in Nederland. In 2007 is in geïmporteerde vleesrunderen uit Roemenië *E. Granulosus G1* geconstateerd (168).

Zowel voor slachthuismateriaal van dieren als systematisch materiaal van de mens doet het RIVM (NRL-parasieten) de confirmatie en identificatie. Hierover bestaan afspraken met het centrale laboratorium van de Nederlandse Voedsel en Waren Autoriteit en meer ad hoc door afspraken met enkele parasitologische centra.

#### **Responsetijd van huidige kiemsurveillance**

Systematisch materiaal wordt na ontvangst microscopisch onderzocht. Confirmatie en typering vinden plaats door Polymerase Chain Reaction gevolgd door DNA-sequentieanalyse van de verkregen PCR-producten. Er wordt naar gestreefd om binnen zeven tot veertien dagen een uitslag (positief/negatief) te hebben. Typeringsresultaten worden gebruikt voor moleculair epidemiologisch onderzoek.

#### **Isolaten**

Humane isolaten worden incidenteel en op vrijwillige basis opgestuurd naar het RIVM voor confirmatie en typering. DNA wordt bewaard door het RIVM (LIS/LZO). Animale monsters van slachthuizen worden verplicht naar het RIVM gestuurd en daar tot DNA-monster verwerkt, geanalyseerd en de resultaten worden opgeslagen.

#### **Typering**

Typering wordt uitgevoerd voor bron- en contactopsporing. Door analyse van DNA-sequenties met hulp van MLST zijn verschillende *E. granulosus*-genotypen en subtypen te onderscheiden. Het is het mogelijk om infecties te identificeren, die zijn verkregen vanuit de verschillende tussengastheren (bijvoorbeeld rund, schaap, paard, varken en kameel). Dit is belangrijk om import en endemisch voorkomende stammen van elkaar te kunnen onderscheiden. Dit inzicht is nodig om beheersmaatregelen eventueel te kunnen aanscherpen. Door DNA-analyse is in 2004/2005 een humane patiënt geïdentificeerd, die is geïnfecteerd met een endemische Nederlandse runderstam. Dezelfde stam werd ook twintig jaar geleden in een Nederlandse humane patiënt gevonden. De geïmporteerde vleesrunderen uit Roemenië bleken vanaf 2007 enkele *E. granulosus*-subtypen met zich mee te dragen die nog niet eerder in Nederland geconstateerd waren. De gebruikte methode kent echter voor humane toepassing een aantal problemen waardoor er op dit moment nog aan methodiekverbetering en validatie wordt gewerkt.

### Databases

Typeringsdata afkomstig van Genbank, van het RIVM en van (inter)nationale partners komen in een moleculaire epidemiologische database terecht. Deze database wordt beheerd door het RIVM/LZO/LIS. De database is alleen toegankelijk voor LIS en LZO via de contactpersonen.

### Presentatie en analyse van gegevens

1. Publicaties in vaktijdschriften naar aanleiding van humane/animale cases.
2. Jaarlijkse meldingen in zoönose-rapportage en aan EFSA/ECDC.

### Acties

Terugkoppeling van de uitslag naar behandelend arts (behandeling) of naar de NVWA voor eventuele terugtracering naar bedrijven.

### Geschatte kosten van de huidige kiemsurveillance

De kosten van de vleeskeuring zijn bij het RIVM niet bekend. De kosten van de humane serologie uitgevoerd door het RIVM worden bij ziekenhuizen in rekening gebracht. De moleculaire typering wordt projectmatig uitgevoerd. Humane monsters worden op vrijwillige basis via ziekenhuizen ingestuurd en jaarlijks worden nu circa vijf tot tien cysten onderzocht.

### Lacunes in huidige kiemsurveillance

Humaan is de opzet van een passieve surveillance gewenst, waarbij systematisch na diagnose de patiënten worden geregistreerd en, indien mogelijk, cystemateriaal moleculair onderzocht wordt. Er wordt echter maar bij een beperkt aantal patiënten cystemateriaal verzameld. Een deel van de patiënten wordt medicamenteus behandeld zonder chirurgisch ingrijpen. Serologisch is het slechts beperkt mogelijk om te differentiëren tussen verschillende species. Er is wel een specifieke *E. multilocularis*-serologie beschikbaar. Veterinair is een gevoeliger monitoring en betere melding bij slachthuizen noodzakelijk omdat de huidige visuele inspectie slechts een matige gevoeligheid heeft (168). Ook hier is in geval van een positieve bevinding nadere typering van de kiem noodzakelijk.

### Nut van typering voor besluitvorming in voedselveiligheid

1. Opzetten van moleculaire detectie en identificatie door middel van typering maakt het mogelijk om bevindingen te confirmeren.
2. Het achterhalen van het land van herkomst van de infectie door middel van moleculaire typering kan leiden tot internationale afspraken voor wat betreft import en export van voedselgerelateerde producten en dieren. Een recent voorbeeld is de import van met *E. granulosus* geïnfecteerde runderen uit Roemenië.

3. Moleculaire typering van parasieten is noodzakelijk voor het vaststellen van relatieve bijdragen van transmissieroutes en daarmee het vaststellen van (transmissie)risico's.

### Conclusies

In Nederland vindt bij mensen geen monitoring van deze zoönose plaats. Op grond van EU-wetgeving en gezien de relevantie van te nemen beheersmaatregelen in de diersector is een uitgebreidere monitoring nodig. Een passieve monitoring van humane cases en een actieve monitoring bij slachtdieren is hiervoor het meest passend. Dit is ook het advies van de EFSA-parasieten werkgroep. Centrale coördinatie en integratie van mens en diergegevens zijn door het sporadisch voorkomen gewenst. Het RIVM vervult op dit moment een rol als referentiecentrum voor deze parasieten en verzorgt deze coördinatie.

<b>Mogelijke toepassingen van moleculaire typering in surveillance van <i>E. granulosis</i></b>	
Detectie van (diffuse) uitbraken	Ja
Bronattributie	Ja
Tracering in voedselketen	Ja
In kaart brengen van (zoönotische) transmissieroutes	Ja
Pathogeen-eigenschappen: (niet-)zoönotische typen, verschillen in pathogeniciteit	Ja

## 5.2 Echinococcus multilocularis<sup>11</sup>

### Auteurs

Dr. H. Sprong, (RIVM) en dr. J.W.B. van der Giessen (RIVM) en drs. L.M. Kortbeek (RIVM)

### Inleiding

*E. multilocularis* is de verwekker van alveolaire echinococcose, een maligne aandoening van de lever die doorgroeit naar andere organen. Het volwassen stadium, de lintworm, komt voor bij vossen, honden en een aantal andere carnivoren en is endemisch in Zwitserland, Oostenrijk, het oostelijk deel van Frankrijk en in Oost-Europa. Recent onderzoek in andere delen van Europa heeft echter aangetoond dat deze parasiet ook buiten het bekende endemische gebied van Centraal Europa voorkomt, zoals Tsjechië, Polen, Slowakije, België en ook in het grensgebied van Nederland (169). In Nederland zijn tot nu toe twee endemische gebieden, Zuid-Limburg en Oost-Groningen, waar *E. multilocularis* in vossen is gevonden. Besmetting van mensen vindt plaats door orale opname van de echinococceneieren. In Nederland is in 2008 de eerste humane patiënt gevonden, die waarschijnlijk in Nederland besmet is geraakt. Van de voorgaande vier patiënten werd verondersteld dat het om een importziekte ging. In België zijn de laatste jaren al vier humane gevallen beschreven die de infectie hoogstwaarschijnlijk in eigen land hebben opgelopen (169). Een probleem bij de diagnostiek van humane gevallen is dat er geen gevoelige en specifieke serologische methode beschikbaar is en dat de kennis bij de clinici ontbreekt (er wordt niet aan gedacht; de aandoening lijkt sterk op leverkanker of levermetastasen) (170).

### Kiemsurveillance voor de volksgezondheid en potentiële interventie maatregelen

Deze parasiet wordt gezien als een emerging zoonose met een reservoir in wild, waarbij toepasbare beheersmaatregelen in de wilde dierpopulatie nog onvoldoende geëvalueerd zijn en nog niet worden toegepast in Nederland. Alveolaire echinococcose is humaan niet aangifteplichtig, zodat het erg moeilijk is om inzicht te krijgen in aantal patiënten. Doordat de meeste infecties pas laat tot klachten leiden is het moeilijk de bron te achterhalen. Preventie is van groot belang, waarbij registratie van humane patiënten inclusief een passieve kiemsurveillance bij de mens en een actieve surveillance in wild nodig is om goede preventie en eventueel te nemen beheersmaatregelen bij wild te implementeren.

### Huidige kiemsurveillance

De huidige kiemsurveillance is humaan vergelijkbaar als beschreven voor *E. granulosus*. Er wordt slechts weinig bioptiemateriaal onderzocht met behulp van een Echinococcus-PCR en het PA-onderzoek zal niet altijd duidelijkheid geven.

Bij vossen vindt in opdracht van de Voedsel en Waren Autoriteit een actieve surveillance plaats, waarbij periodiek de prevalentie in wild in de endemische gebieden en de verspreiding naar nieuwe gebieden wordt onderzocht om trends in de tijd te kunnen vaststellen. Een enkele keer komt er materiaal van een hond via dierenartspraktijken en veterinaire pathologie (Diergeneeskunde, UU) (171). In de endemische gebieden in Nederland is te overwegen om honden te onderzoeken op het voorkomen van *E. multilocularis* om betere controlemaatregelen te kunnen nemen.

<sup>11</sup> Op basis van RIVM rapport 240031001/2006: *Surveillance van pathogenen in Nederland*, hoofdstuk 6.2, door dr. J. van der Giessen (RIVM) en drs. L. Kortbeek (RIVM)



### **Responsetijd van huidige kiemsurveillance**

Systemateriaal wordt na ontvangst microscopisch onderzocht. Confirmatie en typering vinden plaats via DNA-onderzoek, namelijk door Polymerase Chain Reaction gevolgd door DNA-sequentieanalyse van de verkregen PCR-producten. Voor materiaal van (dieren)artsen is het streven om binnen zeven tot veertien dagen een uitslag (positief/negatief) te hebben. Typeringsresultaten worden gebruikt voor moleculair epidemiologisch onderzoek. Terugkoppeling van de resultaten van de vossen vindt op jaarlijkse basis plaats met de opdrachtgever.

### **Geschatte kosten van de huidige kiemsurveillance**

Humaan zijn de kosten alleen voor confirmatie en onderscheid met *E. granulosus*. Dit zijn kosten van de PCR-bepaling en sequentieanalyse. Onderzoek van humane monsters is indien sprake is van diagnostiek ten laste van de ziektekostenverzekeraar en indien trendanalyse ten laste van het ministerie van VWS. Onderzoek van wild komt in de huidige situatie ten laste van de NVWA.

### **Gewenste aanpassingen in kiemsurveillance**

Landelijke dekking voor het identificeren en confirmeren van humane patiënten. Mogelijk in combinatie met serologisch onderzoek op risicogroepen en risicogebieden (bijvoorbeeld Zuid-Limburg).

### **Isolaten**

Humane isolaten worden op vrijwillige basis opgestuurd naar het RIVM voor confirmatie. Isolaten van wild (vossen) worden in opdracht van de NVWA geanalyseerd. DNA-preparaten worden bewaard door het RIVM (LIS/LZO).

### **Typering**

Op dit moment zijn binnen het RIVM geen typeringstechnieken in gebruik, die inzicht geven in de in Europa circulerende stammen/types, maar wel die te gebruiken zijn voor confirmatieonderzoek. Een meer discriminerende typering is noodzakelijk voor bronopsporing en om beheersmaatregelen te kunnen formuleren.

### **Database**

Er zijn geen typeringsdata beschikbaar binnen het RIVM.

### **Presentatie en analyse van gegevens**

1. Publicaties in vaktijdschriften naar aanleiding van humane/animale cases.
2. Jaarlijkse meldingen in zoönose-rapportage en aan EFSA/ECDC.

### **Acties**

Terugkoppeling van de uitslag naar behandeld arts of naar de NVWA.

**Nut van typering voor besluitvorming in voedselveiligheid**

1. Opzetten van moleculaire detectie en identificatie in het kader van bronopsporing.
2. Moleculaire typering van parasieten is noodzakelijk voor het vaststellen van relatieve bijdragen van transmissieroutes en daarmee het vaststellen van (transmissie)risico's.

**Conclusies**

Gezien de ernst van de aandoening en de epidemiologische situatie van de parasiet in Nederland, waarbij in de nabije toekomst zeer waarschijnlijk meer humane gevallen manifest worden, is een gerichte monitoring nodig. Aantonen van de parasiet bij humane cases en surveillance in wild worden bij het RIVM uitgevoerd. Gezien de sporadische aard van deze aandoening is centrale coördinatie en integratie van gegevens van mens en dier gewenst. Het RIVM vervult in dit kader de functie van referentiecentrum.

<b>Mogelijke toepassingen van moleculaire typering in surveillance van <i>E. multilocularis</i></b>	
Detectie van (diffuse) uitbraken	Ja
Bronattributie	Ja
Tracering in voedselketen	Nee
In kaart brengen van (zoönotische) transmissieroutes	Ja
Pathogeen-eigenschappen: (niet-)zoönotische typen, verschillen in pathogeniciteit	Nee

### 5.3 **Giardia lamblia en Cryptosporidium spp.**

#### **Auteurs**

Dr. H. Sprong (RIVM) en dr. J.W.B. van der Giessen (RIVM), dr. F.M. Schets (RIVM), drs. L.M. Kortbeek (RIVM)

#### **Inleiding**

*Giardia lamblia* (synoniemen: *G. intestinalis* en *G. duodenalis*) en *Cryptosporidium* spp. zijn beide eencellige darmparasieten die endemisch voorkomen in Nederland. De jaarlijkse incidentie in de Nederlandse bevolking wordt geschat op respectievelijk 110.000 en 56.000 gevallen van gastro-enteritis (GE) per jaar. Er is voor beide parasieten een aantal risicofactoren bekend, waaronder contact met zwemwater, oppervlaktewater en besmet voedsel (172, 173). Het is echter onduidelijk of en in welke mate zoönotische transmissie een rol speelt in Nederland. Er zijn ook aanwijzingen uit epidemiologisch onderzoeken dat het klinisch beeld, met name de gevolgen op langere termijn, verschilt tussen verschillende stammen van zowel *Cryptosporidium* (*C. hominus/parvum* en subtypen) als *Giardia* (*Giardia* assemblage AI/AII/B en subtypen). Uit recente literatuur naar aanleiding van een grote *Giardia*-watergerelateerde uitbraak in Bergen (Noorwegen, Assemblage B) blijkt dat er veel patiënten zijn met langdurige en/of chronische klachten. Bij *Cryptosporidium* blijken er ook buiten de darmen symptomen te ontstaan (bijvoorbeeld artritis) waarbij er een verschil is tussen *C. hominis* en *C. parvum*.

In de periode 2003-2005 werd door het RIVM in samenwerking met Streeklaboratorium Haarlem onderzoek naar *Giardia* uitgevoerd in fecesmonsters van klinische patiënten. Hieruit bleek dat assemblage B meer gezien werd bij patiënten met ernstigere klachten en assemblage A meer gezien werd bij patiënten met milde klachten. Ook bij dieren (huisdieren en landbouwhuisdieren) is onderzoek gaande naar het voorkomen van verschillende *Giardia*-assemblages met als doel om mogelijk zoönotisch potentieel van de *Giardia*-subsoorten te bestuderen (fylogenetische analyses). Voor het ministerie van VROM is onderzoek gedaan door het RIVM/LZO naar blootstelling aan zwemwater waaruit bleek dat zwembaden ook in Nederland een mogelijke route zijn voor het oplopen van *Giardia*- en *Cryptosporidium*-infecties, maar dit is vooralsnog onduidelijk voor oppervlaktewater (172, 174-178). Er is onderzoek gedaan naar het voorkomen van *Cryptosporidium* en *Giardia* in Nederlandse zwembaden (176); daar bleken ze in voor te komen en er bleek een infectierisico voor zwemmer te zijn. Tevens heeft onderzoek plaatsgevonden naar *Cryptosporidium/Giardia* in schelpdieren en de parasieten daarin aangetroffen (179).

Het RIVM is de afgelopen jaren actief betrokken geweest bij een Europees netwerk voor de harmonisatie van diagnostische en typeringsmethoden. Er is inzicht gekregen in de soorten/stammen rijkdom van beide pathogenen, met name van *Giardia* (180, 181). Deze inzichten bieden verbeterde (onderzoeks)methoden voor de identificatie van risicofactoren (per stam!) en voor het vaststellen van de zoönotische potentie van *Giardia* en *Cryptosporidium* (182).

#### **Relevantie van de kiemsurveillance voor de volksgezondheid en potentiële interventie maatregelen**

Door de introductie van moleculaire typering van *Cryptosporidium* is het sinds een paar jaren mogelijk een onderscheid te maken tussen *Cryptosporidium hominis*, die zich alleen onder mensen lijkt te verspreiden (antroponotisch) en de verschillende *Cryptosporidium parvum*-stammen die bij zowel mens als dier voorkomen en van dier op mens overdraagbaar kunnen zijn (zoönotisch). De medisch microbiologische laboratoria in Nederland zijn sinds een aantal jaren bezig met de introductie van moleculaire diagnostische methoden voor fecesdiagnostiek. Daarbij wordt ook een multiplex PCR voor

darmparasieten gebruikt in een wisselende samenstelling (soms geheel parasitair; soms in combinatie met bacteriën). Deze methode is echter alleen geschikt voor detectie en niet voor typering. Voor typering moet aanvullend onderzoek worden verricht hetgeen in het algemeen niet beschikbaar is buiten het CIb. Laboratoria die diagnostiek door middel van microscopie verrichten kijken niet altijd naar *Cryptosporidium*.

### **Huidige kiemsurveillance**

Er is geen kiemsurveillance voor beide pathogenen. Er vinden sinds 2003 verschillende onderzoeken plaats bij het RIVM in (inter)nationale samenwerkingen, naar het voorkomen en zoönotisch belang van *Giardia* en *Cryptosporidium*.

### **Responsetijd van huidige kiemsurveillance**

Niet relevant in verband met projectmatige opzet van huidige onderzoeken.

### **Isolaten**

Humane en animale isolaten worden incidenteel op vrijwillige basis opgestuurd naar het RIVM voor confirmatie en typering. DNA-preparaten worden bewaard door het RIVM (LIS/LZO).

### **Typering**

Voor beide parasieten zijn in internationaal verband (MedVetNet) Europees geharmoniseerde MLST-methoden opgezet en geïmplementeerd. Deze typering maakt het mogelijk om de zoönotische potentie, de pathogeniciteit, de risicofactoren van verschillende *Giardia*- en *Cryptosporidium*-stammen vast te stellen. De typeringsmethodes zijn geschikt voor bron- en contactopsporing, detectie van (diffuse) uitbraken.

### **Databases**

Het RIVM heeft de grootste (Europese) moleculaire epidemiologische database voor *Giardia* en *Cryptosporidium*. Er wordt gewerkt aan een internetgebaseerde toepassing, waarbij veterinaire en volksgezondheidsonderzoekers in staat zijn om deze database te raadplegen, de typering van hun isolaten te harmoniseren met de database en om hun humane en dierlijke isolaten aan deze databanken toe te voegen. Deze toepassing is uitermate geschikt voor (inter)nationale onderzoeksprojecten bovengenoemde kennislacunes. Tot heden is de financiering van deze database uit projectgelden bekostigd, wegvallen van projectgelden maakt een inzetbaarheid van de database voor zowel routinematige diagnostiek als bronopsporing onder de huidige omstandigheden onmogelijk.

### **Presentatie en analyse van gegevens**

1. Publicaties in vaktijdschriften naar aanleiding van humane/dierlijke cases.
2. Melding aan opdrachtgevers.
3. Een internetgebaseerde toepassing die toegankelijk is voor onderzoekers.

### **Acties**

Terugkoppeling van de uitslag naar behandeld arts of naar de NVWA.

### **Geschatte kosten van de huidige kiemsurveillance**

Niet relevant in verband met projectmatige opzet van het huidige onderzoek.

### **Lacunes in huidige kiemsurveillance**

- Patiëntcontroleonderzoek. Onderzoek naar de risicofactoren en pathogeniciteit voor het verkrijgen van humane (maar ook veterinaire) cryptosporidiose en giardiasis door uitvoering van een patiëntcontrole-onderzoek. Hierbij zal gezien het verschil in epidemiologie en kliniek via moleculaire typering onderscheid moeten worden gemaakt tussen *C. hominis*- en *C. parvum*-subtypen en verschillende *Giardia*-assemblages.

- Moleculair onderzoek alimentaire, animale en water-isolaten. Vervolgonderzoek naar de kwantitatieve bijdrage van de zoönotische transmissie van *C. parvum* en het zoönotisch potentieel van verschillende *Giardia*-assemblages. Voor zowel *C. parvum* als *Giardia* zijn moleculaire markers ontwikkeld en geïmplementeerd.
- Inzicht in de incidentie van gastro-enterale gastro-enteritis: Implementeren van moleculaire diagnostiek van gastro-enterale parasieten in de routinematige diagnostiek bij streek- en ziekenhuislaboratoria. Verzamelen en integreren van deze gegevens geeft meer inzicht in het voorkomen van deze pathogenen.

### Nut van typering voor besluitvorming in voedselveiligheid

1. Het achterhalen van het land van herkomst van de infectie door middel van moleculaire typering kan leiden tot internationale afspraken voor wat betreft import en export van voedselgerelateerde producten en dieren.
2. Moleculaire typering van parasieten is noodzakelijk voor het vaststellen van relatieve bijdragen van transmissieroutes en daarmee het vaststellen van (transmissie)risico's.

### Conclusies

*Giarda* en *Cryptosporidium* zijn belangrijke veroorzakers van gastro-enteritis. Het ziektebeeld (op de langer termijn) lijkt af te hangen van het soort pathogeen. Door middel van kiemsurveillance kan goed onderscheid gemaakt worden tussen de verschillende soorten. Onderzoek vindt nu projectmatig plaats.

<b>Mogelijke toepassingen van moleculaire typering in surveillance van <i>Giardia</i> en <i>Cryptosporidium</i></b>	
Detectie van (diffuse) uitbraken	Ja*
Bronattributie	Ja
Tracering in voedselketen	Ja
In kaart brengen van (zoönotische) transmissieroutes	Ja
Pathogeen-eigenschappen: (niet-)zoönotische typen, verschillen in pathogeniciteit	Ja

\* wel wat betreft *Cryptosporidium* niet voor *Giardia*

## 5.4 Toxoplasma gondii

### Auteurs

Dr. H. Sprong (RIVM) en dr. J.W.B. van der Giessen (RIVM) en drs. L.M. Kortbeek (RIVM)

### Inleiding

Toxoplasmose is een algemeen voorkomende, deels voedselgerelateerde infectieziekte, die in de meeste gevallen subklinisch verloopt en veroorzaakt wordt door de parasiet *T. gondii*. Bij immuungestoorden en bij intra-uteriene infecties kan de infectie wel tot ernstige ziektebeelden leiden. *T. gondii* is een obligaat intracellulaire, protozoaire parasiet, welke de kat en katachtigen als definitieve gastheer (eindgastheer) heeft. De mens, diverse zoogdieren en vogels functioneren als tussengastheer. De mens wordt onder andere geïnfecteerd door ingestie van ongewassen groenten en fruit die bezoedeld zijn met oöcysten, van aarde die door kattenfeces met oöcysten is besmet of door weefselcysten met name in besmet vlees.

Intra-uteriene infectie vindt plaats door diaplacentaire overdracht van *T. gondii*. In Nederland schat men dat ongeveer 65 tot 82% van de primigravidae nog niet eerder met de parasiet in contact is geweest en daardoor het risico op congenitale Toxoplasmose aanzienlijk is. Recent onderzoek heeft aangetoond dat de ziektelast van congenitale en verkregen Toxoplasmose in vergelijking met andere gastro-enterale pathogenen tot de hoogste behoort (35).

### Relevantie van de kiemsurveillance voor de volksgezondheid en potentiële interventie maatregelen

Epidemiologisch onderzoek van Toxoplasma bij zowel mens, dier als omgeving zou inzicht kunnen geven in mogelijke risicofactoren en welke (dier)reservoirs van belang zijn voor infectie bij de mens. Er lijken verschillen te bestaan tussen landen in de meest voorkomende Toxoplasmastammen. Zo is duidelijk dat de kliniek en diversiteit van de stammen in Brazilië en de rest van Latijns-Amerika sterk verschillen met Europa. Door inzicht in welke dierenpopulaties van belang zijn voor de overdracht van Toxoplasma naar de mens, kan gerichtere interventie plaatsvinden.

### Huidige kiemsurveillance

Toxoplasmosedagnostiek humaan berust vooral op serologie, en slechts in een beperkt aantal gevallen uit het aantonen van DNA in vruchtwater of biopten. Kweek is alleen mogelijk in muizen (praktisch bijna onmogelijk) of door middel van celkweek van zeer vers materiaal. Dit wordt in de praktijk in Nederland bijna niet gedaan. De beschikbaarheid van bruikbaar DNA is beperkt doordat niet altijd gedacht wordt aan de mogelijkheid van moleculaire detectie of typering en de afdeling pathologie in ziekenhuizen nog voornamelijk werkt met histopathologische preparaten.

Kiemsurveillance is dan moeilijk uitvoerbaar en alleen in een bredere samenwerking (bijvoorbeeld in Europees verband) zinvol. Bij dieren kan kiemsurveillance inzicht geven in welke populaties van belang zijn als bron van infectie en kan een gerichtere interventiestrategie worden opgezet.

### Responsetijd van huidige kiemsurveillance

Niet van toepassing.

### Isolaten

Humane isolaten van patiënten met IUVD of met afwijkingen gedurende de zwangerschap worden op vrijwillige basis opgestuurd naar het RIVM voor confirmatie en typering. DNA-preparaten worden bewaard door het RIVM (LIS/LZO- CIB) en er is geen

structurele 'biobank' voor origineel materiaal en DNA. Animale isolaten komen op dit moment uit een onderzoeksproject en worden tijdelijk bewaard.

### Typering

Er is een typeringsmethode op vleesmonsters ontwikkeld bij het RIVM. Dit onderzoek maakt het mogelijk om een cyste in 100 gram vlees aan te tonen en te typeren. Op dit moment is de typering gebaseerd op een marker (DNA-sequentie). In de toekomst kan de typeringsmethode uitgebreid worden met meerdere markers (183). Dezelfde methode is ook toepasbaar op vruchtwater en bioptenmateriaal, hoewel deze nog experimenteel is. Voor de typering is het onderscheidend vermogen momenteel een probleem. Whole genome sequencing kan mogelijk voor *T. gondii* nieuwe mogelijkheden bieden om meer onderscheid te maken.

### Databases

Er wordt binnen het RIVM gewerkt aan een moleculaire epidemiologische database.

### Presentatie van de gegevens

1. Publicaties in vaktijdschriften naar aanleiding van humane cases en onderzoek naar prevalentie in dierlijke bronnen.
2. Meldingen in zoönose-rapportage en aan EFSA/ECDC.
3. Rapport naar opdrachtgever(s).

### Acties

Terugkoppeling naar artsen en de NVWA.

### Geschatte kosten van de huidige kiemsurveillance

Niet van toepassing.

### Nut van typering voor besluitvorming in voedselveiligheid

1. Het achterhalen van het land van herkomst van de infectie door middel van moleculaire typering kan leiden tot internationale afspraken voor wat betreft import en export van voedselgerelateerde producten en dieren. Momenteel is deze toepasbaarheid er echter nog niet.
2. Moleculaire typering van parasieten is noodzakelijk voor het vaststellen van relatieve bijdragen van transmissieroutes en daarmee het vaststellen van (transmissie)risico's. Voorbeeld: worden mensen besmet met *Toxoplasma* via voedsel of via hun omgeving/katten? Ook deze toepasbaarheid is er nu nog niet door het slechte discriminerende vermogen van de typering. Vooralsnog is de detectie van *T. gondii* in vlees wel een praktische toepasbaarheid. Uitbreiding naar vitale cystendetectie is een volgende stap.

<b>Mogelijke toepassingen van moleculairedetectie / typering in surveillance van <i>T. gondii</i></b>	
Detectie van (diffuse) uitbraken	Ja
Bronattributie	Ja
Tracering in voedselketen	Ja
In kaart brengen van (zoönotische) transmissieroutes	Ja
Pathogeen-eigenschappen: (niet-)zoönotische typen, verschillen in pathogeniciteit	Ja

## 5.5 *Trichinella spiralis*

### Auteurs

Dr. H. Sprong (RIVM) en dr. J.W.B. van der Giessen (RIVM)

### Inleiding

*Trichinellose* is een parasitaire voedsel-gerelateerde zoönose, die wereldwijd voorkomt en wordt veroorzaakt door infectie van nematoden behorende tot het genus *Trichinella* (184). Rauw of niet goed doorbakken vlees van geïnfecteerde omnivoren (paard/varken/wild zwijn) is een bron van besmetting voor de mens. Strenge controle op het voorkomen van *Trichinella* bij consumptiedieren zoals varkens, paarden en wild zwijn is wettelijk (ook internationaal in bijvoorbeeld EG-verband) geregeld en verplicht voor alle EU-landen. In 2004 zijn 1753 humane cases gerapporteerd in Europa en 625 in Turkije. In Nederland is al decennialang geen endemische humane trichinellose gezien, echter jaarlijks zijn ongeveer vijf tot tien positieve humane patiënten, met behulp van serologie door het RIVM vastgesteld. Tot nu toe blijken dit voornamelijk importcases te betreffen. Besmetting via varkensvlees is door de intensieve varkenshouderij in Nederland praktisch uitgesloten. Ondanks de afwezigheid van *Trichinella*-infecties in de intensieve varkenshouderij, blijkt uit surveillance-onderzoek bij wild door het RIVM dat de parasiet wel degelijk in Nederland voorkomt en in toenemende mate. Uit de typering blijkt dat er naast *T. spiralis*, twee nieuwe soorten zijn gevonden in Nederland, namelijk *T. britovi* en *T. pseudospiralis*. Al deze soorten zijn infectieus voor mensen (184, 185).

### Kiemsurveillance voor de volksgezondheid en potentiële interventie maatregelen

Trichinellose is een zeldzame ziekte in Nederland en gezien de een nieuwe EU-wetgeving en uitbreiding van de EU met lidstaten, waar *Trichinellose* nog endemisch voorkomt is aanvullende surveillance wenselijk om import van besmette dieren te voorkomen. Humaan is de ziekte aangifteplichtig en aanvullend zal, indien mogelijk, een moleculaire identificatie en typering van de parasiet moeten plaatsvinden voor bronopsporing. Veterinair is actieve surveillance vereist om te voldoen aan de EU-regelgeving.

### Huidige kiemsurveillance

Humaan is er een passieve surveillance (aangifteplicht). In geval van een humane verdenking vindt serologie plaats bij het RIVM, eventueel ondersteund door parasiet-identificatietypering in een weefselbiopt. Dit heeft consequenties voor de behandeling en mogelijk ook voor bronopsporing. Gezien de zeldzame verschijning van deze aandoening is het gewenst deze parasiet op te nemen in een gestructureerde kiemsurveillance. Veterinair is bij slachtdieren een wettelijk verplicht onderzoek voorgeschreven. In geval van een positieve bevinding wordt deze door het Nederlandse referentielab (RIVM) bevestigd. Dit heeft directe consequenties voor de export van varkensvlees. Daarnaast vindt in Nederland een actieve doorlopende surveillance in wilde zwijnen plaats en een periodiek onderzoek in ander wildlife (186, 187). Bronopsporing door middel van detailtypering (sequentieanalyse) is van groot belang om adequate actie aan de veterinaire kant te kunnen ondernemen.

### Responsetijd van huidige kiemsurveillance

Responsetijd na een positieve slachthuisbevinding is een tot twee dagen (referentietask RIVM) ter confirmatie. Identificatie door moleculaire typering vereist DNA-sequentieanalyse en streven is een tot twee weken.

### Isolaten

Humaan is de voornaamste diagnostiek via serologie. Patiëntenmaterialen (biopten) worden sporadisch opgestuurd naar het RIVM voor confirmatie en typering van



aanwezige larven. Slachthuismonsters worden in opdracht van de NVWA geanalyseerd. DNA-preparaten worden bewaard door het RIVM (LIS/LZO). Er worden bij het RIVM een aantal *Trichinella*-soorten en stammen in muizen doorgezet.

### **Typering**

Het NRL-parasieten (RIVM-LZO) gebruikt een typeringsmethode die beschreven wordt in Rombout en a., 2001 (188).

### **Databases**

NRL-parasieten heeft een serologiedatabase en een moleculair epidemiologische database.

### **Presentatie en analyse van gegevens**

1. Publicaties in vaktijdschriften naar aanleiding van humane/animale cases en epidemiologie.
2. Meldingen in zoönose-rapportage en aan EFSA (veterinair) ECDC (humaan) en OIE (wildlife).

### **Acties**

Bronopsporing, terugtracering naar bedrijven.

### **Geschatte kosten van de huidige kiemsurveillance**

Kosten veterinair zijn ongeveer 8 miljoen euro per jaar door de verplichte slachthuissurveillance. Humaan wordt slechts incidenteel een biopt ingestuurd. Confirmatie en wildlife-surveillance geschieden projectmatig op kosten van de Voedsel en Waren Autoriteit.

### **Lacunes in huidige kiemsurveillance**

Uitvoering van typeringen van humane *Trichinella*, doordat het in handen krijgen van de larven vaak problematisch is.

### **Nut van typering voor besluitvorming in voedselveiligheid**

1. Het achterhalen van de *Trichinella*-soort geeft inzicht in de epidemiologische situatie en de mogelijke bron.
2. Terugtracering naar het land van herkomst van de infectie door middel van moleculaire typering kan leiden tot internationale afspraken voor wat betreft import en export van voedselgerelateerde producten en dieren.
3. Moleculaire typering van parasieten is noodzakelijk voor het vaststellen van relatieve bijdragen van transmissieroutes en daarmee het vaststellen van (transmissie)risico's.

### **Conclusies**

*Trichinellose* is een zeldzame importziekte, maar door een toenemend voorkomen bij wild en veranderende veehouderijsystemen is een groter infectierisico een mogelijkheid. Daarnaast vereist EU-wetgeving informatie over welk type parasiet bij mens en dier voorkomt.

<b>Mogelijke toepassingen van moleculaire typering in surveillance van <i>Trichinella</i></b>	
Detectie van (diffuse) uitbraken	Ja
Bronattributie	Ja
Tracering in voedselketen	Ja
In kaart brengen van (zoönotische) transmissieroutes	Ja
Pathogeen-eigenschappen: (niet-)zoönotische typen, verschillen in pathogeniciteit	Ja



## 6 Conclusies en aanbevelingen

Dit rapport beschrijft een aantal aspecten van de huidige kiemsurveillance van een geselecteerde groep ziekteverwekkers waarbij voedsel in meer of mindere mate een rol speelt in de epidemiologie. Bij de selectie van de virale, bacteriële en parasitaire ziekteverwekkers is tevens rekening gehouden met ziektelast en kosten. De verschillende aspecten van de kiemsurveillance zijn per ziektekiem beschreven in afzonderlijke hoofdstukken waarbij elk hoofdstuk is afgesloten met de lacunes in de huidige kiemsurveillance, het nut van typering voor besluitvorming in relatie tot de voedselveiligheid en een aantal conclusies. Hieronder zijn per groep van organismen (virussen, bacteriën en parasieten) de conclusies zoals beschreven in de afzonderlijke hoofdstukken samengevat. Daarna volgt een meer algemene conclusie en aanbevelingen per groep van organismen.

### Conclusies rapport

#### **Virussen**

Voor een aantal in dit rapport opgenomen virussen is de rol van voedsel in de verspreiding onduidelijk. Dit geldt voor enterovirussen, rotavirussen en hepatitis E-virus. Aangezien enterovirus zich verspreidt via de oro-fecale route, en in vervuild water voor kan komen, is het mogelijk dat diffuse uitbraken door met enterovirus besmet voedsel plaatsvinden. Tot dusver is hierover echter weinig bekend. De moleculaire typering voor enterovirussen is vanaf 2010 in toenemende mate ingevoerd in Nederland. Mogelijk zal hierdoor meer inzicht verkregen worden in welke mate voedselgerelateerde besmettingen met enterovirus een rol spelen. Ook is de rol van voedsel bij ziektegevallen veroorzaakt door rotavirus in Nederland niet duidelijk. Er vindt geen systematische monitoring plaats van rotavirus in voedsel bij het RIVM en geen reguliere monitoring van rotavirussen in oppervlaktewater voor recreatie en drinkwaterproductie, terwijl puntmetingen uitwijzen dat rotavirus frequent in rioolwater, oppervlaktewater en oesters kan worden aangetroffen. Onduidelijk is of en in welke mate deze transmissieroutes een rol spelen. Om hierin duidelijkheid te krijgen is het noodzakelijk een representatieve steekproef van de in Nederland geïsoleerde stammen te genotypen en te sequencen. Kiemsurveillance bij HEV heeft primair tot doel inzicht te geven in mogelijke bronnen van HEV-infecties in Nederland (dieren, voedsel, water, bloedtransfusie). Desondanks zijn de incidentie, bronnen en transmissieroutes van het hepatitis E-virus in Nederland onbekend en is dus ook niet duidelijk in welke mate voedsel een rol speelt. De beschikbare expertise en aanwezige basisgegevens zijn echter wel geschikt voor het traceren van importgerelateerde voedselbronnen, zoals blijkt uit een eerste analyse van de database van EVENT. Bijna ieder deelnemend land wordt gekenmerkt door een eigen fylogenetisch cluster van hepatitis E-virussen gt3.

Voor een tweetal virussen is de rol van voedsel in de transmissie evident, te weten het hepatitis A-virus en norovirus. In het kader van voedselveiligheid is het nuttig om de kiemsurveillance voor HAV voort te zetten. Internationaal gezien is het van belang aan te sturen op de detectie van langere sequenties waarmee het beter mogelijk is gemeenschappelijke bronnen op te sporen bij internationale uitbraken. De bestaande surveillance voor norovirus, heeft in enkele gevallen geleid tot gedetailleerde beschrijvingen van de spreiding van norovirus, zowel door patiëntpopulaties als via de voedselketen. Structurele kiemsurveillance van norovirus is van belang om tijdig te kunnen waarschuwen bij bijvoorbeeld de opkomst van een nieuwe mogelijk pandemische variant (zoals GII.4) of om in te grijpen als er sprake is van mogelijk uitgebreide verspreiding van bijvoorbeeld besmette batches fruit. Analyse van de aanwezige data

heeft veel kennis opgeleverd over de mogelijke transmissie van norovirus via voedsel, en maakt het mogelijk verbanden te leggen tussen internationale uitbraken.

### **Bacteriën**

Van de in dit rapport behandelde bacteriële ziekteverwekkers is voor *Campylobacter*, *Salmonella*, STEC en *Listeria* het belang van voedsel in de epidemiologie duidelijk. Voor *Clostridium difficile*, *Coxiella burnettii* en *Staphylococcus aureus* (MRSA) is dit minder het geval. Ondanks het feit dat MRSA is aangetoond op rauw vlees in de detailhandel wijzen epidemiologische studies uit dat levensmiddelen geen of een verwaarloosbare rol spelen bij de verspreiding van MRSA onder de bevolking. Het typeren van stammen is onmisbaar bij het in kaart brengen van transmissieroutes van veegerelateerde MRSA waarbij uit recent onderzoek blijkt dat intensief contact met levend vee, vooral varkens, vleeskalveren en vleeskuikens, leidt tot een verhoogd risico op MRSA-dragerschap. Ook voor *C. difficile* is de rol van voedsel als transmissieroute onduidelijk ondanks het feit dat MLVA-typering van het PCR-ribotype 078 afkomstig van mens en varken suggereert dat er een directe transmissieroute of een gemeenschappelijke bron is. Bij verder gezonde mensen kan blootstelling wel tot dragerschap leiden maar deze is in verreweg de meeste gevallen asymptomatisch. Meestal pas bij bijkomende problemen, ziekenhuisopname, antibioticagebruik veroorzaken deze bacteriën problemen. Met betrekking tot *Coxiella* is er op dit moment alleen detectie maar geen kiemsurveillance geïmplementeerd in Nederland. Dit geldt voor zowel humaan materiaal als voor voedsel. Typeringsmethoden voor *Coxiella* worden op het moment ontwikkeld in diverse Nederlandse onderzoeksinstituten en ziekenhuizen (MLVA-, MLST- en SNP-typering). Typering van *Coxiella* in voedsel met de huidige methodes is erg moeilijk en de overdracht van infectie via voedsel zoals melk(producten) is erg twijfelachtig. Het is dan ook niet te verwachten dat typering een belangrijke rol zal gaan spelen bij besluitvorming betreffende voedselveiligheid.

Voor *Campylobacter* en *Salmonella*, is het voor een tijdige signalering en adequate bestrijding/onderzoek van uitbraken noodzakelijk dat het huidige surveillanceprogramma gehandhaafd blijft maar dat ook de regelgeving ten aanzien van het benaderen van patiënten wordt aangepast ten behoeve van het brononderzoek bij explosies. Een brede surveillance, waarbij ook veterinaire, voedsel- en omgevingsbronnen worden betrokken, blijft noodzakelijk voor het epidemiologisch-, transmissieonderzoek en attributieanalyses. Tevens is een dergelijk brede surveillance noodzakelijk om te voldoen aan de verplichte rapportages die moeten worden uitgebracht aan de EU. Voor de kiemsurveillance van *Campylobacter* en *Salmonella* zijn snellere, niet-kweekafhankelijke, moleculaire detectiemethoden noodzakelijk om binnen de voedselproductieketen sneller en efficiënter te kunnen ingrijpen.

De waarde van de huidige STEC-surveillance heeft zich al bewezen voor STEC-O157. Op grond van de surveillancedata konden verschillende clusters en nationale uitbraken worden geïdentificeerd en een aantal brononderzoeken en interventies succesvol worden uitgevoerd. Aandachtspunten voor verbetering van de huidige STEC-surveillance zijn de primaire diagnostiek (het selectieve testbeleid en de beperkte sensitiviteit van de kweekmethoden), de bevestiging van een positieve PCR-uitslag, het bekorten van de verschillende intervallen en het uitbreiden van de subtyperingstechnieken. Voor de surveillance van *Listeria* moet gestreefd worden naar een nationale database voor typeringsresultaten van zowel stammen als achtergrondgegevens die afkomstig zijn uit zowel de humane als alimentaire kiemsurveillance. Moleculaire typering gebaseerd op sequencing (MLST) zou de *Listeria*-kiemsurveillance in velerlei opzichten kunnen verbeteren, bijvoorbeeld: snelheid van typering, clusterherkenning, bronnenattributieanalyse, epidemiologisch inzicht in verschillen van (clusters van) stammen in virulentie en pathogeniciteit en overleving. Tevens zou MLST kunnen bijdragen aan een verbeterde internationale samenwerking met betrekking tot grensoverschrijdende explosies en regionale herkomst/verspreiding van stammen.

## Parasieten

Moleculaire detectie en identificatie door middel van moleculaire typering maken het mogelijk dat ook laboratoria zonder parasitologische expertise voedselgerelateerde parasitaire aandoeningen kunnen onderzoeken. Het achterhalen van het land van herkomst door middel van moleculaire typering kan leiden tot internationale afspraken voor wat betreft import en export van voedselgerelateerde producten en dieren. Tevens is moleculaire typering van parasieten noodzakelijk voor het vaststellen van relatieve bijdragen van transmissieroutes en daarmee het vaststellen van (transmissie)risico's. Voor *Echinococcus granulosus* en *Echinococcus multilocularis* is een uitgebreidere monitoring nodig en is een coördinatie en integratie van mens en diergegevens door het sporadisch voorkomen gewenst. Het RIVM vervult op dit moment de rol als referentiecentrum voor deze parasieten en verzorgt de coördinatie. Er is geen kiemsurveillance voor *Giardia intestinalis* en *Cryptosporidium parvum*. Sinds 2003 vinden verschillende onderzoeken plaats bij het RIVM in (inter)nationale samenwerkingen, naar het voorkomen en zoönotisch belang van *Giardia* en *Cryptosporidium*. Met betrekking tot *Toxoplasma gondii* wordt binnen het RIVM gewerkt aan een typeringsmethode voor vleesmonsters ter ondersteuning van attributieonderzoek. Op dit moment is de typering gebaseerd op één marker (DNA-sequentie). In de toekomst zal de typeringsmethode uitgebreid worden met meerdere markers. Trichinellose is een zeldzame importziekte, maar door een toenemend voorkomen bij wild en veranderende veehouderijsystemen is een groter infectierisico een mogelijkheid. Daarnaast vereist EU-wetgeving informatie over welk type parasiet bij mens en dier voorkomt.

## Algemene conclusie en aanbevelingen

### Virussen

Virussen zijn nog steeds moeilijk te detecteren in voedselproducten en omgevingsmonsters. Om dit probleem op te lossen zijn verbeterde isolatietechnieken, systemen om het virus te kunnen vermeerderen en gevoelige detectiemethoden noodzakelijk. Vervolgens worden zelden gestandaardiseerde methoden gebruikt in voedsel en/of in humaan materiaal, waarbij de gedetecteerde stukken DNA/RNA niet vergelijkbaar zijn tussen de verschillende laboratoria. Daarbij is de genomische informatie verkregen met een detectie-PCR niet altijd optimaal geschikt voor typering, omdat deze zijn gericht tegen een geconserveerde regio in het genoom, waardoor een additionele typerings-PCR noodzakelijk is. Een brede implementatie van de analysemethode voor norovirus, zoals beschreven in het proefschrift van Linda Verhoef (189), kan een belangrijke bijdrage leveren aan het tijdig opsporen van (diffuse) voedseluitbraken, en inzicht verschaffen in bronattributie en geografische herkomst. Een methode om 'in vivo' het virus te kunnen vermenigvuldigen draagt niet alleen bij aan een verbeterde gevoeligheid van de detectie van virussen in voedsel, maar geeft daarnaast ook de noodzakelijke informatie over of virussen infectie kunnen veroorzaken. Dit onderscheid is momenteel niet te maken waardoor overleving en/of inactivatie niet kan worden vastgesteld. Dit bemoeilijkt het aantonen van causaliteit, waardoor (internationale) producttracing niet altijd mogelijk is. Het is niet onwaarschijnlijk dat op de iets langere termijn metagenomisch onderzoek een rol kan spelen bij de analyse van voedselmonsters waarbij het mogelijk is viruserfelijk materiaal te detecteren en geheel te sequencen.

Het toeschrijven van een infectie aan het voorkomen van pathogenen in voedsel met behulp van moleculaire epidemiologie is beduidend moeilijker voor virussen dan bijvoorbeeld voor *Salmonella*. Dit heeft voor een groot deel te maken met de veelheid aan transmissieroutes, de hoge prevalentie van sommige virussen in de populatie en met de hierboven al aangestipte problemen bij het detecteren van virussen in voedsel waardoor geen uitgebreide stammencollecties aanwezig zijn. Daarnaast is er onvoldoende informatie over de diversiteit van de stammen in de achtergrondpopulatie,

wat noodzakelijk is voor bronattributie. De interpretatie van het vinden van identieke sequenties blijft daardoor onduidelijk. Bij virusuitbraken komt het vaak voor dat er sprake is van besmetting met meerdere typen, vooral ten gevolge van gebruik van verontreinigd water. Ondanks het feit dat meerdere typen betrokken zijn, wat fylogenetische analyse het detecteren van meerdere stammen die betrokken zijn bij één uitbraak niet ondersteunt, blijkt het door gebruik te maken van een geschikt algoritme (3) toch mogelijk deze clusters met behulp van fylogenie te herkennen. Dit vanwege het specifieke epidemiologische karakter van een samengesteld cluster en de eigenschap dat iedere afzonderlijke stam binnen zo'n cluster evolueert.

Noodzakelijk is ook data-sharing van epidemiologische en moleculaire data in web-based databases, zoals het 'Moleculair Platform', worden uitgebreid. Databases zoals het 'Moleculair Platform' kunnen gebruikt worden voor de implementatie van nieuwe methoden die de communicatie tijdens uitbraken kunnen vergemakkelijken. Voorbeelden hiervan zijn de *norovirus genotyping tool* van (190) en de *selection tool for foodborne norovirus outbreaks* van (2) (deze zijn al via het Moleculair Platform beschikbaar). Een brede implementatie van de door het RIVM (Linda Verhoef) ontwikkelde tool 'voor het identificeren van informatieve regio's binnen het genoom van virussen' en de opslag van de verkregen genomische informatie in long term-databases met daarbij de koppeling met epidemiologische gegevens zullen bijdragen aan het eerder en betrouwbaarder herleiden van een (diffuse) uitbraak naar voedsel als bron waardoor het beleid eerder kan overgaan tot (internationale) actie.

Samengevat, binnen het veld van de moleculaire typering van voedselgerelateerde virussen is er dringend behoefte aan i) systematische moleculaire surveillance van sporadische gevallen en (voedselgerelateerde) uitbraken van gastro-enteritis; ii) internationale data-mining van sequenties met epidemiologische data volgens een consensus detectie- en typeringsmethode; iii) analyse- en reken capaciteit met betrekking tot data in moleculaire databases; iv) detectiemethoden die gevoelig genoeg zijn om de lage dosis virussen in van nature gecontamineerd voedsel te detecteren.

### **Bacteriën**

In de loop van de tijd zijn de mogelijkheden om bacteriestammen van elkaar te onderscheiden sterk toegenomen en verschuift de bacteriële typering meer en meer van de traditionele typeringsmethoden zoals serotypering en faagtypering naar moleculaire methoden. In het algemeen moeten typeringsmethoden voldoen aan een aantal criteria zoals typeerbaarheid, stabiliteit, discriminerend vermogen, concordantie met de epidemiologische vraagstelling en reproduceerbaarheid. Daarnaast spelen flexibiliteit, snelheid, kosten, gebruikersgemak en toegankelijkheid een rol. Afhankelijk van de epidemiologische vraagstelling verschillen de eisen die gesteld worden aan deze criteria. Met andere woorden er is geen universeel toepasbare typeringsmethode beschikbaar. 'Whole Genome Sequencing', weliswaar nu nog door velen als veel te duur en tijdrovend gevonden om als routine genotyperingsmethode te gebruiken, komt dicht in de buurt van een universele methode. De nieuwe generatie van high throughput sequencers (Roche.454, Illumina/Solexa, Life/APG, Helicos Biosciences, Pacific Biosciences, en in de toekomst de nano-pore sequencers) maakt het mogelijk om binnen een kort tijdsbestek (een tot enkele dagen) het gehele genoom van een micro-organisme grotendeels te bepalen. Capaciteit om grote hoeveelheden sequentie data te verwerken en analyseren met voor surveillance acceptabele snelheid zal dan wel vergelijkbaar moeten toenemen. Voordelen van Whole Genome Sequencing zijn: (i) dat op detailniveau de verspreiding van een pathogeen kan worden bestudeerd en dat onderscheid gemaakt kan worden tussen isolaten wat met de bestaande typeringsmethoden soms niet mogelijk is, (ii) de methode universeel toepasbaar is, (iii) data digitaal beschikbaar is, (iv) afhankelijk van de epidemiologische vraagstelling kan worden ingezoomd op verschillende genen of regionen met meer of minder variatie in het DNA, (v) daarnaast, en zeker niet

onbelangrijk, bevat de verkregen genom informatie alle informatie van de tot nu toe opgeslagen moleculaire typeringsdata en blijven zodoende de bestaande databanken van waarde, (vi) De data gegenereerd met Whole Genome Sequencing bevat tevens alle biologische significante informatie op het gebied van virulentie, adaptatie en antibioticaresistentie .

### **Parasieten**

Het gebruik van moleculaire typering in de risicoanalyse en epidemiologie van voedselgerelateerde parasieten loopt in het algemeen ver achter bij dat van de virussen en bacteriën. De belangrijkste redenen hiervoor zijn dat de (schijnbare) ziektelast van parasieten laag is en dat parasitaire ziekten vaak ten onrechte in verband worden gebracht met exotische landen met als gevolg dat bij een diagnose niet altijd aan een parasitaire infectie wordt gedacht. Daarnaast is de genetische informatie van parasieten vele malen complexer dan dat van virussen en bacteriën en veel parasieten zijn niet te kweken in een (routine)laboratorium.

Vervolgens vindt routinematige moleculaire diagnostiek van parasieten slechts in een beperkt aantal laboratoria plaats en is moleculaire detectie, diagnostiek (en identificatie) van parasieten in voedsel(bronnen) niet gevoelig genoeg en daardoor niet in staat om de enorme diversiteit in parasieten te ondervangen. Dit alles heeft tot gevolg dat de ziektelast van parasitaire aandoeningen vaak wordt onderschat, zoals aangetoond is voor *Toxoplasmosis*. Tevens blijkt dat er onvoldoende moleculaire diagnostiek beschikbaar is om de grote verscheidenheid aan parasieten als gevolg van toename in reizen, transport van voedsel en dieren en door veranderde eetgewoonten op te sporen.

Binnen het veld van de moleculaire typering van voedselgerelateerde parasieten is er dringend behoefte aan: (i) methoden om parasieten te detecteren/isoleren in voedsel, (ii) generieke detectiemethoden van groepen (nematodes, cestodes, trematodes, et cetera) en (iii) moleculaire identificatiemethoden gekoppeld aan conventionele gebruikte methode ondersteund door een universele web-based database, gehuisvest bij bijvoorbeeld NRL-parasieten. Om de genetische informatie te kunnen gaan gebruiken voor moleculaire typeringen en kiemsurveillance, is het noodzakelijk dat van ten minste vijf isolaten van de vijf belangrijkste parasitaire aandoeningen in Nederland de gehele sequentie wordt opgehelderd, waardoor het mogelijk is regio's in het genoom te identificeren die geschikt zijn om de verschillende vraagstellingen gekoppeld aan moleculaire typering te kunnen beantwoorden. Wenselijk is ook te investeren in internationale moleculaire epidemiologische databases (onder andere voor *Giardia*) en deze uit te breiden met nieuwe epidemiologische velden en markers.





## Lijst van afkortingen

AFLP	Amplification Fragment Length Polymorphism
BSL3	Biosafety level 3
CDAD	<i>C. difficile</i> associated diarrhoea
CDI	<i>C. difficile</i> infection
cDNA	copy-DNA
CIb	Centrum Infectieziektenbestrijding (RIVM)
cfu	Colony forming unit
CVI	Centraal Veterinair Instituut
CWZ	Canisius-Wilhelmina Ziekenhuis
DALY	Disability-adjusted life year
DNA	Desoxyribo nucleic acid (desoxyribonucleïnezuur)
ECDC	European Centre for Disease Prevention and Control
EFSA	European Food Safety Authority
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EPI	Epidemiologie en Surveillance van Infectieziekten (nu IES)
ESBL	Extended Spectrum Bèta-Lactamase
FBVE	Food Borne Viruses in Europe
FWD	Food and Waterborn Disease network
GGD	Gemeentelijke gezondheidsdienst
HAV	Hepatitis-A virus
HEV	Hepatitis-E virus
HPA	Health Protection Agency
IGZ	Inspectie voor de Gezondheidszorg
IgM	Immunoglobuline M
IgG	Immunoglobuline G
IUVD	Intra-uteriene vruchtdood
JBZ	Jeroen Bosch Ziekenhuis
LIS	Het huidige IDS (Infectieziektenonderzoek, diagnostiek en screening), RIVM
LUMC	Leids Universitair Medisch Centrum
LZO	Het huidige cZ&O (Centrum voor zoönose en omgevingsmicrobiologie)
MARAN	Monitoring van antibiotica resistentie en antibiotica gebruik in dieren in Nederland
MLST	Multilocus sequence typing
MLVA	Multilocus variable number tandem repeat (VNTR) analysis
MML's	Medisch microbiologische laboratoria
MRSA	Methicilline-resistente <i>Staphylococcus aureus</i>
NoV	Norovirus
NVWA	Nederlandse Voedsel- en Warenautoriteit
PCR	Polymerase chain reaction
PGFE	Pulsed field gel electroforese ( )
PVE	Productschap vee, vlees en eieren
RASFF	Rapid Alert System for Food and Feed
RIVM	Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
STEC	Shiga toxine producerende <i>E. coli</i>
TBC	Tuberculose
TESSY	The European Surveillance System database

Tabel 2. Eigenschappen van de bestaande (kiem)surveillance van enterovirus, hepatitis A, hepatitis E, norovirus en rotavirus en bacteriële pathogenen

Pathofoon	Gegevensopslag			Dekking; Tijdigheid, EW	Doel	Standaard Output	Opmerkingen In ontwikkeling (io)
	Isolaten	Typering	Vragenlijst				
Enterovirus	Streeklabs/RIVM, mens RIVM, rioolwater Oppervlaktewater	Streeklab/RIVM, sequentie en kweek Moleculair platform/Bionumerics sequenties	Labsurveillance	64% voormalige streeklabs; 2-14 dagen	Diagnostiek, signalering, bronopsporing, uitsluiten polio	Infectieziekten bulletin; terugrapportage diagnostiek/moleculair platform, signaleringsoverleg	<i>broncontact tracering alleen bij explosies</i>
Hepatitis A	RIVM/GGD ZHW, mens NVWA, voedsel	LIMS: diagnostiek Bionumerics: sequenties	Labsurveillance	100%, aangifteplichtig 1-2 weken	Signalering, bron- en contactopsporing (risicofactoren, transmissieroutes), detectie diffuse uitbraken	Infectieziekten bulletin; terugrapportage diagnostiek/moleculair platform; signaleringsoverleg	<i>Zeer effectief vaccin beschikbaar, werkt ook post-expositie</i>
Hepatitis E	RIVM/UMCG, mens/dier	LIMS: Serologie Bionumerics: sequenties	Labsurveillance (epidemiologisch onderzoek)	Onbekend, Onderdiagnostiek; 1 week	Signalering, bron- en contactopsporing, risicofactoren, transmissieroutes	Infectieziekten bulletin; terugrapportage diagnostiek; signaleringsoverleg	<i>Incidentie nog onduidelijk</i>
Norovirus	Streeklabs/RIVM, mens NVWA/RIVM, voedsel Oppervlaktewater, rioolwater	LIMS: diagnostiek Moleculair platform/Bionumerics sequenties	Labsurveillance (GEOPS 2008-9)	Tot 2010 100%, daarna onbekend door nieuwe surveillance; 5 werkdagen	Trend, signalering, bron- en contactopsporing, risicofactoren, transmissieroutes, detectie diffuse uitbraken	Infectieziekten bulletin; terugrapportage diagnostiek/moleculair platform, signaleringsoverleg	<i>Sinds 1999 Europese uitbraakdatabase in het kader van FBVE- netwerk</i>
Rotavirus	<i>Streeklabs/RIVM, mens</i>	<i>LIMS: diagnostiek Moleculair platform/Bionumerics sequenties</i>	<i>Labsurveillance (GEOPS 2008-9)</i>	<i>Onbekend, niet landelijk, TypeNed; 5 werkdagen</i>	<i>Monitoring vaccinatie- programma</i>	<i>Infectieziekten bulletin; terugrapportage diagnostiek/EuroRotaNet, signaleringsoverleg</i>	<i>Genotypering in beperkte mate te gebruiken voor linken van uitbraken</i>

Pathofoon	Gegevens opslag			Dekking; Tijdigheid, EW	Doel	Standaard Output	Opmerkingen In ontwikkeling (io)
	Isolaten	Typering	Vragenlijst				
<i>Campylobacter</i> spp.	Streeklabs/ CVI (selectie) NVWA, voedsel (PVE)	CVI projectbasis: MLST AFLP	Labsurveillance (patiëntcontrole, 2002-2003 (CaSa))	52% voormalige streeklabs EW: 1-6 weken	Trend, resistentie, signalering, bronopsporing (risicofactoren, transmissieroutes)	EFSA; ECDC; OIE; GE-notitie; Staat van de zoönosen; signaleringsoverleg	<i>broncontacttracing (AFLP)</i> <i>alleen bij explosies</i>
<i>Salmonella</i> spp.	RIVM, mens NVWA, voedsel CVI, ABR (PVE)	LIMS: Sero-/faag-typering; MLVA (ST) Bionumerics: PFGE EXCELL: antibiogram	Labsurveillance (patiëntcontrole, 2002-2003 (CaSa))	64% voormalige streeklabs EW: 2-4 weken	Trend, resistentie, signalering, bron- en contactopsporing (risicofactoren, transmissieroutes)	EFSA; ECDC; OIE; GE-notitie; Staat van de zoönosen; tabellarisch overzicht (NVWA); signaleringsoverleg	<i>MLVA SE io</i> <i>MLST serotypering en faagtypering io. (Achtman)</i> <i>Na MLST → SNP</i> <i>PFGE bij explosies</i>
<i>Listeria monocytogenes</i>	RIVM, mens NVWA, voedsel	LIMS: Sero-typering Bionumerics: PFGE EXCELL: antibiogram	Labsurveillance patiëntcontrole continu (beperkt), vanaf 2008	100% Aangifte EW: 1 week Typering: 2 (klassiek) -12 weken (moleculair)	Trend, resistentie, signalering, bron- en contactopsporing, risicofactoren, transmissieroutes	EFSA; ECDC; OIE; GE-notitie; Staat van de zoönosen; signaleringsoverleg	<i>ht-AFLP io (VUmc)</i> <i>PFGE bij explosies,</i> <i>anders elk half jaar</i>
STEC (non-) O157	RIVM, mens NVWA, voedsel	LIMS: Sero-Virulo-typering Bionumerics: PFGE EXCELL: antibiogram	Labsurveillance patiëntcontrole continu (beperkt), vanaf 2008	100% Aangifte EW: 1 week Typering: 2 (klassiek) -12 weken (moleculair)	Trend, resistentie, signalering, bron- en contactopsporing, risicofactoren, transmissieroutes	EFSA; ECDC; OIE; GE-notitie; Staat van de zoönosen; signaleringsoverleg	<i>PFGE bij explosies,</i> <i>anders elk kwartaal</i>

Pathoegen	PFGE	MLVA	Multilocus sequencing (Single locus sequencing)
<i>Campylobacter</i> spp.	Ribot et al. Microbiol. 2001 39(5):1889-94. (191)		Dingle et al. J Clin Microbiol. 2001 39:14-23. (192) (Djordjevic et al. ( <i>flaA</i> gene). J Clin Microbiol. 2007 45(1):102-8.) (193)
<i>Salmonella</i> spp.	pta et al. (PulseNet) J Infect Dis. 2003 188(11): 1707-16 (194) Peters et al. (Salm-gene). Euro Surveill. 2003 8(2):46-50. (195)	Lindstedt et al. (MLVA ST) J Appl Microbiol. 2007;102(3):728-35. (196) Beranek et al. (MLVA SE). Int J Med Microbiol. 2009 299(1):43-51 (197) Malorny et al. (MLVA SE). BMC Microbiology 2008 8:84. (198) Boxrud et al. J Clin Microbiol. 2007 45(2):536-543. (199)	Kotetishvili et al. J Clin Microbiol. 2002 40:1626-35. Lan et al. Infection, Genetics and Evolution, 2009. (200) 9(5):996-1005.{Kotetishvili, 2002 #82} Kidgell et al. (S. Typhi). Infection, Genetics and Evolution, 2002 2(1): 39-45. (201) Tankouo-Sandjonga et al. (MLST-virulotyping). Journal of Microbiological Methods, 2007 69(1):23-36. (202) Huehn et al. (MLST-virulotyping) Foodborne Pathogens and Disease, 2009 6(4). (152)
<i>Listeria monocytogenes</i>	Martin et al. (PulseNet) Foodborne Pathog Dis. 2006 3(3):303-8. (203) Lukinma et al. Clin Microbiol Infect. 2004 10:562-8. (204)	Murphy et al. International Journal of Food Microbiology, 2007, 115(2): 187-194.{Murphy, 2007 #87} Lindstedt et al. Journal of Microbiological Methods, 2008 72(2):141-148. (205)	Salcedo et al. J Clin Microbiol. 2003, 41(2):757-62. (206)
STEC (non-)O157	Gerner-Smidt et al. (PulseNet). Foodborne Pathog Dis. 2006 3:74-80. (207) Stine et al. J Clin Microbiol. 2003 41:675-9 (208)	Hyytia-Trees et al. Foodborne Pathog Dis. 2006 3:118-31. (209) Lindstedt et al. Journal of Microbiological Methods, 2007 69(1): 197-205. (130)	Noller et al. J Clin Microbiol. 2003 41:675-9. (210)

## 7 Literatuur

1. Boot HJ. Surveillance van pathogenen in Nederland: Detailkarakterisering van pathogenen die relevant zijn voor de openbare gezondheidszorg. Report RIVM. 2006.
2. Verhoef L, Kroneman A, Van Duijnhoven Y, Boshuizen H, van Pelt W, Koopmans M. Selection tool for foodborne norovirus outbreaks. *Emerg Infect Dis.* 2009;15(1):31-8.
3. Verhoef L, Vennema H, van Pelt W, Lees D, Boshuizen H, Henshilwood K, et al. Use of norovirus genotype profiles to differentiate origins of foodborne outbreaks. *Emerg Infect Dis.* 2010;16(4):617-24. Epub 2010/03/31.
4. Verhoef L, Kouyos RD, Vennema H, Kroneman A, Siebenga J, van Pelt W, et al. An integrated approach to identifying international foodborne norovirus outbreaks. *Emerg Infect Dis.* 2011;17(3):412-8. Epub 2011/03/12.
5. Barker GC, Gomez N, Smid J. An introduction to biotracing in food chain systems. *Trends in Food Science & Technology.* 2009(20):220-6.
6. van Belkum A, Tassios PT, Dijkshoorn L, Haeggman S, Cookson B, Fry NK, et al. Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. *Clin Microbiol Infect.* 2007;13 Suppl 3:1-46. Epub 2007/11/06.
7. Foley SL, Lynne AM, Nayak R. Molecular typing methodologies for microbial source tracking and epidemiological investigations of Gram-negative bacterial foodborne pathogens. *Infect Genet Evol.* 2009;9(4):430-40. Epub 2009/05/23.
8. Holmes EC, Grenfell BT. Discovering the phylodynamics of RNA viruses. *PLoS Comput Biol.* 2009;5(10):e1000505. Epub 2009/10/27.
9. Xerry J, Gallimore CI, Iturriza-Gomara M, Gray JJ. Tracking the transmission routes of genogroup II noroviruses in suspected food-borne or environmental outbreaks of gastroenteritis through sequence analysis of the P2 domain. *J Med Virol.* 2009;81(7):1298-304. Epub 2009/05/29.
10. Cebula TA, Brown EW, Jackson SA, Mammel MK, Mukherjee A, LeClerc JE. Molecular applications for identifying microbial pathogens in the post-9/11 era. *Expert Rev Mol Diagn.* 2005;5(3):431-45. Epub 2005/06/07.
11. Siebenga JJ, Lemey P, Kosakovsky P, Rambaut A, Vennema H, Koopmans M. Phylodynamic reconstruction reveals norovirus GII.4 epidemic expansions and their molecular determinants. *PLoS Pathog.* 2010;6(5):e1000884. Epub 2010/05/14.
12. Le Guyader FS, Le Saux JC, Ambert-Balay K, Krol J, Serais O, Parnaudeau S, et al. Aichi virus, norovirus, astrovirus, enterovirus, and rotavirus involved in clinical cases from a French oyster-related gastroenteritis outbreak. *J Clin Microbiol.* 2008;46(12):4011-7. Epub 2008/10/10.
13. Sinclair RG, Jones EL, Gerba CP. Viruses in recreational water-borne disease outbreaks: a review. *J Appl Microbiol.* 2009;107(6):1769-80. Epub 2009/06/03.
14. Cheong S, Lee C, Song SW, Choi WC, Lee CH, Kim SJ. Enteric viruses in raw vegetables and groundwater used for irrigation in South Korea. *Appl Environ Microbiol.* 2009;75(24):7745-51. Epub 2009/10/27.
15. Scarcella C, Carasi S, Cadoria F, Macchi L, Pavan A, Salamana M, et al. An outbreak of viral gastroenteritis linked to municipal water supply, Lombardy, Italy, June 2009. *Euro Surveill.* 2009;14(29). Epub 2009/08/01.

16. Bruisten SM, Tjon GM, van den Hoek JA, Wijkmans CJ, Gotz HM, Coutinho RA. [The molecular epidemiology of hepatitis A in The Netherlands; the usefulness of typing isolated viral strains]. *Ned Tijdschr Geneeskd*. 2007;151(50):2779-86. Moleculaire epidemiologie van hepatitis A in Nederland; het nut van het typeren van geïsoleerde virusstammen.
17. Tjon GM, Wijkmans CJ, Coutinho RA, Koek AG, van den Hoek JA, Leenders AC, et al. Molecular epidemiology of hepatitis A in Noord-Brabant, The Netherlands. *J Clin Virol*. 2005;32(2):128-36.
18. van Steenberghe JE, Tjon G, van den Hoek A, Koek A, Coutinho RA, Bruisten SM. Two years' prospective collection of molecular and epidemiological data shows limited spread of hepatitis A virus outside risk groups in Amsterdam, 2000-2002. *J Infect Dis*. 2004;189(3):471-82.
19. Koopmans M, von Bonsdorff CH, Vinje J, de Medici D, Monroe S. Foodborne viruses. *FEMS Microbiol Rev*. 2002;26(2):187-205.
20. Petrignani M, Harms M, Verhoef L, van Hunen R, Swaan C, van Steenberghe J, et al. Update: a food-borne outbreak of hepatitis A in the Netherlands related to semi-dried tomatoes in oil, January-February 2010. *Euro Surveill*. 2010;15(20). Epub 2010/05/28.
21. de Melker HE, Hahne SJM, Boer de IM. The national immunisation programme in the Netherlands: Current status and potential future developments. Bilthoven: RIVM, 2005 210021002.
22. Verhoef L, Boot HJ, Koopmans M, Mollema L, Van Der Klis F, Reimerink J, et al. Changing risk profile of hepatitis A in The Netherlands: a comparison of seroprevalence in 1995-1996 and 2006-2007. *Epidemiol Infect*. 2011;139(8):1172-80. Epub 2011/01/14.
23. Kohl I, Nemecek V, Summerova M, Chlibek R, Nad'ova K, Minarikova O. Long-term protective effect of post-exposure Havrix administration during viral hepatitis Type A outbreaks. *Eur J Epidemiol*. 2006;21(12):893-9. Epub 2006/12/13.
24. Petrignani M, Verhoef L, van Hunen R, Swaan C, van Steenberghe J, Boxman I, et al. A possible foodborne outbreak of hepatitis A in the Netherlands, January-February 2010. *Euro Surveill*. 2010;15(11). Epub 2010/03/27.
25. van der Poel WH, Verschoor F, van der Heide R, Herrera MI, Vivo A, Kooreman M, et al. Hepatitis E virus sequences in swine related to sequences in humans, The Netherlands. *Emerg Infect Dis*. 2001;7(6):970-6.
26. Yan Y, Zhang W, Shen Q, Cui L, Hua X. Prevalence of four different subgenotypes of genotype 4 hepatitis E virus among swine in the Shanghai area of China. *Acta Vet Scand*. 2008;50:12. Epub 2008/06/03.
27. Borgen K, Herremans T, Duizer E, Vennema H, Rutjes S, Bosman A, et al. Non-travel related Hepatitis E virus genotype 3 infections in the Netherlands; a case series 2004 - 2006. *BMC Infect Dis*. 2008;8:61.
28. Haagsma EB, van den Berg AP, Porte RJ, Benne CA, Vennema H, Reimerink JH, et al. Chronic hepatitis E virus infection in liver transplant recipients. *Liver Transpl*. 2008;14(4):547-53.
29. Rutjes SA, Lodder WJ, Bouwknegt M, de Roda Husman AM. Increased hepatitis E virus prevalence on Dutch pig farms from 33 to 55% by using appropriate internal quality controls for RT-PCR. *J Virol Methods*. 2007;143(1):112-6.
30. Tei S, Kitajima N, Takahashi K, Mishiro S. Zoonotic transmission of hepatitis E virus from deer to human beings. *Lancet*. 2003;362(9381):371-3.
31. Yazaki Y, Mizuo H, Takahashi M, Nishizawa T, Sasaki N, Gotanda Y, et al. Sporadic acute or fulminant hepatitis E in Hokkaido, Japan, may be food-borne, as suggested by the presence of hepatitis E virus in pig liver as food. *J Gen Virol*. 2003;84(Pt 9):2351-7.

32. Lewis HC, Wichmann O, Duizer E. Transmission routes and risk factors for autochthonous hepatitis E virus infection in Europe: a systematic review. *Epidemiol Infect.* 138(2):145-66.
33. Waar K, Herremans MM, Vennema H, Koopmans MP, Benne CA. Hepatitis E is a cause of unexplained hepatitis in The Netherlands. *J Clin Virol.* 2005;33(2):145-9.
34. Herremans M, Vennema H, Bakker J, van der Veer B, Duizer E, Benne CA, et al. Swine-like hepatitis E viruses are a cause of unexplained hepatitis in the Netherlands. *J Viral Hepat.* 2007;14(2):140-6. Epub 2007/01/25.
35. Anonymous. Volksgezondheid Toekomst Verkenning, Nationaal Kompas Volksgezondheid. Bilthoven: RIVM, 2009 24 september 2009 Report No.
36. Kroneman A, Vennema H, Harris J, Reuter G, von Bonsdorff CH, Hedlund KO, et al. Increase in norovirus activity reported in Europe. *Euro Surveill.* 2006;11(12):E061214 1.
37. Lopman B, Vennema H, Kohli E, Pothier P, Sanchez A, Negredo A, et al. Increase in viral gastroenteritis outbreaks in Europe and epidemic spread of new norovirus variant. *Lancet.* 2004;363(9410):682-8.
38. Siebenga JJ, Vennema H, Zheng DP, Vinje J, Lee BE, Pang XL, et al. Norovirus Illness Is a Global Problem: Emergence and Spread of Norovirus GII.4 Variants, 2001-2007. *J Infect Dis.* 2009;200(5):802-12.
39. Verhoef L, Depoortere E, Boxman I, Duizer E, van Duynhoven Y, Harris J, et al. Emergence of new norovirus variants on spring cruise ships and prediction of winter epidemics. *Emerg Infect Dis.* 2008;14(2):238-43.
40. Kroneman A, Vennema H, Van Duynhoven Y, Duizer E, Koopmans M. High number of norovirus outbreaks associated with a GGII.4 variant in the Netherlands and elsewhere: does this herald a worldwide increase? *Euro Surveill.* 2004;8(52):pii=2606.
41. Verhoef L, Boxman I, Koopmans M. Viruses transmitted through the food-chain: a review of the latest developments. *CAB Reviews.* 2008;accepted.
42. Lopman B, van Duynhoven Y, Hanon FX, Reacher M, Koopmans M, Brown D. Laboratory capability in Europe for foodborne viruses. *Euro Surveill.* 2002;7(4):61-5.
43. Boxman IL, Tilburg JJ, te Loeke NA, Vennema H, de Boer E, Koopmans M. An efficient and rapid method for recovery of norovirus from food associated with outbreaks of gastroenteritis. *J Food Prot.* 2007;70(2):504-8.
44. Svraka S, van der Veer B, Duizer E, Dekkers J, Koopmans M, Vennema H. Novel approach for detection of enteric viruses to enable syndrome surveillance of acute viral gastroenteritis. *J Clin Microbiol.* 2009;47(6):1674-9.
45. Tan M, Jiang X. Norovirus and its histo-blood group antigen receptors: an answer to a historical puzzle. *Trends Microbiol.* 2005;13(6):285-93.
46. Marionneau S, Ruvoen N, Le Moullac-Vaidye B, Clement M, Cailleau-Thomas A, Ruiz-Palacois G, et al. Norwalk virus binds to histo-blood group antigens present on gastroduodenal epithelial cells of secretor individuals. *Gastroenterology.* 2002;122(7):1967-77.
47. de Wit MA, Koopmans MP, van der Blij JF, van Duynhoven YT. Hospital admissions for rotavirus infection in the Netherlands. *Clin Infect Dis.* 2000;31(3):698-704.
48. de Wit MA, Koopmans MP, Kortbeek LM, Wannet WJ, Vinje J, van Leusden F, et al. Sensor, a population-based cohort study on gastroenteritis in the Netherlands: incidence and etiology. *Am J Epidemiol.* 2001;154(7):666-74.
49. Anonymous, WHO, FAO. Viruses in food: scientific advice to support risk management activities. 2008.
50. Widdowson MA, van Doornum GJ, van der Poel WH, de Boer AS, Mahdi U, Koopmans M. Emerging group-A rotavirus and a nosocomial outbreak of diarrhoea. *Lancet.* 2000;356(9236):1161-2.



51. Iturriza-Gomara M, Dallman T, Banyai K, Bottiger B, Buesa J, Diedrich S, et al. Rotavirus surveillance in Europe, 2005-2008: web-enabled reporting and real-time analysis of genotyping and epidemiological data. *J Infect Dis*. 2009;200 Suppl 1:S215-21.
52. Soares-Weiser K, Goldberg E, Tamimi G, Pitan OC, Leibovici L. Rotavirus vaccine for preventing diarrhoea. *Cochrane Database Syst Rev*. 2004(1):CD002848.
53. Koopmans M, Brown D. Seasonality and diversity of Group A rotaviruses in Europe. *Acta Paediatr Suppl*. 1999;88(426):14-9.
54. Gotz H, Koopmans M, Bijlmer H. Een algoritme ter ondersteuning van de openbare gezondheidszorg bij uitbraken van gastro-enteritis. *Ned Tijdschr Med Microbiol*. 2008;16(2):11-5.
55. Teunis P, Van den Brandhof W, Nauta M, Wagenaar J, Van den Kerkhof H, Van Pelt W. A reconsideration of the *Campylobacter* dose-response relation. *Epidemiol Infect*. 2005;133(4):583-92.
56. Van Pelt W, Friesema I, Doorduyn Y, De Jager C, Van Duynhoven YT. Trends in Gastro-enteritis in Nederland; notitie met betrekking tot 2007. briefrapport. RIVM, 2009 210221001.
57. Anonymous. Annual Epidemiological Report on Communicable Diseases in Europe 2009. European Centre for Diseases Prevention and Control., 2009.
58. Vogt RL, Sours HE, Barrett T, Feldman RA, Dickinson RJ, Witherell L. *Campylobacter* enteritis associated with contaminated water. *Ann Intern Med*. 1982;96(3):292-6. Epub 1982/03/01.
59. Doorduyn Y, Van Den Brandhof WE, Van Duynhoven YT, Breukink BJ, Wagenaar JA, Van Pelt W. Risk factors for indigenous *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* infections in The Netherlands: a case-control study. *Epidemiol Infect*. 2010;138(10):1391-404. Epub 2010/03/13.
60. Doorduyn Y, van den Brandhof WE, Van Duynhoven YT, Wannet WJ, Van Pelt W. Risk factors for endemic *Campylobacter jejuni* and *coli* infections in the Netherlands: a case control study. *Epidemiology Infection*. 2009.
61. Louwen RP, van Belkum A, Wagenaar JA, Doorduyn Y, Achterberg R, Endtz HP. Lack of association between the presence of the pVir plasmid and bloody diarrhea in *Campylobacter jejuni* enteritis. *J Clin Microbiol*. 2006;44(5):1867-8.
62. van der Beek MT, Claas EC, Mevius DJ, van Pelt W, Wagenaar JA, Kuijper EJ. Inaccuracy of routine susceptibility tests for detection of erythromycin resistance of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Clin Microbiol Infect*. 2010;16(1):51-6. Epub 2009/05/15.
63. Jore S, Viljugrein H, Brun E, Heier BT, Borck B, Ethelberg S, et al. Trends in *Campylobacter* incidence in broilers and humans in six European countries, 1997-2007. *Prev Vet Med*. 2010;93(1):33-41. Epub 2009/10/20.
64. Kovats RS, Edwards SJ, Charron D, Cowden J, D'Souza RM, Ebi KL, et al. Climate variability and *campylobacter* infection: an international study. *Int J Biometeorol*. 2005;49(4):207-14.
65. Smid J, French NP, Mullner P, van Bergen MAP, Wagenaar J, Havelaar AH, et al. Preliminary results for source attribution of human *campylobacteriosis* in the Netherlands. A proof of principle. Brief-report. RIVM, 2009 210202001/2009.
66. Mevius DJ, Wit B, Van Pelt W. Monitoring of Antimicrobial Resistance And Antibiotic Usage in Animals in the Netherlands in 2006/2007. Maran, 2007.
67. Anonymous. The Community Summary Report on trends and Sources of zoonoses and zoonotic agents in the European Union in 2007. 2009.
68. Van Pelt W, Braks MAH, Schimmer B, Stenvers O, Langelaar MFM. Staat van zoonosen 2007-2008. RIVM, 2009 330131001/2009.

69. van Hees BC, Veldman-Ariesen M-J, de Jongh BM, Tersmette M, Van Pelt W. Regional and seasonal differences in incidence and antibiotic resistance of *Campylobacter* from a nationwide surveillance study in the Netherlands: an overview of 2000-2004. *Clin Microbiol Infect.* 2007;13:305-10.
70. van Pelt W, de Wit MA, Wannet WJ, Ligtoet EJ, Widdowson MA, van Duynhoven YT. Laboratory surveillance of bacterial gastroenteric pathogens in The Netherlands, 1991-2001. *Epidemiol Infect.* 2003;130(3):431-41.
71. French NP, Midwinter A, Holland B, Collins-Emerson J, Pattison R, Colles F, et al. Molecular epidemiology of *Campylobacter jejuni* isolates from wild-bird fecal material in children's playgrounds. *Appl Environ Microbiol.* 2009;75(3):779-83.
72. Garrett N, Devane ML, Hudson JA, Nicol C, Ball A, Klena JD, et al. Statistical comparison of *Campylobacter jejuni* subtypes from human cases and environmental sources. *J Appl Microbiol.* 2007;103(6):2113-21.
73. Ogden ID, Dallas JF, MacRae M, Rotariu O, Reay KW, Leitch M, et al. *Campylobacter* excreted into the environment by animal sources: prevalence, concentration shed, and host association. *Foodborne Pathog Dis.* 2009;6(10):1161-70.
74. Wilson DJ, Gabriel E, Leatherbarrow AJ, Cheesbrough J, Gee S, Bolton E, et al. Tracing the source of campylobacteriosis. *PLoS Genet.* 2008;4(9):e1000203.
75. Kuijper EJ, Coignard B, Tüll P. Emergence of *Clostridium difficile*-associated disease in North America and Europe. *Clin Microbiol Infect.* 2006;12(suppl. 6):2-18.
76. Kuijper EJ, van den Berg RJ, Debast S, Visser CE, Veenendaal D, Troelstra A, et al. *Clostridium difficile* ribotype 027, toxinotype III, the Netherlands. *Emerg Infect Dis.* 2006;12(5):827-30. Epub 2006/05/18.
77. Warny M, Pepin J, Fang A, Killgore G, Thompson A, Brazier J, et al. Toxin production by an emerging strain of *Clostridium difficile* associated with outbreaks of severe disease in North America and Europe. *Lancet.* 2005;366(9491):1079-84. Epub 2005/09/27.
78. Pepin J, Valiquette L, Cossette B. Mortality attributable to nosocomial *Clostridium difficile*-associated disease during an epidemic caused by a hypervirulent strain in Quebec. *CMAJ.* 2005;173(9):1037-42. Epub 2005/09/24.
79. Goorhuis A, Debast SB, van Leengoed LA, Harmanus C, Notermans DW, Bergwerff AA, et al. *Clostridium difficile* PCR ribotype 078: an emerging strain in humans and in pigs? *J Clin Microbiol.* 2008;46(3):1157; author reply 8. Epub 2008/03/11.
80. Hensgens MPM, Goorhuis A, Notermans D, Van Benthem BHB, Kuijper EJ. De epidemiologie van *Clostridium difficile* in Nederland in 2008-2009. *Nederlands Tijdschrift Geneeskunde.* 2010.
81. Bauer MP, Notermans D, Van Benthem BHB. *Clostridium difficile* infection in Europe: a hospital-based survey. *Lancet.* 2011;377:63-73.
82. Songer JG. Clostridia as agents of zoonotic disease. *Vet Microbiol.* 2010;140(3-4):399-404. Epub 2009/08/18.
83. Weese JS. *Clostridium difficile* in food--innocent bystander or serious threat? *Clin Microbiol Infect.* 2010;16(1):3-10. Epub 2009/12/17.
84. Keel K, Brazier JS, Post KW, Weese S, Songer JG. Prevalence of PCR ribotypes among *Clostridium difficile* isolates from pigs, calves, and other species. *J Clin Microbiol.* 2007;45(6):1963-4.
85. Weese JS, Wakeford T, Reid-Smith R, Rousseau J, Friendship R. Longitudinal investigation of *Clostridium difficile* shedding in piglets. *Anaerobe.* 2010;16(5):501-4. Epub 2010/08/17.
86. Debast SB, van Leengoed LA, Goorhuis A, Harmanus C, Kuijper EJ, Bergwerff AA. *Clostridium difficile* PCR ribotype 078 toxinotype V found in

- diarrhoeal pigs identical to isolates from affected humans. *Environ Microbiol.* 2009;11(2):505-11. Epub 2009/02/07.
87. Hopman NE, Keessen EC, Harmanus C, Sanders IM, van Leengoed LA, Kuijper EJ, et al. Acquisition of *Clostridium difficile* by piglets. *Vet Microbiol.* 2010. Epub 2010/11/30.
88. Hammitt MC, Bueschel DM, Keel MK, Glock RD, Cuneo P, DeYoung DW, et al. A possible role for *Clostridium difficile* in the etiology of calf enteritis. *Vet Microbiol.* 2008;127(3-4):343-52. Epub 2007/10/30.
89. de Boer E, Zwartkruis-Nahuis A, Heuvelink AE, Harmanus C, Kuijper EJ. Prevalence of *Clostridium difficile* in retailed meat in the Netherlands. *Int J Food Microbiol.* 2011;144(3):561-4. Epub 2010/12/07.
90. Metcalf DS, Costa MC, Dew WM, Weese JS. *Clostridium difficile* in vegetables, Canada. *Lett Appl Microbiol.* 2010;51(5):600-2. Epub 2010/11/12.
91. Rodriguez-Palacios A, Staempfli HR, Duffield T, Weese JS. *Clostridium difficile* in retail ground meat, Canada. *Emerg Infect Dis.* 2007;13(3):485-7. Epub 2007/06/08.
92. Weese JS, Reid-Smith RJ, Avery BP, Rousseau J. Detection and characterization of *Clostridium difficile* in retail chicken. *Lett Appl Microbiol.* 2010;50(4):362-5. Epub 2010/01/28.
93. Bakker D, Corver J, Harmanus C, Goorhuis A, Keessen EC, Fawley WN, et al. Relatedness of human and animal *Clostridium difficile* PCR ribotype 078 isolates determined on the basis of multilocus variable-number tandem-repeat analysis and tetracycline resistance. *J Clin Microbiol.* 2010;48(10):3744-9. Epub 2010/08/06.
94. Goorhuis A, Bakker D, Corver J, Debast SB, Harmanus C, Notermans DW, et al. Emergence of *Clostridium difficile* infection due to a new hypervirulent strain, polymerase chain reaction ribotype 078. *Clin Infect Dis.* 2008;47(9):1162-70.
95. Hensgens MP, Goorhuis A, van Kinschot CM, Crobach MJ, Harmanus C, Kuijper EJ. *Clostridium difficile* infection in an endemic setting in the Netherlands. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2011;30(4):587-93. Epub 2011/01/05.
96. Bauer MP, Veenendaal D, Verhoef L, Bloembergen P, van Dissel JT, Kuijper EJ. Clinical and microbiological characteristics of community-onset *Clostridium difficile* infection in The Netherlands. *Clin Microbiol Infect.* 2009;15(12):1087-92.
97. Wilcox MH, Mooney L, Bendall R, Settle CD, Fawley WN. A case-control study of community-associated *Clostridium difficile* infection. *J Antimicrob Chemother.* 2008;62(2):388-96.
98. Stubbs SL, Brazier JS, O'Neill GL, Duerden BI. PCR targeted to the 16S-23S rRNA gene intergenic spacer region of *Clostridium difficile* and construction of a library consisting of 116 different PCR ribotypes. *J Clin Microbiol.* 1999;37(2):461-3. Epub 1999/01/16.
99. Bidet P, Barbut F, Lalande V, Burghoffer B, Petit JC. Development of a new PCR-ribotyping method for *Clostridium difficile* based on ribosomal RNA gene sequencing. *FEMS Microbiol Lett.* 1999;175(2):261-6. Epub 1999/07/01.
100. Indra A, Huhulescu S, Schneeweis M, Hasenberger P, Kernbichler S, Fiedler A, et al. Characterization of *Clostridium difficile* isolates using capillary gel electrophoresis-based PCR ribotyping. *J Med Microbiol.* 2008;57(Pt 11):1377-82. Epub 2008/10/18.
101. van den Berg RJ, Schaap I, Templeton KE, Klaassen CH, Kuijper EJ. Typing and subtyping of *Clostridium difficile* isolates by using multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis. *J Clin Microbiol.* 2007;45(3):1024-8. Epub 2006/12/15.

102. Sprong H, Langelaar MFM, De Bruin A, Tjisse-Klasen E, Fonville M, Tjon Kon Fat E, et al. Detection of *Coxiella burnetii* in ticks after a large rural outbreak. 2012.
103. Krumbiegel ER, Wisniewski HJ. Consumption of Raw Milk by Human Volunteers. *Arch Environm Health*. 1970;21:63-5.
104. Cerf O, Condron R. *Coxiella burnetii* and milk pasteurization: an early application of the precautionary principle? *Epidemiol Infect*. 2006;134(5):946-51. Epub 2006/02/24.
105. Karagiannis I, Schimmer B, Van Lier A, Timen A, Schneeberger P, Van Rotterdam B, et al. Investigation of a Q fever outbreak in a rural area of The Netherlands. *Epidemiol Infect*. 2009;137(9):1283-94. Epub 2009/01/24.
106. Schimmer B, Ter Schegget R, Wegdam M, Zuchner L, de Bruin A, Schneeberger PM, et al. The use of a geographic information system to identify a dairy goat farm as the most likely source of an urban Q-fever outbreak. *BMC Infect Dis*. 2010;10:69. Epub 2010/03/17.
107. Kersh GJ, Wolfe TM, Fitzpatrick KA, Candee AJ, Oliver LD, Patterson NE, et al. Presence of *Coxiella burnetii* DNA in the environment of the United States, 2006 to 2008. *Appl Environ Microbiol*. 2010;76(13):4469-75. Epub 2010/05/18.
108. Loftis AD, Priestley RA, Massung RF. Detection of *Coxiella burnetii* in commercially available raw milk from the United States. *Foodborne Pathog Dis*. 2010;7(12):1453-6. Epub 2010/08/14.
109. Wever P. Detection of *Coxiella burnetii* DNA in veterinary samples and supermarket dairy products using routine hospital developed real-time PCR techniques. Arnhem, Papendal, 2010.
110. Arricau-Bouvery N, Hauck Y, Bejaoui A, Frangoulidis D, Bodier CC, Souriau A, et al. Molecular characterization of *Coxiella burnetii* isolates by infrequent restriction site-PCR and MLVA typing. *BMC Microbiol*. 2006;6:38. Epub 2006/04/28.
111. Klaassen CH, Nabuurs-Franssen MH, Tilburg JJ, Hamans MA, Horrevorts AM. Multigenotype Q fever outbreak, the Netherlands. *Emerg Infect Dis*. 2009;15(4):613-4. Epub 2009/04/01.
112. Svraka S, Toman R, Skultety L, Slaba K, Homan WL. Establishment of a genotyping scheme for *Coxiella burnetii*. *FEMS Microbiol Lett*. 2006;254(2):268-74. Epub 2006/02/01.
113. Glazunova O, Roux V, Freylikman O, Sekeyova Z, Fournous G, Tyczka J, et al. *Coxiella burnetii* genotyping. *Emerg Infect Dis*. 2005;11(8):1211-7. Epub 2005/08/17.
114. De Bruin A, Janse I, Van Rotterdam B. Molecular typing of *Coxiella burnetii* during Q fever source finding investigations in 2009. RIVM, 2010.
115. Tilburg JJ, Rossen JWA, van Hannen EJ, Melchers WJ, Hermans MHA, van de Bovenkamp J, et al. A Genotypic diversity of *Coxiella burnetii* in the 2007 - 2010 Q fever outbreaks episodes in the Netherlands. *JCM*.
116. De Bruin A, Janse I, de Groot A, Van Rotterdam B. Molecular Detection and typing of *Coxiella burnetii* II. RIVM, 2009 330291002.
117. Friesema I, Doorduyn Y, De Jager C, Van der Zwaluw K, Notermans D, van Heerwaarden C, et al. Intensieve surveillance van *Listeria monocytogenes* in Nederland. *Infectieziekten bulletin*. 2010.
118. Doorduyn Y, de Jager CM, van der Zwaluw WK, Friesema IH, Heuvelink AE, de Boer E, et al. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) O157 outbreak, The Netherlands, September-October 2005. *Euro Surveill*. 2006;11(7):182-5.
119. Friesema I, Sigmundsdottir G, van der Zwaluw K, Heuvelink A, Schimmer B, de Jager C, et al. An international outbreak of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 infection due to lettuce, September-October 2007. *Euro Surveill*. 2008;13(50).

120. Greenland K, de Jager C, Heuvelink A, van der Zwaluw K, Heck M, Notermans D, et al. Nationwide outbreak of STEC O157 infection in the Netherlands, December 2008-January 2009: continuous risk of consuming raw beef products. *Euro Surveill.* 2009;14(8).
121. Havelaar AH, Van Duynhoven YT, Nauta MJ, Bouwknecht M, Heuvelink AE, De Wit GA, et al. Disease burden in The Netherlands due to infections with Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157. *Epidemiol Infect.* 2004;132(3):467-84.
122. Friesema IHM, Jager de CM, Heuvelink AE, Zwaluw van der WK, Kuiling S, Zwartkruis JTM, et al. Intensieve surveillance van Shiga toxine producerende *Escherichia coli* in Nederland, 2009. *Infectieziekten bulletin.* 2011;22(1):8.
123. Pielaat A, Wijnands LM, Fitz-James I, van Leusden FM. Surveys analysis of microbial contamination of fresh produced and ready-to-eat-salads, and the associated risk to consumers in the Netherlands. Bilthoven: RIVM, 330371002.
124. Heuvelink AE, Zwartkruis JT, van Heerwaarden C, Arends B, Stortelder V, de Boer E. Pathogene bacteriën in wild en oppervlaktewater. *Tijdschr Diergeneeskd.* 2008;133(8):330-5. Epub 2008/05/29. Pathogene bacterien en parasieten in faeces van wilde dieren en in oppervlaktewater.
125. Heuvelink A, Rippling M, Van Duynhoven Y. *Escherichia coli* O157 en/of *Campylobacter* - Zo rauw hadden ze het niet gegeten, maar wel gedronken. *Infectieziekten bulletin.* 2005;16(8):286-8.
126. Heuvelink A, van der Oord G, Van Duynhoven Y. Soepballetjes brengen de zaak aan het rollen. *Infectieziekten bulletin.* 2004;15(2):45-6.
127. Heuvelink A, Van Heerwaarden C, van Oosterom R, Edink K, Van Duynhoven Y. Bezoek aan kinderboerderij de oorzaak van het hemolytisch-uremisch syndroom. *Infectieziekten bulletin.* 2000;11(12):275-7.
128. Heuvelink A, Arends JP, van Keulen MAJ, Van Duynhoven Y. *Escherichia coli* O157 infectie na contact met melkvee. *Infectieziekten bulletin.* 2002;13(2):49-52.
129. Keys C, Kemper S, Keim P. Highly diverse variable number tandem repeat loci in the *E. coli* O157:H7 and O55:H7 genomes for high-resolution molecular typing. *J Appl Microbiol.* 2005;98(4):928-40.
130. Lindstedt BA, Brandal LT, Aas L, Vardund T, Kapperud G. Study of polymorphic variable-number of tandem repeats loci in the ECOR collection and in a set of pathogenic *Escherichia coli* and *Shigella* isolates for use in a genotyping assay. *J Microbiol Methods.* 2007;69(1):197-205.
131. Whitworth J, Zhang Y, Bono J, Pleydell E, French N, Besser T. Diverse genetic markers concordantly identify bovine origin *Escherichia coli* O157 genotypes underrepresented in human disease. *Appl Environ Microbiol.* 2010;76(1):361-5. Epub 2009/11/03.
132. Mylonakis E, Paliou M, Hohmann EL, Calderwood SB, Wing EJ. Listeriosis during pregnancy: a case series and review of 222 cases. *Medicine (Baltimore).* 2002;81(4):260-9.
133. Doorduyn Y, de Jager CM, van der Zwaluw WK, Wannet WJ, van der Ende A, Spanjaard L, et al. Invasive *Listeria monocytogenes* infections in the Netherlands, 1995-2003. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2006;25(7):433-42.
134. Denny J, McLauchlin J. Human *Listeria monocytogenes* infections in Europe--an opportunity for improved European surveillance. *Euro Surveill.* 2008;13(13).
135. Adak GK, Long SM, O'Brien SJ. Trends in indigenous foodborne disease and deaths, England and Wales: 1992 to 2000. *Gut.* 2002;51(6):832-41.
136. Mead PS, Slutsker L, Dietz V, McCaig LF, Bresee JS, Shapiro C, et al. Food-related illness and death in the United States. *Emerg Infect Dis.* 1999;5(5):607-25.

137. Brett MS, Short P, McLauchlin J. A small outbreak of listeriosis associated with smoked mussels. *Int J Food Microbiol.* 1998;43(3):223-9.
138. Jacquet C, Catimel B, Brosch R, Buchrieser C, Dehaumont P, Goulet V, et al. Investigations related to the epidemic strain involved in the French listeriosis outbreak in 1992. *Appl Environ Microbiol.* 1995;61(6):2242-6.
139. Doorduyn Y, De Jager C, Van der Zwaluw K. Intensieve surveillance van *Listeria monocytogenes* om Nederland. *Infectieziekten bulletin.* 2008;19:305-10.
140. Chatterjee SS, Otten S, Hain T, Lingnau A, Carl UD, Wehland J, et al. Invasiveness is a variable and heterogeneous phenotype in *Listeria monocytogenes* serotype strains. *Int J Med Microbiol.* 2006;296(4-5):277-86.
141. Jore S, Viljugrein H, Brun E, Heier BT, Borck B, Ethelberg S, et al. Trends in *Campylobacter* incidence in broilers and humans in six European countries, 1997-2007. *Prev Vet Med.* 2009;93(1):33-41.
142. Little CL, Pires SM, Gillespie IA, Grant K, Nichols GL. Attribution of human *Listeria monocytogenes* infections in England and Wales to ready-to-eat food sources placed on the market: adaptation of the Hald Salmonella source attribution model. *Foodborne Pathog Dis.* 2010;7(7):749-56. Epub 2010/02/17.
143. Doorduyn Y, De Boer E, Van Pelt W. Registratie voedselinfecties en -vergiftigingen bij de Inspectie voor de Gezondheidszorg en de Voedsel en Waren autoriteit, 2008. RIVM, 2009 330261002/2009.
144. Doorduyn Y, De Boer E, Van Pelt W, Friesema I. Uitbraken van voedselinfecties in 2008. *Infectieziekten bulletin.* 2010;1.
145. van Duynhoven YT, de Jager CM, Kortbeek LM, Vennema H, Koopmans MP, van Leusden F, et al. A one-year intensified study of outbreaks of gastroenteritis in The Netherlands. *Epidemiol Infect.* 2005;133(1):9-21.
146. Van Pelt W, Mevius DJ, Stoelhorst HG, Kovats RS, van der Giessen AW, Wannet WJ, et al. An Explosion of *Salmonella* infections in 2003 in the Netherlands: hot summer or side effect of the avian influenza outbreak? *Eurosurveillance.* 2004(9):3-4.
147. Bertrand S, Rimhanen-Finne R, Weill FX, Rabsch W, Thornton L, Perevoscikovs J, et al. *Salmonella* infections associated with reptiles: the current situation in Europe. *Euro Surveill.* 2008;13(24).
148. van Duynhoven YT, Isken LD, Borgen K, Besselse M, Soethoudt K, Haitsma O, et al. A prolonged outbreak of *Salmonella* Typhimurium infection related to an uncommon vehicle: hard cheese made from raw milk. *Epidemiol Infect.* 2009;137(11):1548-57.
149. Van Duynhoven YT, Widdowson MA, De Jager C, Fernandes T, Neppelenbroek S, Van den Brandhof W, et al. *Salmonella* Enteritidis phage type 4b outbreak associated with bean sprouts. *Emerg Infect Dis.* 2002(8):439-42.
150. Kivi M, Hofhuis A, Notermans DW, Wannet WJ, Heck ME, Van De Giessen AW, et al. A beef-associated outbreak of *Salmonella* Typhimurium DT104 in The Netherlands with implications for national and international policy. *Epidemiol Infect.* 2007;135(6):890-9.
151. Noel H, Hofhuis A, De Jonge R, Heuvelink AE, De Jong A, Heck ME, et al. Consumption of fresh fruit juice: how a healthy food practice caused a national outbreak of *Salmonella* Panama gastroenteritis. *Foodborne Pathog Dis.* 2010;7(4):375-81. Epub 2009/11/17.
152. Huehn S, Helmuth R, Bunge C, Guerra B, Junker E, Davies RH, et al. Characterization of pathogenic and resistant genome repertoire reveals two clonal lines in *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Paratyphi B (+)-tartrate positive. *Foodborne Pathog Dis.* 2009;6(4):431-43.
153. Denny J, Threlfall J, Takkinen J, Lofdahl S, Westrell T, Varela C, et al. Multinational *Salmonella* Paratyphi B variant Java (*Salmonella* Java) outbreak, August - December 2007. *Euro Surveill.* 2007;12(12):E071220 2.

154. Doorduyn Y, Hofhuis A, de Jager C, van der Zwaluw W, Notermans D, van Pelt W. Salmonella Typhimurium outbreaks in the Netherlands in 2008. *Euro Surveill.* 2008;13(44):pii: 19026.
155. Pezzoli L, Elson R, Little C, Fisher I, Yip H, Peters T, et al. International outbreak of Salmonella Senftenberg in 2007. *Euro Surveill.* 2007;12(6):E0706143.
156. Doorduyn Y, Van Den Brandhof WE, Van Duynhoven YT, Wannet WJ, Van Pelt W. Risk factors for Salmonella Enteritidis and Typhimurium (DT104 and non-DT104) infections in The Netherlands: predominant roles for raw eggs in Enteritidis and sandboxes in Typhimurium infections. *Epidemiol Infect.* 2006;134(3):617-26.
157. Doorduyn Y, Van Pelt W, Siezen CL, Van Der Horst F, Van Duynhoven YT, Hoebee B, et al. Novel insight in the association between salmonellosis or campylobacteriosis and chronic illness, and the role of host genetics in susceptibility to these diseases. *Epidemiol Infect.* 2008;136(9):1225-34.
158. Pires SM, Evers EG, Van Pelt W, Ayers T, Scallan E, Angulo FJ, et al. Attributing the Humane Disease Burden of Foodborne Infections to Specific Sources. *Foodborne Pathogens and Disease.* 2009.
159. Van Pelt W, Van der Giessen AW, van Leeuwen JW, Wannet WJ, Henken AM, Evers EG, et al. Oorsprong, omvang en kosten van humane salmonellose. Deel 1. Oorsprong van humane salmonellose met betrekking tot varken, rund, kip, ei en overige bronnen. *Infectieziekten bulletin.* 1999;10:240-3.
160. Hulth A, Andrews N, Ethelberg S, Dreesman J, Faensen D, van Pelt W, et al. Practical usage of computer-supported outbreak detection in five European countries. *Euro Surveill.* 2010;15(36). Epub 2010/09/17.
161. Widdowson MA, Bosman A, van Straten E, Tinga M, Chaves S, van Eerden L, et al. Automated, laboratory-based system using the Internet for disease outbreak detection, the Netherlands. *Emerg Infect Dis.* 2003;9(9):1046-52. Epub 2003/10/02.
162. Smid JH, Swart AN, Havelaar AH, Pielaat A. A practical framework for the construction of a biotracing model: application to Salmonella in the pork slaughter chain. *Risk Anal.* 2011;31(9):1434-50. Epub 2011/03/23.
163. Wagenaar J, van de Giessen AW. Veegerelateerde MRSA: epidemiologie in dierlijke productieketens, transmissie naar de mens en karakterisatie van de kloon. Bilthoven: RIVM, 2009 330224001.
164. Bowles J, van Knapen F, McManus D. Cattle strain of Echinococcus granulosus and human infection. *Lancet.* 1992;339(8805):1358.
165. Eckert J, Conraths FJ, Tackmann K. Echinococcosis: an emerging or re-emerging zoonosis? *Int J Parasitol.* 2000;30(12-13):1283-94.
166. Kortbeek LM, Jager J, van Zwet A, van der Giessen J, editors. Echinococcosis in the Netherlands. NVVM symposium; 2005.
167. Herremans T, Verweij JJ, Schipper HG, Casparie M, van Lieshout L, Pinelli E, et al. [Decline of echinococcosis in the Netherlands; 1997-2008]. *Ned Tijdschr Geneesk.* 2010;154(18):A2297. Epub 2010/01/01. Afname van echinokokkose in Nederland; 1997-2008.
168. Aalten M, Züchner L, Bruinier E, Holzhauer M, Wouda W, Borgsteede F, et al. Reintroduction of echinococcosis in the Netherlands via import of cattle. *Tijdschrift voor Diergeneeskunde.* 2008;133:898-902.
169. Detry O, Honore C, Delwaide J, Demonty J, De Roover A, Vivario M, et al. Endemic alveolar echinococcosis in Southern Belgium? *Acta Gastroenterol Belg.* 2005;68(1):1-4.
170. Eckert J, Deplazes P. Biological, epidemiological, and clinical aspects of echinococcosis, a zoonosis of increasing concern. *Clin Microbiol Rev.* 2004;17(1):107-35.

171. van der Giessen JW, Rombout Y, Teunis P. Base line prevalence and spatial distribution of *Echinococcus multilocularis* in a newly recognized endemic area in the Netherlands. *Vet Parasitol.* 2004;119(1):27-35.
172. Schets FM, Engels GB, Leenen EJTM. *Cryptosporidium* en *Giardia* in Nederlandse zwembaden. RIVM, 2003 250931 001.
173. Schets FM, van Wijnen JH, Schijven JF, Schoon H, de Roda Husman AM. Monitoring of waterborne pathogens in surface waters in Amsterdam, the Netherlands, and the potential health risk associated with exposure to *Cryptosporidium* and *Giardia* in these waters. *Appl Environ Microbiol.* 2008;74(7):2069-78. Epub 2008/02/19.
174. Schets FM, Engels GB. *Cryptosporidium* en *Giardia* in Nederlandse zwembaden. *Infectieziekten bulletin.* 2003;14:211-6.
175. Schets FM, Engels GB, During M, de Roda Husman AM. Detection of infectious *Cryptosporidium* oocysts by cell culture: applicability to environmental samples. RIVM, 2004.
176. Schets FM, Engels GB, Evers EG. *Cryptosporidium* and *Giardia* in swimming pools in the Netherlands. *J Water Health.* 2004;2(3):191-200.
177. Schets FM, Medema GJ, Schijven JF. Het rendement van de detectiemethode voor *Cryptosporidium* en *Giardia* in water. RIVM, 2004 330000 008.
178. Schets FM, van Lierop GS. Eerste uitbraak van cryptosporidiose via zwembaden in Nederland? *Infectieziekten bulletin.* 2004;15:94-5.
179. Schets FM, van den Berg HH, Engels GB, Lodder WJ, de Roda Husman AM. *Cryptosporidium* and *Giardia* in commercial and non-commercial oysters (*Crassostrea gigas*) and water from the Oosterschelde, The Netherlands. *Int J Food Microbiol.* 2007;113(2):189-94. Epub 2006/09/16.
180. Sprong H, Caccio SM, van der Giessen JW. Identification of zoonotic genotypes of *Giardia duodenalis*. *PLoS Negl Trop Dis.* 2009;3(12):e558.
181. van der Giessen JW, de Vries A, Roos M, Wielinga P, Kortbeek LM, Mank TG. Genotyping of *Giardia* in Dutch patients and animals: a phylogenetic analysis of human and animal isolates. *Int J Parasitol.* 2006;36(7):849-58.
182. Wielinga P, De Vries A, van der Goot TH, Mank TG, Mars MH, Kortbeek LM, et al. Molecular epidemiology of *Cryptosporidium* in humans and cattle in the Netherlands. *Int Journal Parasitol.* 2008;38 (7):809-17.
183. Opsteegh L, Reinders-Messelink HA, Schollier D, Groothoff JW, Postema K, Dijkstra PU, et al. Determinants of return to work in patients with hand disorders and hand injuries. *J Occup Rehabil.* 2009;19(3):245-55. Epub 2009/05/14.
184. Pozio E. Trichinellosis in the European union: epidemiology, ecology and economic impact. *Parasitol Today.* 1998;14(1):35-8.
185. van der Giessen JW, Rombout Y, Franchimont HJ, La Rosa G, Pozio E. *Trichinella britovi* in foxes in The Netherlands. *J Parasitol.* 1998;84(5):1065-8.
186. Van der Giessen AW, Fonville M, De Vries A, Briels I, van Eckerveld M, Teunis P. First isolation of *T.pseudospirali* in wild boar in the Netherlands. XI ICT symposium; San Diego2004.
187. van der Giessen JW, Rombout Y, van der Veen A, Pozio E. Diagnosis and epidemiology of *Trichinella* infections in wildlife in The Netherlands. *Parasite.* 2001;8(2 Suppl):S103-5.
188. Rombout YB, Bosch S, Van Der Giessen JW. Detection and identification of eight *Trichinella* genotypes by reverse line blot hybridization. *J Clin Microbiol.* 2001;39(2):642-6. Epub 2001/02/07.
189. Verhoef LPB. Identifying international foodborne norovirus outbreak events. Rotterdam: Erasmus MC; 2011.



190. Kroneman A, Vennema H, Deforche K, v d Avoort H, Penaranda S, Oberste MS, et al. An automated genotyping tool for enteroviruses and noroviruses. *J Clin Virol.* 2011;51(2):121-5. Epub 2011/04/26.
191. Ribot EM, Fitzgerald C, Kubota K, Swaminathan B, Barrett TJ. Related Articles, Links Rapid pulsed-field gel electrophoresis protocol for subtyping of *Campylobacter jejuni*. *Clin Microbiol.* 2001;39 (5):1889-94.
192. Dingle KE, Colles FM, Wareing DR, Ure R, Fox AJ, Bolton FE, et al. Multilocus sequence typing system for *Campylobacter jejuni*. *J Clin Microbiol.* 2001;39(1):14-23.
193. Djordjevic SP, Unicomb LE, Adamson PJ, Mickan L, Rios R. Clonal complexes of *Campylobacter jejuni* identified by multilocus sequence typing are reliably predicted by restriction fragment length polymorphism analyses of the *flaA* gene. *J Clin Microbiol.* 2007;45(1):102-8.
194. Pta A, Fontana J, Crowe C, Bolstorff B, Stout A, van Duyn S, et al. The National Antimicrobial Resistance Monitoring System Pulse Networking Group. Related Articles, Links emergence of multidrugresistant *Salmonella enterica* serotype Newport infections resistant to expanded-spectrum cephalosporins in the United States. *Infect Dis.* 2003(188 (11)):1707-16.
195. Peters TM, Maguire C, Threlfall EJ, Fisher IS, Gill N, Gatto AJ. The Salm-gene project - a European collaboration for DNA fingerprinting for. *Euro Surveill.* 2003;8(2):46-50.
196. Lindstedt BA, Torpdahl M, Nielsen EM, Vardund T, Aas L, Kapperud G. Harmonization of the multiple-locus variable-number tandem repeat analysis method between Denmark and Norway for typing *Salmonella Typhimurium* isolates and closer examination of the VNTR loci. *J Appl Microbiol.* 2007;102(3):728-35.
197. Beranek A, Mikula C, Rabold P, Arnhold D, Berghold C, Lederer I, et al. Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis for subtyping of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Enteritidis*. *Int J Med Microbiol.* 2009;299(1):43-51.
198. Malorny B, Junker E, Helmuth R. Multi-locus variable-number tandem repeat analysis for outbreak studies of *Salmonella enterica* serotype *Enteritidis*. *BMC Microbiol.* 2008;8:84.
199. Boxrud D, Pederson-Gulrud K, Wotton J, Medus C, Lyszkowicz E, Besser J, et al. Comparison of multiple-locus variable-number tandem repeat analysis, pulsed-field gel electrophoresis, and phage typing for subtype analysis of *Salmonella enterica* serotype *Enteritidis*. *J Clin Microbiol.* 2007;45(2):536-43.
200. Lan R, Reeves PR, Octavia S. Population structure, origins and evolution of major *Salmonella enterica* clones. *Infect Genet Evol.* 2009;9(5):996-1005.
201. Kidgell C, Reichard U, Wain J, Linz B, Torpdahl M, Dougan G, et al. *Salmonella typhi*, the causative agent of typhoid fever, is approximately 50,000 years old. *Infect Genet Evol.* 2002;2(1):39-45.
202. Tankouo-Sandjong B, Sessitsch A, Liebana E, Kornschöber C, Allerberger F, Hächler H, et al. MLST-v, multilocus sequence typing based on virulence genes, for molecular typing of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovars. *Journal of Microbiological Methods.* 2007(69 (1)):23-36.
203. Martin P, Jacquet C, Goulet V, Vaillant V, De Valk H. Pulsed-field gel electrophoresis of *Listeria monocytogenes* strains: the PulseNet Europe Feasibility Study. *Foodborne Pathog Dis.* 2006;3(3):303-8.
204. Lukinmaa S, Aarnisalo K, Suihko ML, Siitonen A. Diversity of *Listeria monocytogenes* isolates of human and food origin studied by serotyping, automated ribotyping and pulsed-field gel electrophoresis. *Clin Microbiol Infect.* 2004;10(6):562-8.
205. Lindstedt BA, Tham W, Danielsson-Tham ML, Vardund T, Helmersson S, Kapperud G. Multiple-locus variable-number tandem-repeats analysis of *Listeria*

- monocytogenes using multicolour capillary electrophoresis and comparison with pulsed-field gel electrophoresis typing. *J Microbiol Methods*. 2008;72(2):141-8.
206. Salcedo C, Arreaza L, Alcalá B, de la Fuente L, Vazquez JA. Development of a multilocus sequence typing method for analysis of *Listeria monocytogenes* clones. *J Clin Microbiol*. 2003;41(2):757-62.
207. Gerner-Smidt P, Scheutz F. Standardized pulsed-field gel electrophoresis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: the PulseNet Europe Feasibility Study. *Foodborne Pathog Dis*. 2006;3(1):74-80.
208. Stine OC, Morris JG, Jr., Boxrud D, Harrison LH. Multilocus sequence typing reveals a lack of diversity among *Escherichia coli* O157:H7 isolates that are distinct by pulsed-field gel electrophoresis. *Clin Microbiol*. 2003;41:675-9.
209. Hyytiä-Trees E, Smole SC, Fields PA, Swaminathan B, Ribot EM. Second generation subtyping: a proposed PulseNet protocol for multiple-locus variable-number tandem repeat analysis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 (STEC O157). *Foodborne Pathog Dis*. 2006;3(1):118-31.
210. Noller AC, McEllistrem MC, Stine OC, Morris JG, Jr., Boxrud DJ, Dixon B, et al. Multilocus sequence typing reveals a lack of diversity among *Escherichia coli* O157:H7 isolates that are distinct by pulsed-field gel electrophoresis. *J Clin Microbiol*. 2003;41(2):675-9.

Dit is een uitgave van:

**Rijksinstituut voor Volksgezondheid  
en Milieu**

Postbus 1 | 3720 BA Bilthoven  
[www.rivm.nl](http://www.rivm.nl)