

Shiga-Toxin *Escherichia coli* (STEC) in Goudse boerenkaas: hoe risico's te voorkómen (versie 2; maart 2024)

Auteurs: Dr. Vet. Catharina Berge¹ en Prof. Dr. em. Ton Baars²

¹ Berge Veterinary Consulting BV, Vollezele (BE)

² Gepensioneerd, zelfstandig onderzoeker en rauwe melk adviseur

Correspondentie: t.baars@fingerprint.nl

Website: www.milkandhealth.com

Inhoudsopgave

SAMENVATTING	2
STEC HOUDT ONS BEZIG	2
STEC OPSPOREN	2
STEC VERMIJDEN IN KAASMELK EN BOERENKAAS	3
1. INLEIDING	5
DOEL BROCHURE	6
2. ESCHERICHIA COLI, STEC, EHEC, WAT IS DAT?	6
<i>E. COLI</i> IS VEELZIJDIG EN BEWEGELIJK	6
<i>E. COLI</i> METEN	7
STEC-SEROTYPEN GERELATEERD AAN ZIEKTE	8
GENEN ALS GRONDSLAG VOOR ZIEKTE	8
WHOLE GENOME SEQUENCING BIEDT INZICHT IN HET GEHELE GENOOM	10
3. BEHEERSING VAN <i>E. COLI</i> EN STEC OP DE BOERDERIJ	10
HYGIËNE: VERMIJD VERSPREIDING, (HER)BESMETTING EN VERSMERING	11
REDUCEER STRESS ONDER VEE	12
CONTROLE VAN STEC IN KAASMELK EN RIJPING	12
OPSPOREN VAN STEC OP EEN BEDRIJF	15
STEC-INCIDENTIE IN GOUDSE BOERENKAAS IN NEDERLAND	16
4. RISICO-ANALYSE	17
ER IS GEEN 'NUL-RISICO', WEL RISICO-REDUCTIE	17
MICROBIËLE RISICOBEOORDELING (MRA)	18
STUREN OP ENTEROBACTERIACEAE EN <i>E. COLI</i> IN KAASMELK	20
HANDHAVING DUITSE VORZUGSMILCH – HOE DUITSLAND DECENNIALANG RAUWE MELK DRINKT	21
5. CONCLUSIES EN AANBEVELINGEN	23
6. BIJLAGEN	24
7. LITERATUUR	35
8. EINDNOTEN	39

Samenvatting

STEC houdt ons bezig

STEC (Shiga-Toxine producerende *Escherichia coli*) zijn ziekteverwekkers, pathogene stammen van *E. coli*, die in bepaalde groepen mensen (vooral kinderen en oudere mensen) tot ernstige ziektes of zelfs de dood kunnen leiden. De meeste *E. coli*-stammen zijn overigens ongevaarlijk en vervullen tal van functies in de darm, maar ook later in de kaas (smaak).

Sinds de jaren 1980 is STEC als zoonose onder de aandacht gekomen en sinds het laatste decennium neemt de overheid steeds meer maatregelen om STEC-besmetting via de voedselketen aan te pakken. Als eerste via detectie van rundvlees en melkproducten, de laatste jaren meer via voorverpakte salades, die besmet zijn geraakt.

Telkens weer duiken er internationaal berichten op over STEC door consumptie van rauwmelkse kaas. Daarbij brengen de verse (schimmel)kazen (Camembert) meer risico mee dan de halfharde kazen, zoals de Goudse boerenkaas of de bergkaas. Over het algemeen is de consumptie van rauwmelkse Goudse kaas veilig, wat niet betekent dat er geen STEC gevonden wordt.

STEC opsporen

E. coli is een gewoon, maar belangrijk onderdeel van de darmflora van mens en dier. STEC in herkauwers zijn niet ziekmakend voor de dieren zelf, echter er is een zeer kleine dosis STEC nodig om gevoelige consumenten ziek te maken. STEC in rauwe melk en boerenkaas kan een probleem zijn voor de volksgezondheid en voedselveiligheid. Zowel kaasmakers, handel en de overheid zijn erbij gebaat om het STEC-risico te verkleinen. De controle-instantie (COKZ/ NVWA) accepteert geen STEC in levensmiddelen. Vanwege haar rol rondom voedselveiligheid is de overheid gebaat bij gevoelige testmethodes om STEC te kunnen identificeren. Vanuit economisch oogpunt zijn kaasmakers erbij gebaat om zekerheid te hebben, dat een gevonden STEC ook daadwerkelijk bewezen een gevaar oplevert voor de volksgezondheid. De belangen tussen overheid en producent kunnen elkaar soms bijten.

In de meeste gevallen is bij routinematige controle een STEC-vondst op een bedrijf incidenteel, éénmalig. Echte problemen komen eerder zelden voor, wanneer STEC in vervolgonderzoek in meerdere dag-partijen kaas, afkomstig van hetzelfde bedrijf wordt aangetroffen.

STEC-stammen/ typen worden gekarakteriseerd door de aanwezigheid van bepaalde genetische eigenschappen die coderen voor toxische kenmerken (stx-genen) en/ of het vermogen van de bacterie om binnen te dringen in de slijmhuide van de darm (eae gen). STEC wordt verder beschreven door de indeling in (serotypische) groepen, die gebaseerd zijn op de buitenkant van de bacterie (bijv. O157:H7 of O26).

Via de zogenaamde real-time PCR-test zoekt het laboratorium naar bepaalde delen van het STEC-DNA, zogenaamde *markers*. Men richt zich daarbij vooral op de mogelijke productie van shigatoxine (stx₁ of stx₂) en genen verantwoordelijk voor het aanhechten in de darm (zoals eae). De PCR volgens ISO-norm 13136:2012 wordt in heel Europa gebruikt in het onderzoek naar STEC. Een trefzekere STEC-vondst wordt altijd voorafgegaan door het kweken van levende *E. coli*, gevolgd door uiteindelijk een PCR-

test. De ISO-norm is een kwalitatieve methode en beantwoordt alleen de vraag of STEC aan- of afwezig is, meestal in 25 g melk of kaas.

STEC kan onregelmatig over een kaas verdeeld zijn. Om de STEC-pakkans te vergroten is het van belang dat het monster voldoende groot is (nu circa 25 g), en/ of dat men meerdere, vaak vijf monsters parallel onderzoekt en/ of meerdere genetische kenmerken van potentiële STEC tegelijkertijd bepaalt. De Nederlandse overheid hanteert twee soorten uitslag: STEC-verdacht en STEC-positief. De eerste betekent, dat de PCR-test de *stx*-genen heeft aangetroffen, de tweede betekent, dat de bacteriën ook te kweken zijn op een plaat (levend zijn).

Goede methoden om STEC-stammen op te sporen zijn nog duur en kosten meer tijd. De meest betrouwbare methode om STEC-stammen op te sporen is door het vaststellen van het genoom als geheel ('whole genome sequencing' of 'long read metagenomics'), het bacterie-DNA. Daardoor kan men aantonen, dat een combinatie van (ongewenste) genetische kenmerken van één en dezelfde bacterie afkomstig zijn. Door de hoge kosten wordt deze methode niet gebruikt in de normale routine opsporing van STEC.

STEC vermijden in kaasmelk en boerenkaas

Een STEC-bacteriestam is als *E. coli* onderdeel van de familie van de Enterobacteriaceae.

Aangezien het bij een *E. coli* besmetting veelal om fecale verontreiniging gaat in melk en kaas, werd vanuit het verleden de groep van de Enterobacteriaceae en ook de coliforme bacteriën als maatstaf genomen voor de bedrijfshygiëne, het besmettingsniveau of een na-besmetting.

E. coli houdt zich op in het darmkanaal van koe, schaap en geit. Verontreiniging met mest van zowel het uier als de spenen, maar ook het melkgereedschap en de stal zijn bronnen voor *E. coli*-verontreiniging in de kaasmelk. De 'strijd tegen STEC' is geen andere dan de strijd tegen een verhoogde *E. coli*-besmetting van de melk, die zichtbaar is als vroeg-los in kaas. Vermijden van STEC betekent vermijden van *E. coli* in de kaasmelk.

Om te weten, waar je als kaasmaker staat, is het aan te raden regelmatig (bijv. 2x per week) tests door te voeren met telplaten (petrifilms) voor *E. coli* in kaasmelk. Met deze tests weet je binnen 18-24 uur met welke *E. coli*-hoeveelheden je in je kaasmelk te maken hebt. Zorg, dat je zelf stuurt en bijstuurt en reageer niet pas als de NVWA zich meldt. Wanneer de testwaarden voor *E. coli* in kaasmelk continu zeer laag zijn (<10 bacteriën/ml), dan neemt het risico op STEC in boerenkaas sterk af.

Om de *E. coli*-besmetting van de melk tijdens het melken zo klein mogelijk te maken, is een goede voorbehandeling noodzakelijk, de reiniging van spenen en speenpunten, evenals een glad, geschoren uier, het dragen van handschoenen, schone kleding en gereinigde melkschorten en de juiste volgorde tijdens het voorbereiden van het melken zelf (eerst het melkfilter aanbrengen, dan de melkput op orde brengen, daarna pas de koeien ophalen). Dit kost extra tijd en vraagt aandacht van de melker. Geschoold, gemotiveerd en getraind melkpersoneel is een voorwaarde.

STEC en *E. coli* kunnen zich ook settelen in biofilms op de oppervlaktes van de melkapparatuur (roestvrijstaal en rubbers). Daarom is een goede en constante reinigingsprocedure, gevolgd door desinfectie van alle delen van de melkapparatuur noodzakelijk. Aangezien *E. coli* niet tegen pasteurisatie kan, is een hittereiniging van melkapparatuur, kaastobbe en gereedschap zinvol in combinatie met het afwisselend

gebruik van alkalische en zure reiniging. Controleer echter dagelijks of wekelijks of de automatische systemen ook werkelijk functioneren (HACCP-plan).

Mastitis-melk kan niet gebruikt worden als kaasmelk. Het voorstrippen van elk kwartier en wegmelken van de eerste stralen is essentieel.

STEC en *E. coli* kunnen ook uit andere bronnen afkomstig zijn zoals vervuild bronwater en verontreinigd oppervlakte- en slootwater, maar ook via insecten of vogels. 1x jaarlijkse controle van de bacteriologische kwaliteit van het drinkwater en het water gebruikt in de kaasmakerij is noodzakelijk.

Overall, gebruik alleen zeer hygiënisch gewonnen melk voor de productie van Goudse boerenkaas; zorg voor een intern controlesysteem, dat daadwerkelijk vervolgd en gehandhaafd wordt. Hierdoor zal het STEC-risico in kaas sterk verminderd zijn.

1. Inleiding

De consumptie van kaas, rauwmelkse kaas en vooral de harde kaas is over het algemeen zeer veilig. In Europa wordt jaarlijks ongeveer 700.000 ton rauwmelkse kaas geproduceerd, met name in Frankrijk, Italië en Zwitserland. Dit betreft bijna 10% van de totale productie van kaas. Het aantal ziekte-uitbraken in Europa door consumptie van rauwmelkse kaas is waarschijnlijk gering (Choi et al., 2016), echter niet alle ziektegevallen en uitbraken zijn terug te voeren tot een eenduidige voedselbron.

Toch zet elke uitbraak de sector onder druk. Vooral dan, als een grootafnemer als Albert Heijn besluit om vanwege de onzekerheid en het gedoe, alle rauwmelkse boerenkaas uit de schappen te weren. Niet alleen in Nederland is STEC in zuivelproducten een aandachtspunt van de landelijke overheden. Sinds enkele jaren neemt het COKZ regelmatig monsters van rauwmelks geproduceerde kazen om in te schatten, hoe groot het probleem is in Nederland. Recentelijk heeft het RIVM een uitvoerige publicatie geschreven over STEC in melk en kaas gemaakt van geiten- en schapenmelk (Van Hoek et al., 2023). Om de consumenten te beschermen kondigt de overheid nieuwe maatregelen ter bevordering van de voedselveiligheid af, en is op zoek naar mogelijkheden om het STEC-probleem in te dammen. Om het STEC-thema in al zijn complexiteit dichterbij te halen, wordt in box 1 een recente uitbraak beschreven, waarin STEC in Franse rauwmelkse kaas een rol speelt. Uit het voorbeeld wordt duidelijk welke gevoeligheden en maatregelen er allemaal spelen rondom het STEC-thema.

Box 1. Maatschappelijke gevoeligheden rondom STEC

De STEC uitbraak was in 2019, en 20 Franse kinderen waren betroffen (Bizot et al., 2021). Met behulp van DNA-analyse werd vrij snel duidelijk, dat de infectie was terug te voeren tot één enkel bedrijf, die twee soorten rauwmelkse kaas produceerde. Wat onverwacht was, is de nieuwe *E. coli* variant, namelijk O26:H11 in plaats van O157:H7. Deze nieuwe STEC heeft echter vergelijkbare virulentie factoren¹ (stx_{2a}, eae_β), die bovendien samen een heftiger uitwerking hebben als bij de O157 bacterie (Bizot et al., 2021). Er konden 20 patiënten met STEC/ HUS¹ geïdentificeerd worden. Het betreft jonge kinderen in de leeftijd van 8 tot 24 maanden, 75% met diarree, 30% met bloederige diarree; 70% met nierproblemen, 50% met neurologische problemen en 20% met hartproblemen. Geen van hen is overleden en de meeste zijn na ziekenhuisopname hersteld (Minary et al., 2022).

In de discussie geven de onderzoekers aan, dat er een verschuiving heeft plaatsgevonden binnen de STEC-serotypen. De vondst van STEC O157 in levensmiddelen neemt af, terwijl de O26 en O80 toenemen bij vastgestelde HUS-gevallen (Bruyand et al., 2019). Inmiddels zijn de belangrijkste STEC-serotypen in Frankrijk O157:H7, O26:H11 en O80:H2. In Frankrijk is de aanbeveling door de overheid voor een betere labelling van onder meer rauwmelkse producten, waarbij een leeftijdsgrens van >5 jaar wordt gehanteerd (als risico-leeftijdsgrens).

Verder blijkt, dat ondanks toenemende preventieve maatregelen in de vlees- en melkverwerkende sector er een toename van HUS-gevallen is door STEC (50% meer van 2009 tot 2019). Dat baart elke overheid zorgen. De jonge leeftijd van HUS patiënten is in meerdere landen vastgesteld (zie ook fig. 6).

Realiseer je, dat STEC in levensmiddelen een belangrijk thema is, en dat doorgaans uitbraken, hoe klein ook, breed worden uitgemeten (Bijlage 1). STEC is met angst verbonden. Opgemerkt moet worden, dat er pas de laatste jaren een toename is van het aantal steekproeven in kaas en het intensievere gebruik van PCR-tests. Alleen hierdoor al neemt het aantal positieve uitslagen toe. Het gevaar daarentegen kan alleen afnemen, als kaasmakers weten waarover de zorg bestaat. Kennis over *E. coli* en goede bedrijfshygiëne zijn sleutels tot de STEC-oplossing.

Doel brochure

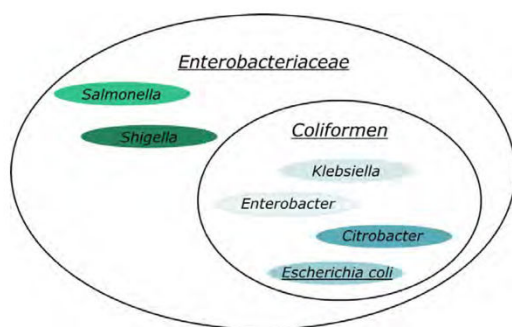
In opdracht van de BBZ is deze voorlichtingsbrochure geschreven rondom risico van en door STEC in rauwmelkse Goudse boerenkaas¹. Achtergrond is het beschermen van de boerenkaas enerzijds en het verzorgen van informatie en voorlichting naar de leden anderzijds. De sector als geheel, zowel de boerenkaasbereiders als diegene die kaas op de boerderij maken uit gepasteuriseerde melk zijn erbij gebaat, dat de kans op een kaas-schandaal, zo klein mogelijk is. Daartoe is kennis nodig en informatie rondom STEC.

De opzet van deze brochure is, dat het thema verhelderend, verklarend is op een manier, die de veehouders/ kaasmakers begrijpen.

Er wordt gebruik gemaakt van voetnoten in de vorm van eindnoten, die bepaalde begrippen verklaren en van verdiepende achtergrondteksten, die in de bijlagen zijn opgenomen.

2. *Escherichia coli*, STEC, EHEC, wat is dat?

Escherichia coli (*E. coli*) behoort tot de groep van de zuurvormende, lactose vergistende, gramnegatieve bacteriën, in de familie van de Enterobacteriaceae.



Figuur 1. *E. coli* als onderdeel van de coliformen en van de Enterobacteriaceae (overgenomen van Biesta-Peters, 2018)

De familie van de Enterobacteriaceae zijn kommensale bacteriën die een onderdeel vormen van de darmflora. Daardoor zijn zij een indicatie van fecale vervuiling in bedrijven. De aanwezigheid van Enterobacteriaceae en *E. coli* wordt gezien als een maat van de reinheid, reiniging of verontreiniging op een bedrijf (Halkman et al., 2014). Tegelijkertijd behoren ook tal van (gewenste) rijpingsbacteriën in de kaas behoren tot deze familie (figuur 1).

E. coli is veelzijdig en beweeglijk

De veelzijdigheid van *E. coli* wordt tentoongespreid in verschillende *E. coli*-stammen. Een reeks aan *E. coli*-stammen is in verband gebracht met klinische aandoeningen, waaronder darm-, urineweg- en systemische infecties. Sommige *E. coli*-stammen zijn in staat om toxines te produceren die ons DNA beschadigen. Niet elke *E. coli* is gevaarlijk; gevaar en ziekte (pathogeniteit) hangen af van de combinatie van verschillende kenmerken (zg. virulentie-eigenschappen). In bijlage 2 wordt dieper ingegaan op de virulentie-eigenschappen van de verschillende STEC-stammen, ook wel patho-typen genoemd.

Ooit heeft een *E. coli* stam vergelijkbare kenmerken opgenomen van de *Shigella dysenteriae*, de bacterie, die dysenterie veroorzaken en dezelfde gifstoffen (shigatoxine) kunnen produceren als STEC. Door de gifstoffen raken darmwandcellen beschadigd en deze kunnen

daardoor niet meer hun normale functies uitoefenen. STEC wordt daarom gezien als een aan voedsel verbonden ziekteverwekker (Eng.: foodborne pathogen).

De namen STEC of EHEC benadrukken verschillende manieren van kijken en indelen. Er zijn overlappen en verschillen. STEC benadrukt de shigatoxine productie en EHEC het risico op de HUS-ziekte (hemorrhagic uremic syndrome). EHEC staat voor 'enterohaemorrhagic *E. coli*', stammen die geïsoleerd worden bij HUS-patiënten. EHEC is op de zieke patiënt gericht, STEC op het besmette levensmiddel (melk, kaas), de drager.

Een kenmerk van de STEC-bacterie is, dat zij goed in een zuur milieu (zoals de maag) overleeft. De aanhechting van STEC vindt plaats in de dunne of de dikke darm. *E. coli* groeit optimaal bij 37°C (range: 7-50°C), een pH van 6,0-7,0 (range 4,4-9,0). STEC heeft een incubatietijd van 3-4 dagen (range 1-21) en er zijn weinig STEC-bacteriën nodig om sommige mensen ziek te maken (Donnelly, 2018). De meesten worden overigens niet ziek van STEC. Het enorme aanpassingsvermogen van *E. coli* (mutaties) en het feit, dat telkens opnieuw nieuwe varianten van STEC opduiken, maakt STEC in de ogen van overheden en instanties als WHO en EFSA, moeilijk in te schatten. Het genoom van *E. coli* is enorm flexibel (Carter et al., 2022) en ontwikkelt telkens opnieuw andere virulentie.

Naast de herkauwers komt STEC ook via planten (rauwe groentes, groentekiem) in de voedselketen. Dit kan gebeuren door het gebruik van mest, vervuild water of via menselijke dragers, zoals de dodelijke uitbraak in 2011 rondom de stad Hamburg laat zien. In dit geval waren het besmette rauwe groentes, geen kaas. Daar werd een afwijkende groep mensen getroffen, met name jong volwassen vrouwen werden ziek of stierven door de *E. coli* O104:H4 (Rasko et al., 2011), een stam, die andere genen inzette om tot dezelfde uitkomst te komen als eerder O157:H7. Zo ontbreekt het aanhechtingsgen eae in O104, een gen dat wel in O157 wordt gevonden. De uitbraak in Hamburg maakte duidelijk, dat STEC zich op allerlei manieren, ook buiten de dierlijke producten en de herkauwers kon manifesteren. In bijlage 3 wordt verder ingegaan op de mutaties en evolutie van *E. coli*.

E. coli meten

Om het gevaar van STEC te kunnen inschatten is het van belang te begrijpen a) op welke manier de bepaling/ determinatie gedaan kan worden (met welke STEC heb ik te maken?) en b) de vraag welke combinatie van genetische kenmerken leidt tot ziekte (is elke gevonden STEC gevaarlijk, of kunnen bepaalde gevaarlijke combinaties ook niet herkend worden?). STEC-bewijs vindt plaats met door bepaling van 'markers' van het genoom (PCR) en/ of serotype bepaling (dmv antigenen).

Op traditionele kweekplaten met een selectieve voedingsbodem (een TBX-kweekplaat, zoals Trypton-Byle-X Gluc agar) wordt duidelijk, of er kweekbare *E. coli*-bacteriën in het monster zijn. Op sommige kweekplaten kun je aan de hand van de telbare kolonies, de hoeveelheid bacteriën per gewicht of hoeveelheid vloeistof bepalen. Men drukt dit uit in het aantal bacteriekolonies (lees: de stipjes op de plaat) per gram kaas of per milliliter melk (Box 2).

Box 2. Hoeveelheid bacteriën

Doordat bacteriën zich exponentieel kunnen vermeerderen (elke generatie verdubbelt het aantal: 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256, 512, 1024, ...) wordt eigenlijk altijd met de logaritmische waarde, meestal de log₁₀ waarde gerekend, de 10-voudige verdubbeling. Dit is 1log₁₀, 2log₁₀, 3log₁₀, 4log₁₀, Oftewel 10, 100, 1.000, 10.000, Wanneer in de brochure gesproken wordt over reductie in aantal bacteriën, dan gaat het over de log₁₀ waarden. Elke stap naar beneden betekent absoluut gezien 90% minder bacteriën.

STEC-Serotypenⁱⁱ gerelateerd aan ziekte

STEC kent 100-en serotypen. STEC O157:H7 is de meest bekende (beruchtste) *E. coli*-bacteriestam die aan melk- en vleesproducten gekoppeld is. O157:H7 komt vaak voor in HUS-patiënten (acuut nierfalen). O26:H11 en O111:H8 worden ook gevonden in HUS-patiënten of mensen met bloederige diarree. De reden waarom verschillende serotypen toch allemaal hetzelfde gevaar uitlokken, heeft te maken met de toxines die zij alle kunnen aanmaken. In ouder onderzoek naar zuivel wordt nog gesproken over STEC O157:H7 versus non-O157 types. De O157:H7 kwam vroeger meer voor, maar na ongeveer 2015 (Kintz et al., 2023) ziet men ook andere varianten in melk en zuivel naar voren komen. Door de grote plasticiteit van het *E. coli*-genoom liggen onder de serotypen verschillende genetische kenmerken verscholen (Nouws et al., 2023).

Genen als grondslag voor ziekte

Bij het vaststellen van STEC gaat het vooral om de aanwezigheid van bepaalde genen: *stx*₁, *stx*₂ enerzijds en *eae* anderzijds. De letters *stx* staan voor het gen dat de shigatoxine productie regelt, *eae* voor een gen, dat de aanhechting van de bacterie aan de darmwand verzorgt. De combinatie van *stx* (toxine productie) en *eae* (aanhechting aan darmcellen) wordt vaak gevonden bij HUS. Verder bepaalt het subtypeⁱⁱⁱ van de verschillende genen hoe lang mens of dier infectieus blijft (uitscheiders) of hoe ernstig het ziekteverloop bij mensen kan zijn (Matussek et al., 2023).

De 'polymerase chain reaction'-test (PCR-test) wordt gebruikt om STEC in een monster aan te tonen. Conform de ISO-norm 13136 wordt 25 g levensmiddel eerst 18-24 uur ingeweekt met 225 g bouillon bij 37°C. Deze incubatie is bedoeld om aanwezige, levende *E. coli* bacterien te vermeerderen. Vervolgens wordt uit de vloeistof DNA gextraheerd, dat verder onderzocht wordt met behulp van real time PCR-apparatuur. Hierdoor kan men beoordelen of bepaalde onderdelen (markers) van het STEC-DNA aanwezig zijn in het levensmiddel. Afhankelijk, wat men allemaal in de vloeistof vindt aan gen-materiaal vindt een verdere typisering plaats van het type STEC, al dan niet in combinatie met de serotypische groepen.

Hoe ziet een juist beschreven uitslag-rapport eruit?

In een onderzoeksrapport wordt de onderzoeksmethode ISO 13136:2013-04 genoemd, gevolgd door de uitslag zelf. In het rapport staat dan bijvoorbeeld:

Parameter (pathogeniteit)	Uitslag	Eenheid
Shiga-toxine vormende <i>E. coli</i>	Positief	In 25 gram kaas
Stx1 en/of stx2-gen	Positief	
Eae-gen	Negatief	
O157-serogroep	Positief	

Er is sprake van een 'verdachte', dan wel 'verondersteld positieve' STEC-uitslag. De juiste interpretatie en beschrijving van de uitslag van het monster door het laboratorium is dan als volgt:

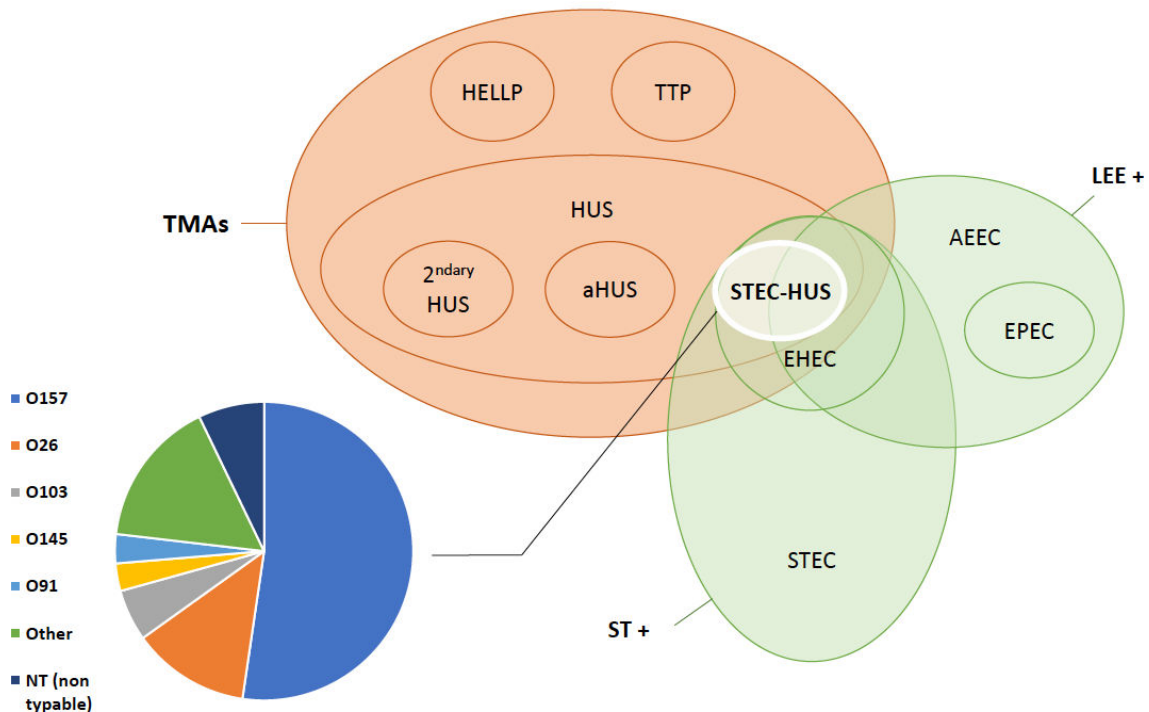
- Vanuit microbiologisch oogpunt is het onderzochte monster naar onze mening niet voor consumptie geschikt (schadelijk voor de volksgezondheid).

- *Escherichia coli* die mogelijk Shiga-toxine (STEC) zou kunnen produceren, werd gevonden met behulp van moleculair-biologische technieken, die zowel stx1/2-genmarkers als de serogroep O157 vaststelden.
- STEC van serogroep O157 werd dus vermoedelijk gedetecteerd in 25 g monster.

In bijlage 4 wordt de achtergrond van de PCR-test verder uitgelegd. De EU hanteert overal dezelfde methode (PCR-test: ISO 13136) om STEC vast te stellen. Dit gebeurt in routine-laboratoria. In bijlage 5 wordt daarop verder ingegaan.

In figuur 2 staat een verdere onderverdeling van STEC-typen op basis van virulentiekenmerken en serotypische groepen, die al dan niet verbinding zijn gebracht met nierfalen (HUS). Het is in ieders belang, dat men zo diep mogelijk graaft in de sub-typing van de stx-varianten. Niet elke variant is even gevaarlijk. Een probleem voor de controle-instantie is, dat men niet altijd voldoende of helemaal geen onderscheid maakt in de verschillende subtypen. Alle stx₁- en stx₂-subtypen worden meestal op een hoop geveegd, waardoor er een eenvoudiger interpretatie ontstaat voor een laboratorium^{iv}. Wanneer in een monster zowel stx₁ als stx₂ *niet* gevonden wordt, dan noemt men het monster 'negatief'. Alle andere combinaties, zowel als 'en, en' als 'of, of' leiden in vele landen tot een verdachte, dan wel een 'veronderstelde positieve' uitslag.

Men weet niet precies, wie de melk of kaas eet en hoe gevoelig individuele mensen zijn^v. Ook weet men niet helemaal precies hoe 'virulent' (lees: potentieel gevaarlijk) een stam is, en daarom wordt er een nul-tolerantie voor STEC gehanteerd, dat wil zeggen er mag geen STEC worden aangetoond in 25 g levensmiddel.



Figuur 2. Indeling en onderverdeling van E. coli-typen op basis van hun virulentie en serotypen groepering, al dan niet gekoppeld aan HUS (overgenomen uit Joseph et al., 2020).

Over producten met een hoog-risico-profiel, zoals rauwe melk en boerenkaas, schrijft de NVWA (2014): “Het is niet aanvaardbaar dat *E. coli* in bezit van het *stx*₁ en/of *stx*₂ gen (volgens ISO/TS 13136) in het levensmiddel aanwezig is. Als dit wel het geval is, is het levensmiddel schadelijk voor de gezondheid volgens Vo. (EG) nr. 178/2002 en zal de betreffende partij van de markt worden geweerd of worden gehaald en wordt een boeterapport opgemaakt.” Elke STEC wordt in navolging van de WHO (2019) als potentieel gevaarlijk ingeschat. Dus, anders gezegd, elke *stx*-vondst via de PCR leidt tot blokkade en gaat veelal gepaard met vernietiging van een product, ongeacht verdere sub-typing en/of aanwezigheid van aanhechtingsgenen er gevonden wordt en ondanks dat de WHO bijvoorbeeld gradaties in de ernst als ziekteverwekker maakt^{vi}.

Er zijn wel degelijk kanttekeningen te maken bij zo’n rigide handelwijze. De PCR-methode is als diagnostische test bedoeld om een zieke patiënt te begrijpen; iemand met diarree en/ of HUS werd onderzocht of er een EHEC-besmetting aan ten grondslag lag, een andere bacterie. We maken nu de kaas tot patiënt en laten de PCR bepalen of zij ziek(makend) is. De PCR-test, als kwalitatieve test (ja/ nee), geeft namelijk geen uitsluitsel over de concentratie aan STEC, de hoeveelheid kolonies (CFU) per gram kaas.

Whole Genome Sequencing biedt inzicht in het gehele genoom

Wat tegenwoordig ook mogelijk is, is om het gehele DNA-profiel van *E. coli* in beeld te brengen. In het Engels heet dit ‘whole genome sequencing’ (WGS), (Ferdous et al., 2015; Nouws et al., 2023; Matussek et al., 2023). Dit type onderzoek biedt enerzijds de mogelijkheid om nieuwe genen te ontdekken, die aanleiding kunnen geven tot ernstige ziektes als HUS en ook tot een betere afbakening van genen die wel of niet aanleiding geven tot ernstige, milde of geen klachten. Met WGS voorkom je, dat een monster positief wordt beoordeeld op basis alleen het vinden van DNA-fracties zoals in de PCR-test. Een betere differentiatie dus op termijn, waardoor vals-positieve en vals-negatieve monsters kunnen worden uitgesloten (Vorimore et al., 2023). Echter in routine-onderzoek wordt WGS niet ingezet; probleem is uiteraard de tijdsinspanning en de kosten van dergelijk onderzoek. Met behulp van WGS is men beter in staat de bron van de infectie terug te vinden door het hele genoom in bijvoorbeeld een patiënt met een levensmiddel te vergelijken. Het is als het ware een ‘fingerprint’ van de *E. coli* stam.

3. Beheersing van *E. coli* en STEC op de boerderij

STEC is niet altijd aanwezig op elke boerderij, maar kan ‘plotseling’ opduiken. Een gevonden STEC-besmetting kan na verloop van tijd ook weer ‘als vanzelf uitdoven’ en weer verdwijnen (3-4 maanden). STEC kan ook langere tijd, dus persistent op een bedrijf zijn, waardoor zo’n bedrijf een potentieel gevaar vormt als aanjager van STEC voor andere bedrijven. Persistentie op een bedrijf betekent vaak, dat er een continue uitwisseling en herbesmetting plaatsvindt onder de dieren. Dit treedt meer en makkelijker op, op grotere bedrijven (Tamminen et al., 2019).

Als er een STEC-probleem opduikt, dan kom je er niet omheen systematisch te zoeken, waar STEC zich ophoudt en hoe STEC zich in het bedrijf verspreidt. Meer dan 70% van de rundveebestanden is positief op STEC. Komend vanuit de dikke darm en door besmetting met feces (mest) op de spenen en uier of tijdens het slachtproces leidt het tot bacteriële verontreiniging van melk en vlees. Net zoals mest versmeert in de stal en de melkstal,

verspreidt ook STEC zich. Water is een belangrijke verspreidingsbron van STEC. Een recente overzichtsstudie (Withenshaw et al., 2022) geeft geen eenduidige conclusies over de invloedfactoren op STEC-aanwezigheid binnen bedrijven. Aandachtspunten uit studies zijn onder te verdelen in twee categorieën:

- 1) verspreiding, besmetting en versmering en
- 2) stress onder vee.

In bijlage 7 is een voorbeeld beschreven, hoe men heeft getracht door experimenteel onderzoek STEC op bedrijven te reguleren.

Hygiëne: vermijd verspreiding, (her)besmetting en versmering

STEC kan zich verspreiden via water dat met mest in aanraking komt, overleeft nog in vrij zure milieus en kan zich ophopen in delen van de stal, en in (jonge) dieren. Stro, een droog ligbed en stalvloeren zonder mest dragen bij aan het beheersen van STEC. STEC kan via huisvliegen verspreid worden (Sadeq et al., 2024), maar ook via vogels (Rapp et al., 2021). Ook katten zijn verdacht om STEC door de omgeving te verslepen (Tamminen et al., 2019).

Water en vochtigheid zijn een belangrijke voorwaarde voor de groei van STEC. Vervuild drink- en slootwater kunnen een bron zijn van STEC, evenals waterbakken/ -bronnen, waaruit gezamenlijk gedronken wordt. Een goede bron met schoon, dieper grondwater is niet verdacht.

STEC kan zowel op met mest vervuilde houten of gegalvaniseerde ijzeren oppervlakte langere tijd (> 1 maand) overleven. Hier geldt, dat opgedroegen STEC terugdringt. Vochtig hout bij lagere omgevingstemperaturen (5°C) is het gevaarlijkste (Williams et al., 2005). Door contactbesmetting (handen, laarzen) kan STEC worden versmeerd.

Hoe groter de bedrijven worden, hoe groter de kans op STEC is. Grotere bedrijven melken vaker met een robot en koeien lopen vrij rond (meestal in de ligboxenstal). Daarom zijn de andere verschillen (stalsysteem en melksysteem) door de bedrijfsgrootte beïnvloed (Widgren et al., 2015).

In gebieden met hoge dichtheden aan koeien is de kans op besmetting groter (Tamminen et al., 2019). Aankoop van vee verhoogt de kans op STEC-insleep.

Omweiden met tussentijdse rustperiodes zonder vee, reduceert de STEC-druk in een perceel en vermindert herbesmetting van vee in vergelijking met permanent weiden. Gezien het maatschappelijk belang van weidegang en de grote STEC-druk in de zomer en op de weide wordt in bijlage 8 verder ingegaan op de kennis rondom weidegang.

STEC doet het goed in het warme, vochtige seizoen en wordt vaker gevonden in het 3^e kwartaal van het jaar. Aan het eind van de zomer is dikwijls meer verspreiding van *E. coli* en daarom de STEC-kans groter dan in het koelere voorjaar. Weidegang is eerder een verhoogd risico voor STEC-uitscheiding (Venegas-Vargas et al., 2016). Dit kan samenhangen met de verhoogde hittestress, maar ook met weer-omstandigheden, waar STEC zich beter kan vermenigvuldigen.

STEC kan langere tijd (> 6 maanden) buiten overleven in vroege mestflatten (mei-aug), en ook gedurende de winter (Nyberg et al., 2019). Het bezoek van publiek aan boerderij en weilanden draagt daarom een bepaald risico in zich door contactbesmetting met mest.

Jongvee dragen eerder STEC dan oudere dieren en kunnen als verspreiders optreden (Ballem et al., 2020, Withensaw et al., 2022). Er is een groot verschil in uitscheiding tussen individuele dieren, maar ook tussen zomer en winter. Het terugdringen van STEC-uitscheiding door dieren en het detecteren van 'super-shedders' betekent een

belangrijke bijdrage voor het terugdringen van STEC, dat in het bedrijf en de feces circuleert. Daarmee wordt het risico op STEC in melk geringer (Widgren et al., 2018; Tamminen et al., 2020). Zie verder: bijlage 9.

STEC wordt gevonden in allerlei soorten rundvee (melkvee en vleesvee), die totaal verschillende rantsoenen kregen, inclusief rantsoenen uitsluitend met ruwvoer (Hancock et al., 2006).

Mogelijk kunnen probiotica bestaande uit *Lactobacilli* een bijdrage leveren in het terugdringen van STEC in het darmmilieu van rundvee en daarmee de uitscheiding van STEC (Mansilla et al., 2023).

Mensen kunnen STEC van plaats naar plaats verspreiden via schoeisel en kleding. Dit kan gebeuren door de boer zelf, maar ook loonwerkers, hun machines of KI-medewerkers of bezoekers.

Bij het melken geldt, dat de voorbereiding van de melkapparatuur in de juiste volgorde gedaan moet worden, in combinatie met het dragen van handschoenen. Met schone, gereinigde handen wordt eerst het melkfilter geplaatst, de melkstal in orde gebracht, voordat verder men in contact met de stalruimte en de koeien komt. Echt hygiënisch melken kan alleen door geschoold, gemotiveerd en getraind personeel gebeuren. Bij hygiënisch melken hoort de juiste voorbehandeling, eventueel predippen, voorstrippen, controle op vlokken in de voormelk, afdrogen van de spenen en het reinigen van de uier zelf.

Besmette personen weten dit niet altijd en volwassenen doen er gemiddeld 18 dagen over om volledig STEC-negatief te testen. Een goede huishoudelijke hygiëne, waarin handen geregeld tussendoor gewassen worden, vermindert de kans op verspreiding via vuile handen (hand-mond besmetting). In bijlage 10 wordt ingegaan op de rol van de humane STEC-verspreiding.

Reduceer stress onder vee

Onder allerlei stress-condities kunnen koeien STEC meer gaan uitscheiden: zoals hittestress, de eerste 30 dagen van de lactatie, in de eerste lactatie als vaars en door voedingsstress (negatieve energiebalans), (Venegas-Vargas et al., 2016).

Dieren ziek zijn (ook subklinisch), kunnen meer STEC uitscheiden. Behandeling van ademhalingsaandoeningen (longontsteking) kan tot minder STEC te leiden, maar ook het gebruik van ontwormingsmiddelen (Venegas-Vargas et al., 2016). Dus het voorkomen van ziektes door gezonde voeding en goede dierhouderij is belangrijk.

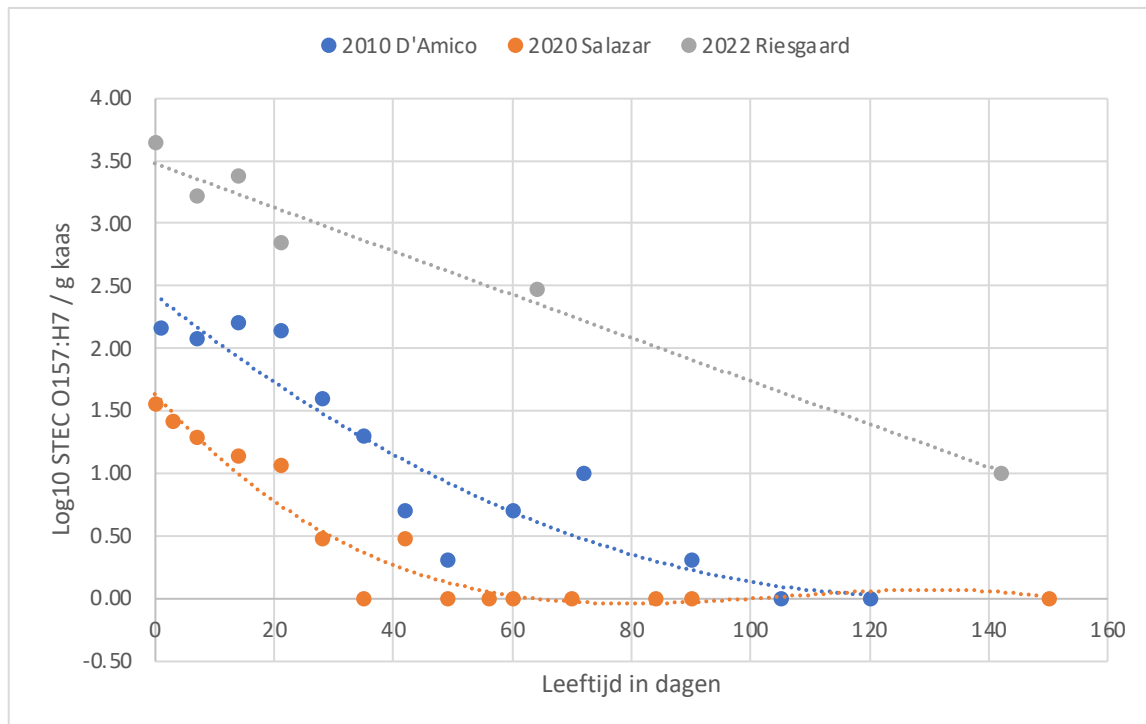
Stx- en eae-genen komen bij koeien met (sub)klinische mastitis, waar *E. coli* wordt gevonden, niet voor. Mastitis lijkt dus geen directe bron voor STEC te zijn, maar geeft wel extra stress voor een koe.

Controle van STEC in kaasmelk en rijping

Je kunt niet alle kaassoorten (Witschimmel, Goudse of Cheddar) op één hoop gooien, aangezien pH, bereiding, temperatuur en vochtgehalte van invloed zijn hoe de STEC zich ontwikkelt. Tijdens het maken van de kaas vermeerderd STEC zich, en concentreert zich door het indikken in de kaasmassa (caseïne), waarbij de kaaswei een factor 10 lager ligt.

Verschillend onderzoek noemt een stijging van de waardes met (meer dan) $1-2\log_{10}$ waarde (tot $2-3\log_{10}$) in de eerste 24-36 uur (Miszczycha, 2016). Dit betekent, dat het start-niveau van STEC-besmetting in de kaasmelk bepalend is voor het uiteindelijke niveau in de kaas.

Vervolgens is het afhankelijk van de leeftijd van de kaas (jong, belegen, oud) hoeveel STEC er is afgestorven in de tijd van kaasrijping.

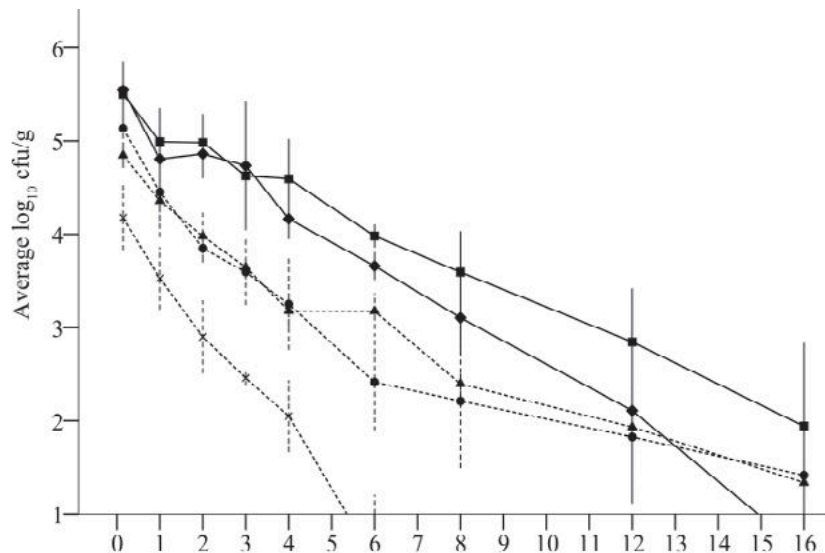


Figuur 3. Verloop van het log₁₀ kiemgetal voor STEC O157:H7 per gram Goudse (achtige) kaas in drie verschillende onderzoeken en op basis van een kunstmatige besmetting van de melk met STEC (eigen samenstelling uit drie bronnen)

In figuur 3 zijn drie experimentele onderzoeken naar STEC in Goudse rauwmelkse kaas (D'Amico et al., 2010, Salazar et al., 2020 en Riesgaard, 2022) getoond. Onderzocht werd of en hoe snel STEC niet meer gevonden kon worden tijdens de rijping. Uit de drie onderzoeken wordt duidelijk, dat (1) STEC de eerste dagen vaak nog niet afneemt, maar (2) daarna geleidelijk aan afneemt en daarom in lang gerijpte kazen niet meer gevonden kan worden en dat (3) het moment dat STEC niet meer gedetecteerd kan worden afhangt van het besmettingsniveau van de kaasmelk. Het kiemgetal voor STEC in de kaasmelk in de drie onderzoeken was hoog, respectievelijk circa 3.000, 150 of 30 kiemen STEC/ g kaasmelk op dag 1.

Verder blijken niet alle *E. coli*-stammen even snel te verdwijnen tijdens de rijping. In Zwitserse halfharde kaas (zoals Goudse) werden twee hoeveelheden STEC toegevoegd (koemelk) en verhit tot of 40°C of 46°C (Peng et al., 2013). De eerste komt het dichtst bij het Goudse kaas recept en wordt hieronder afgebeeld (figuur 4).

Twee gewone *E. coli*-stammen worden naast 3 STEC-stammen geïnoculeerd op een laag infectieniveau van 1 log₁₀/ ml = 10 bacteriën/ ml kaasmelk). Figuur 4 laat zien hoe de 3 verschillende STEC-types en 2 gewone *E. coli*-stammen verschillend verdwijnen in de tijd (week 0 - week 16). Het is duidelijk, dat de afname eerder tijdsgebonden is als stamgebonden. Grofweg neemt *E. coli* in 16 weken met 3-4log₁₀ af, startend bij 5log₁₀ in week 0.



Figuur 4. Verschil in afname van STEC-stammen en *E.coli*-stammen in rauwmelkse kaas (vergelijkbaar receptuur als Goudse kaas) in de eerste 16 weken van rijpen (overgenomen van: Peng et al., 2013).

In het bovengenoemde onderzoek van Salazar et al. (2022) werd de kaasmelk geïnfecteerd met 17 STEC bacteriën/ ml melk en in de andere onderzoeken werd nog meer STEC per ml geënt (fig. 3). Al deze onderzoeken zijn dus gedaan op basis van zeer hoge STEC-besmettingen in de kaasmelk. De kans dat dergelijke hoge *E. coli* besmettingen in kaasmelk gevonden worden is uiterst gering, als je een norm van 10 bacteriën/ ml *E. coli*^{vii} als norm hanteert. STEC is een klein deel van de totale *E. coli*-populatie en komt bij deze hygiënenorm in nog lagere concentraties voor.

Thermiseren en koelen

Hoewel de vraag naar thermisatie van kaasmelk (kort verhitten bij maximaal 60-63°C) buiten de scope van deze brochure gaat, wordt in bijlage 11 ingegaan op de impact van thermisatie bij de beheersing van STEC. Ook onderzoek van het COKZ laat zien, dat de kans op STEC in gethermiserde Goudse kaas kleiner is dan die van rauwmelkse Goudse kaas (zie hieronder tabel 1).

Overigens heeft een bewaartemperatuur van de avondmelk tot ongeveer 11-12°C geen invloed op het uitgroeien van *E. coli* in de kaasmelk, ervan uitgaande dat de melk de volgende ochtend in kaas wordt omgezet. In bijlage 12 wordt een en ander hierover uitgelegd.

Antagonisten

Bij infectieziekten worden bacteriën veelal bestreden met antibiotica, wat echter geleid heeft enerzijds tot een hoge mate van antibiotica-resistentie een stimulering van de mutatie en het vormen van nieuwe stammen. De toegepaste toevoeging van Kaliumnitraat aan kaasmelk werkt bacterie-onderdrukkend, maar staat onder druk door de omvorming tot nitriet.

Tal van andere 'natuurlijke' antagonisten worden genoemd, getest of al gebruikt als bacterieremmer, zoals bacteriocines (zoals nisine), organische zuren en essentiële oliën (Zhao et al., 2023). Niet alle hebben ook toepassing in kaas.

Nisine

Nisine is een peptide, dat door bepaalde stammen van *Lactococcus lactis* wordt uitgescheiden. Het is toegestaan in de EU in kaaszuursels. Echter nisine heeft vooral effect op gram-positieve bacteriën, zoals *Staphylococcus aureus* en *Listeria monocytogenes*, maar weinig remming op de gram-negatieve bacteriën, zoals *E. coli*. In combinatie met fytinezuur is er echter wel een onderdrukking gevonden op STEC (Zhao et al., 2023). Fytinezuur komt voor in plantenzaad en is van belang bij de kieming van zaad. Het wordt echter ook als stof uit planten geïsoleerd. Een toepassingsmogelijkheid om STEC in biofilms en in de vleesverwerkende industrie aan te pakken, wordt nog nadere beoordeeld.

Plantaardige antagonisten, polyfenolen

Experimenten zijn gedaan met natuurlijke polyfenolen uit de fluweelboom (*Rhus typhina*) in Cheddar kaas (Wang et al., 2023). Voor de oorspronkelijke bewoners in de VS waren de vruchten van deze plant bekend als medicijn bij darmproblemen. Proeven werden uitgevoerd op bestaande kaas, en de toepassing is niet uitgerijpt.

Fagen

Bacteriofagen zijn virussen, die bacteriën aangrijpen. Onderzoek in sla laat zien, dat hierdoor een (forse) reductie van het aantal STEC-kolonies kan worden behaald (Lu, 2022). Een toepassing in kaasmelk of kaas is niet bekend.

Opsporen van STEC op een bedrijf

Recent onderzoek in feces van Nederlandse geiten en schapen brengt aan het licht, dat men in vrijwel elk bedrijf STEC aantreft. Meer dan 95% van de mestmonsters is positief voor stx₁ of stx₂. Wanneer je echter een nauwere definitie neemt van STEC als de combinatie van stx en eae (aanhechting), dan gaat het (slechts) om 4,5% van de monsters (Van Hoek et al., 2023). Bovendien gaat het hier om mestmonsters, niet om melkmonsters of kaasmonsters.

Om vast te stellen of er sprake is van een STEC-besmetting op een bedrijf worden verschillende onderzoek- en monsternamen-methodes gehanteerd. Monsters van het melkfilter worden vaak genomen, omdat alle kaasmelk door het filter is gelopen en je daardoor beter aan het licht kunt brengen of STEC in een bedrijf circuleert. Melkfilter-screening kan dienen als eerste identificering van een probleem (is er een potentieel gevaar, een risico?), of om vanuit wetenschappelijk oogpunt bedrijven onderling te vergelijken. Flink et al., (2019) vergeleek de aanwezigheid van STEC in melkfilters (gegroepeerd naar stx₁ en/ of stx₂) in 300 random gekozen Zweedse melkveehouderijbedrijven. Op basis van de gehanteerde definitie van stx₁ en/ of stx₂, blijkt 70% van de melkfilters positief te zijn na PCR-test. Op basis van de kweekplaatmethode met selectieve voedingsbodems kwam men echter tot slechts 15% STEC-isolatie. Er is bijna een factor 5 verschil in positieve uitslag door de gekozen detectiemethode. Verder betekent het vaststellen van STEC in een melkfilter nog niet, dat er ook een risico is in de melk, of de boerenkaas.

Naast een eerste indicatie van een positief melkfilter of de werkelijke vaststelling van STEC in kaas is verder onderzoek noodzakelijk. Screening voor STEC is een kostbare zaak. Het opsporen van individuele dieren gebeurt vaak stapsgewijs door steeds kleinere groepen te bemonsteren (mengmonsters melk of mest), om zo een verdacht dier te selecteren. Het is

echter de vraag of dat dier, dat als uitscheider gold een maand geleden, vandaag nog steeds STEC uitscheidt in de mest.

STEC-incidentie in Goudse boerenkaas in Nederland

Gegevens van het COKZ (Centraal Orgaan Kwaliteitszaken) en de affineurs bieden de mogelijkheid om de STEC-risico's in Nederlandse boerenkaas te beoordelen. Van 2019 t/m 2023 heeft het COKZ 1261 melk- en kaasmonsters onderzocht (steekproefmonsters). Deze gegevens zijn aangevuld met de steekproefmonsters van affineurs, vooral Goudse boerenkaas. Alle Goudse kaas is op een leeftijd van 14 dagen bemonsterd.

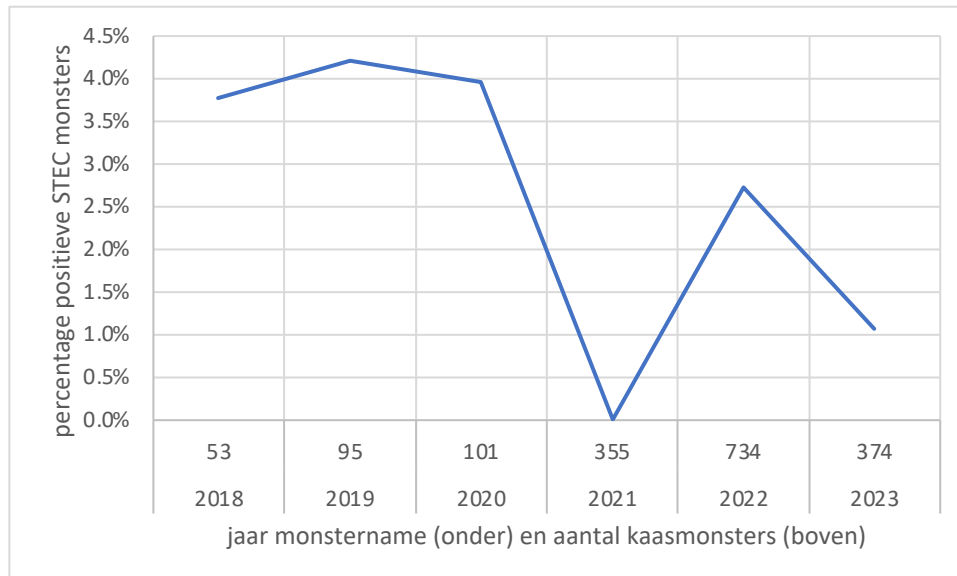
In 1,9% van alle 2586 monsters werd via de PCR-test volgens ISO13136 STEC aangetoond. De Goudse kaas is van de kazen het meest bemonsterd, daarvan was 2,0% STEC positief (Tabel 1). Na verhitting (thermisatie) is de STEC-kans geringer (0,3%), na pasteurisatie werd geen STEC meer aangetoond. Ook in zachte kazen en in melkmonsters wordt STEC aangetoond. Verder lijkt het erop, dat het aantal positieve STEC-monsters in Goudse boerenkaas na 2020 geleidelijk afneemt (Figuur 5), zowel bij de COKZ-monsters als de affineurs (verschil niet weergegeven). In het jaar 2021 werd zelfs geen enkel positief Goudse boerenkaasmonster gevonden.

Tabel 1. Melk- en kaasmonsters uit Nederland (2019-2023); opgedeeld naar type kaas (Goudse of zachte), hittebehandeling (rauw, gethermiseerd, gepasteuriseerd) en melkdier (koe of geit/schaap); Eigen data samengesteld op basis van de data aangeleverd bij de BBZ door COKZ en affineurs.

	Aantal monsters (n)	% STEC positief
Goudse kaas		
rauwmelks	1.712	2,0%
thermisatie	345	0,3%
pasteurisatie	45	0,0%
Zachte kaas		
rauwmelks	27	3,7%
Rauwe melk		
koe	448	2,5%
geit of schaap	9	11,1%

De verschillen in STEC tussen kaas uit rauwe, gethermiseerde en gepasteuriseerde melk (tabel 1) laten zien, hoe belangrijk *een verlaagde STEC-concentratie in de kaasmelk zelf* is. Door de verhitting heeft een (sterke) \log_{10} -reductie in de te verkazen melk plaatsgevonden. Indien men **uit principe** niet wil pasteuriseren, dan moet je als veehouder/ kaasmaker hygiëne-maatregelen nemen om STEC in de kaasmelk terug te dringen 'tot het niveau van gepasteuriseerde melk'.

Afsluitend leert de ervaring overigens, dat een STEC-vondst met behulp van de PCR-test eerder lijkt op een incident. Er is nauwelijks sprake van herhaling in verschillende partijen kaas van hetzelfde bedrijf.



Figuur 5. Het percentage positieve STEC-monsters in Goudse boerenkaas in de loop der jaren 2018 t/m 2023. Boven het jaartal staat het aantal monsters in het betreffende jaar. Notabene het jaar 2023 betreft niet het hele jaar.

4. Risico-analyse

De Codex Alimentarius presenteert een wereldwijd systeem om mensen te beschermen tegen mogelijke voedsel gerelateerde gevaren. De aanwezigheid of vondst alleen van een ziekteverwekkend gen is geen vorm van risicoanalyse of zelfs maar een bewijs voor menselijk gevaar. Een door voedsel overgedragen gevaar wordt binnen de Codex Alimentarius gedefinieerd als een 'biologische, chemische of fysische agens of eigenschap van voedsel met het potentieel om een nadelig effect op de gezondheid te veroorzaken'. Dit impliceert, dat men groepen mensen moet onderscheiden en ook de hoeveelheid STEC moet vaststellen per gram kaas. Alleen een kwalitatieve bepaling (ja/ nee) beschrijft nog geen werkelijk risico.

Verder is het van belang, dat duidelijk wordt welk aandeel rauwmelkse Goudse kaas daadwerkelijk heeft bij ziekhuispatiënten, HUS-gevallen of als er sprake is van diarree. Dat HUS met STEC verbonden is, mag duidelijk zijn, maar of een HUS-patiënt ook daadwerkelijk rauwmelkse kaas met STEC heeft geconsumeerd, is niet altijd aangetoond.

Er is geen 'nul-risico', wel risico-reductie

Vooropgesteld moet worden, dat de consumptie van rauwmelkse kaas, of dit nu Goudse is of andere kazen, in verhouding tot andere levensmiddelen als veilig kan worden beschouwd. Dat blijkt uit vele studies, waarin rauwmelkse kaas geproduceerd wordt en waarin geen of zeer lage aantallen besmetting met STEC gevonden is (Donnelly, 2018). Dat neemt niet weg, dat er ook STEC wordt aangetoond, en dat er verbetering mogelijk is van de hygiëne.

Aan al ons handelen (en consumptie) kleven risico's. Door ervaring en wetenschappelijke kennis tracht men risico's zo goed mogelijk te benoemen en in te schatten om ze vervolgens om te zetten in veiligheids- en controlesystemen. Een omzetting is een zg HACCP-plan, waarin de verantwoordelijke voor de productie zich laat controleren op handelingen (kritische controlepunten in het proces). Verder zijn er in verschillende landen tests ontwikkeld voor verschillende bacteriën of groepen bacteriën met een sterke signaalfunctie.

De incidentie van HUS onder STEC-geïnfecteerde patiënten is stijgende. Er is een schatting, dat minstens 5-15 van 100 mensen, waar STEC is aangetoond, een vorm van HUS ontwikkelen (Hua et al., 2021).

Om een reductie van het risico voor de consumptie van rauwmelkse zuivel te realiseren, kun je niet vertrouwen op een enkelvoudige ingreep als pasteurisatie. Ook na het pasteuriseren kan er herbesmetting plaatsvinden, vaker bij kleinere verwerkers. Risico-reductie zal altijd een gevolg zijn van normering, (eigen)controle en vooral epidemiologische kennis en inzicht van de bacteriën en de daaruit voortvloeiende preventieve maatregelen. Onderzoekers zijn het erover eens, dat wanneer je pasteurisatie of thermisatie van kaasmelk niet wilt toepassen, de enige mogelijkheid om STEC-risico in kaas tot vrijwel nul in 25 gram product te reduceren, is ervoor te zorgen, dat er zeer lage dosis STEC/ *E. coli* in kaasmelk aanwezig zijn. In het bereidingsproces van Goudse kaas zijn er geen echte andere mogelijkheden om pathogenen te reguleren, lijkt het (Engstrom et al., 2021). Zij schrijven dan ook: *“Met uitzondering van kaas waarbij bij de vervaardiging sprake is van duidelijke verzuring of het hoog verhitten van de wrongel, wordt de veiligheid van kaas uit rauwe melk voornamelijk bepaald door de microbiologische kwaliteit van de melk zelf en niet door het vermogen van het kaasbereidingsproces om ziekteverwekkers te inactiveren.”* In Goudse kaas kan STEC een tijdlang overleven en de inname van kleine aantallen STEC kunnen al tot ziekteproblemen leiden.

In de literatuur kom je minimaal infectieuze dosis tegen tussen <10 en <100 STEC-bacteriën, wat al een gevaar kan opleveren (Strachan et al., 2005; Kintz et al., 2023).

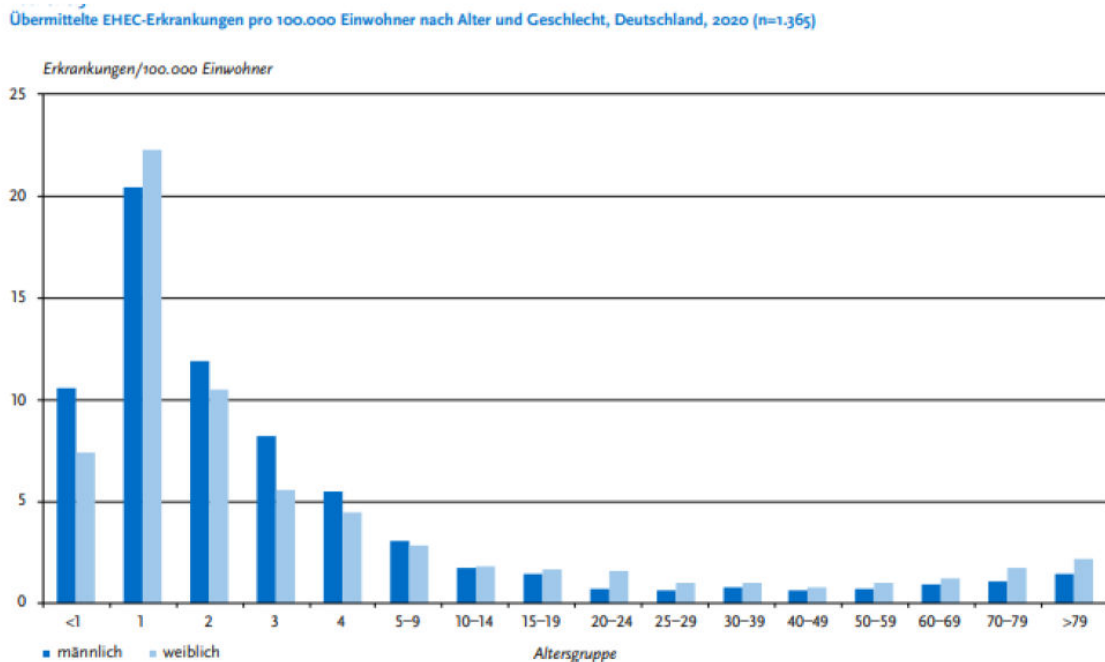
Microbiële risicobeoordeling (MRA)

Meestal overschatten mensen, ook zij die met cijfers kunnen omgaan, risico's. Wij zijn er slecht in, omdat uitzonderlijke gevallen met veel impact (vliegtuigcrash) blijven hangen, ook omdat er in de pers breed aandacht aan wordt besteed. Ziekte en dood maken indruk, maar horen bij het leven. Wij zijn de gemiddelde levensverwachting van een populatie als een recht van elk individu gaan zien, maar statistisch gezien haalt de helft deze leeftijd niet (Craig, 2022). Het gebrek aan kennis over kansberekening wordt zowel positief als negatief ingevuld met respectievelijk verleidingen (de kans om miljonair te worden) en angsten (de kans om dood te gaan of ziek te worden).

Emoties en onjuiste kansberekeningen zijn slechte raadgevers als het om beslissingen als voedselveiligheid gaat. Er zijn kansmodellen om beslissingen over risicobeheer van door voedsel overdraagbare gevaren, te onderbouwen en het effect van de verschillende ingrepen te communiceren. Kwantitatieve microbiële risicobeoordeling (QMRA) is een op wetenschap gebaseerde en transparante techniek die vaak wordt gebruikt om het risico dat gepaard gaat met een gevaar in een levensmiddel te kwantificeren. De QMRA, zoals eerst gedefinieerd door de FAO, de WHO en de Codex Alimentarius Commissie, omvat vier fasen: gevarenidentificatie, gevarenkarakterisering, blootstellingsbeoordeling en risicokarakterisering.

Voor de risicoanalyse is het van belang een leeftijdsdifferentiatie te maken. De cijfers laten zien, dat met name de zeer jonge kinderen (< 5 jaar) verhoogde aantallen EHEC-gevallen laten zien. Vrij ongevoelig zijn jongvolwassenen en volwassenen tot zo'n 50-60 jaar. Daarboven zie je weer een lichte stijging naarmate de leeftijd oploopt (figuur 6). Data echter of deze verhoogde EHEC-gevallen bij kinderen ook daadwerkelijk door rauwmelkse kaas worden veroorzaakt, ontbreken.

Er bestaat een kwantitatieve risicobeoordeling voor STEC-stammen die HUS veroorzaken in rauwmelkse zachte kazen (Perrin et al., 2015). Het Franse model beoordeelt de risico's tijdens de melkwinning en het maken en opslaan van de kaas. Deze QMRA voorspelde dat de gemiddelde percentages besmette kaas bij baseline 16,3% waren voor alle STEC en 1,8% voor de vijf belangrijkste pathogene serotypen van STEC (O157:H7, O26:H11, O103:H2, O111:H8 en O145:H28). De auteurs concludeerden logischerwijze, dat ingrepen en handelingen vóór en na het kaasmaken een enorme impact hebben op het microbiële risico in zachte rauwmelkse kazen.



Figuur 6. Prevalentie van EHEC per 100.000 inwoners voor mannen en vrouwen naar leeftijd (jaar 2020), (overgenomen uit RKI, 2021).

Er bestaat geen QMRA voor halfharde kazen als Goudse. Verschillende soorten bacteriën in kaas samen met de pH-veranderingen die plaatsvinden tijdens het productieproces hebben geringe invloed op de STEC-overleving (Callon et al., 2016). Kennelijk is consumptie van Goudse boerenkaas in vergelijking met bijvoorbeeld zachte kaassoorten al een vermindering van risico; het ontbreekt goeddeels aan STEC-uitbraken door Goudse kaas, ondanks herhaalde publicaties dat verschillende STEC-stammen in kaas aanwezig kunnen zijn. Dat laatste wordt ook beaamd door een ander Frans artikel over HUS onder volwassenen (Travert et al., 2021). Hier worden wel doden genoemd en er wordt een link gelegd met de slechter wordende immuun afweer en onderliggende chronische problemen bij de oudere mens.

Mogelijk speelt ook het hoge vetgehalte in Goudse kaas (52-56% vet in ds) een beschermende rol. In een dubbelblind studie onderzocht Ten Bruggencate et al., (2016) de verhoogde inname van melkvetmembranen bij gezonde volwassenen. De mensen kregen na 2 weken consumptie een eenmalige hoeveelheid pathogene *E. coli* en de groep die extra melkvet consumeerde, had minder last van darmklachten, betere poepconsistentie en een verminderd wc-bezoek. Verder kan melkvet ook van betekenis zijn in het verminderen van

de aanhechting van STEC in de darm (Bagel et al., 2023), wat gezien wordt als strategie om de impact van STEC te verminderen.

Sturen op Enterobacteriaceae en *E. coli* in kaasmelk

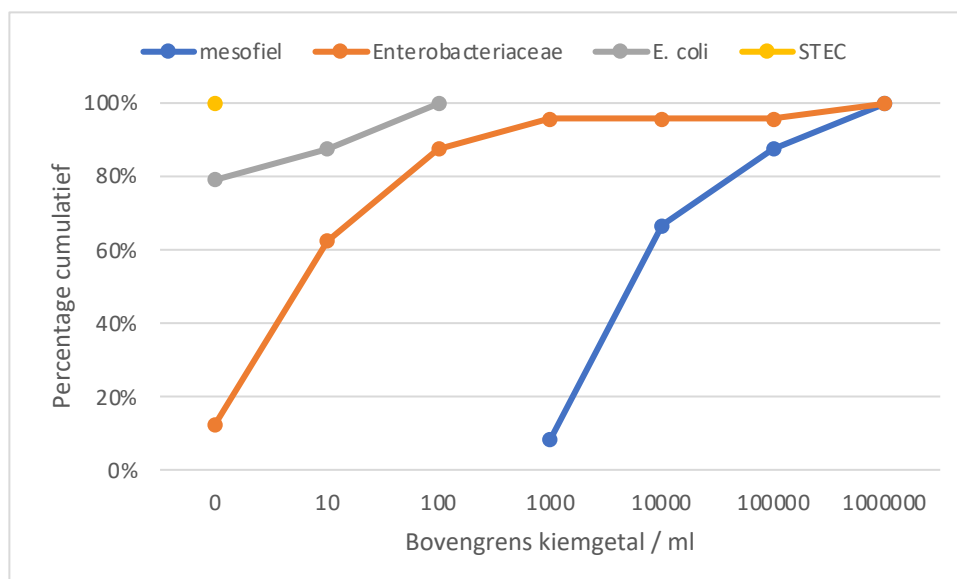
Je kunt niet dagelijks een STEC test doen. Veel zinvoller is het om met behulp van snelle kweektests de hoeveelheid werkelijk, levende *E. coli* te bepalen (zie hierboven en bijlage 13). STEC zijn pathogene *E. coli*, die een onderdeel vormen van de Enterobacteriaceae, wat weer een deel is van het totale mesofiele kiemgetal. Dat vindt de FAO eigenlijk ook, als zij schrijft dat *“het testen van voedsel op STEC als onderdeel van monitoringprogramma's beperkt nut heeft vanwege de lage concentratie STEC-bacteriën in voedingsmiddelen. Daarom wordt de kwantitatieve detectie van NTS E. coli (ISO 16649-2) als proceshygiëne-indicator voorgesteld als een alternatieve aanpak om de hygiëne tijdens verwerking en nabewerking te monitoren”. ...“Hoewel STEC uit rauwe melk is geïsoleerd, is STEC-bepaling van melk ongebruikelijk en de meeste bemonsterings- en testprotocollen richten zich op indicatororganismen zoals E. coli”*. In bijlage 14 en 15 wordt hier nog verder op ingegaan.

In figuur 7 zijn uitslagen van dezelfde melkmonsters (hier individuele koemelkmonsters) weergegeven. Het betreft het percentage van de totale hoeveelheid monsters die onder een bepaalde grenswaarde valt, oplopend van 0, 10, 100, 1.000, 10.000, 100.000 en 1.000.000 bacteriën/ ml melk. De bovengrenzen weerspiegelen de \log_{10} waarden, respectievelijk \log_{10} 0, 1, 2, 3, 4, 5, en 6. Deze grenswaarden zijn niet voor niets genomen. In het kader van veiligheid verlaagt de overheid gemakkelijk de grenswaarde met een factor 10 oftewel 1 \log_{10} -waarde. Verder hebben we te maken met een exponentiele bacteriegroei, waardoor waardes snel kunnen stijgen en tenslotte bouwt de overheid veiligheidsmarges in, door voor de zekerheid een factor 10 lager te gaan zitten. Het zijn slagen om de arm.

Wanneer je naar het mesofiele kiemgetal kijkt (= 'het' kiemgetal), dan heeft geen van de monsters een kiemgetal onder de 100 bacteriën/ ml. Echter 8% is onder de 1.000, 67% onder de 10.000, 88% onder de 100.000 en alle monsters zijn lager dan 1.000.000 bacteriën/ ml. De groep van de Enterobacteriaceae scoort op 1 monster na, alle onder 1.000 bacteriën/ ml. De *E. coli*-bacteriën zijn als deelverzameling uiteraard nog minder aanwezig: 79% van de melkmonsters bevat helemaal geen *E. coli*, 88% ligt onder de 10 en alle monsters bevatten minder dan 100 bacteriën/ ml *E. coli*. STEC als onderdeel van de *E. coli* wordt in geen van de monsters gevonden; alle individuele koemelkmonsters testen negatief voor STEC. Van dezelfde individuele koeien werd ook een mestmonster (rectaal) genomen. Stx-genen werden in 27% van de mestmonsters gevonden. Niet getest is STEC in het melkfilter. Stellig was hier met behulp van een PCR-test STEC gevonden.

Het voorbeeld laat zien, dat ondanks het feit, dat er stx-genen en ook eae-genen zijn gevonden in de mest van koeien, door hygiënische maatregelen rondom het melken en het volgen van protocollen op dit Vorzugsmilch-bedrijf, er geen STEC in de melk zelf beland (niet aantoonbaar in 25 ml rauwe melk).

Notabene: hetzelfde gold ook voor andere onderzochte zoonotische bacterien (*Listeria monocytogenes*, *Campylobacter spp.*, en *Salmonella enterica*) in de melk. In slechts 1 mestmonster werd *Listeria* aangetroffen, alle melkmonsters waren negatief voor deze bacterie-groepen.



Figuur 7. Het aandeel van de melkmonsters van individuele koeien onder een oplopende kiemgetalgrenswaarde: mesofiele kiemen, Enterobacteriaceae, E. coli en STEC. Melkkoeien waren afkomstig van een Duits Vorzugsmilch-bedrijf, dat op legale wijze rauwe melk naar eindconsumenten en winkels mag leveren (bron: ongepubliceerde eigen data).

Handhaving Duitse Vorzugsmilch – hoe Duitsland decennialang rauwe melk drinkt

Rauwe melk, rauwmelkse kefir en rauwmelkse boerenkaas hebben qua zoonose-risico allemaal verschillende profielen. De consumptie van rauwe melk kan nog gevoeliger liggen, dan de consumptie van Goudse boerenkaas. Er is immers geen sprake van rijping van een product. Duitse Vorzugsmilch is een rauwe, verpakte consumptiemelk, die streng wordt gecontroleerd en in winkels verkocht wordt. De praktische handhaving is een goed voorbeeld, hoe op een zo veilig mogelijk manier rauwe melk kan worden geproduceerd, ook als die later tot boerenkaas wordt verwerkt.

Tabel 2. Controle van Duitse Vorzugsmilch (1x per maand). Uit: Tier Lebensmittel-Hygiene Verordnung (Gesetze im Internet, geraadpleegd 15 nov 2023).

Onderzoek	Parameter	Streefwaarde (m)/ Bovengrens (M)	Doel
Fosfatase-activiteit	Alkaline fosfatase	Positief	Fraude
Meting temperatuur	Temperatuur	< 8°C	Procescontrole
Zuurtegraad	pH-waarde	6,81	Procescontrole
Kiemgetal	Aerobe kiemen	20.000 (50.000) bacteriën/ ml	Hygiëne
Kiemgetal	Enterobacteriaceae	10 (100) bacteriën/ ml	Hygiëne
Onderzocht in 0,1 ml	<i>Streptococcus agalactiae</i>	Negatief	Uiergezondheid
Kiemgetal	<i>Staphylococcus aureus</i>	10 (100) bacteriën/ ml	Uiergezondheid
Celgetal in melk	Celgetal	200.000 (300.000) cellen/ ml	Uiergezondheid
In 25 ml melk	<i>Salmonella enterica</i>	Negatief	Zoonose
In 1 ml melk	<i>Listeria monocytogenes</i>	Negatief	Zoonose
In 25 ml melk	<i>Campylobacter spp.</i>	Negatief	Zoonose
In 25 ml melk met PCR	VTEC/ STEC	Negatief	Zoonose

Duitsland is het laatste land in Europa dat zo'n wetgeving kent. Er zijn duidelijke spelregels opgesteld om de melk te kunnen leveren. De uitvoering is in handen van de lokale

dierenartsen, die maandelijks de veestapel controleren qua gezondheid. Daarnaast ben je verplicht om eens per maand een afgevulde fles melk in een laboratorium af te leveren. Men heeft verschillende clusters van bepalingen opgenomen om uit te vinden of het product consumptiewaardig is (tabel 2).

Bij aankomst in het lab wordt als eerste de temperatuur gemeten en de pH vastgesteld als maat voor de procescontrole. Ten tweede de hygiëne. Hiertoe wordt het mesofiele kiemgetal en de hoeveelheid Enterobacteriaceae bepaald. Ten derde de uiergezondheid; om uierontsteking te beteugelen wordt het celgetal gemeten en altijd de hoeveelheid *Staphylococcus aureus* gemeten, in sommige gevallen ook *Streptococcus agalactiae*. Voor alle metingen geldt een bepaald bereik, en vooral een maximale waarde (M) die niet mag worden overschreden. Tenslotte de ziekteverwekkers; zoonotische bacteriën moeten afwezig zijn in 25 gram product en daartoe worden vier soorten bacteriën gemeten: STEC, *Campylobacter spp.*, *Salmonella enterica* en *Listeria monocytogenes*. Voor de zoonoses geldt een nul-tolerantie.

Andere landen hanteren vergelijkbare controles van rauwe melk bedoeld voor directe consumptie. In de VS zijn er staten waar de handel in rauwe melk volledig geliberaliseerd is. Bedrijven hanteren dikwijls een test-and-hold-systeem, waarbij men met behulp van 24-uurs sneltests bepaald, hoeveel *E. coli* er in de rauwe melk gevonden is. Wanneer dit nul of zeer laag is, wordt de partij melk vrijgegeven (zie bijlage 13).

Voor zowel de rauwe Vorzugsmilch in Duitsland als wat betreft de gecontroleerde melk in de VS geldt, dat de overheid over een lange reeks van jaren (vrijwel) geen enkel ziektegeval kan aantonen in verbinding met de consumptie van dit type melk. Melk dat met zorg is gemolken en wordt vrijgegeven voor consumptie (Berge et al., 2020). Dat is de maatschappelijke realiteit.

Maken te strenge normen productie Vorzugsmilch 'onmogelijk'?

In de jaren 1970 waren er alleen al rondom de stad Bremen meer dan 10 Vorzugsmilch-bedrijven aanwezig. Vanuit alle randen van de stad werd de rauwe melk succesvol naar huishoudens, ouden-van-dagen-instellingen en ook scholen gebracht. Tot het moment, dat STEC voor het eerst in vlees werd gevonden, en gemakshalve ook alle rauwe melk in een pennenstreek tot een potentieel gevaarlijk levensmiddel werd gemaakt. Enkele jaren later heeft de overheid vanuit 'veiligheidsoverwegingen' tal van normen met een \log_{10} waarde verlaagd (hygiëne, uierontsteking). In plaats van maximaal 100 Enterobacteriaceae was nu alleen nog melk met minder dan 10 Entero's per ml 'veilig'. In 2015 waren er in heel Duitsland nog slechts 13 bedrijven over die het nog waagden Vorzugsmilch te produceren, anno 2023 zijn nog een handvol diehards over, die doorgaan. Vaak zijn het bio- en BD-bedrijven die overtuigd zijn van het nut van rauwe melk.

In al die tijd is er geen sprake van uitbraken door STEC of een van de andere zoonoses door Vorzugsmilch-consumptie (uitzondering: *Listeria*). De Duitse overheid heeft door haar restrictieve beleid deze sector langzaam de nek omgedraaid, door normen scherper te stellen en nieuwe bedrijven die wilden starten met de levering van Vorzugsmilch geen licentie te geven.

5. Conclusies en aanbevelingen

De kaaswereld verandert net zoals de zoonoses die de kaas begeleiden. Wat vroeger nog gewone praktijk was, kan tegenwoordig voor problemen zorgen. Net als in de rest van de melkveehouderij wordt melk en kaas geproduceerd op steeds grotere bedrijven van koeien die steeds meer melk produceren. Toch is een voedselbesmetting als gevolg van STEC veel geringer in vergelijking met die door Salmonella of Campylobacter (in de EU respectievelijk 6, 60 en 128 gevallen per 100.000 inwoners). Daar staat echter tegenover, dat de aantallen HUS/ STEC patiënten geleidelijk aan toenemen.

STEC is een voorbeeld van ongewenste *Escherichia coli* bacteriestammen, die sinds de jaren 1980 een opgave stellen aan de producenten. Er kleven risico's aan STEC-infecties, die de discussie lastig maken: het betreft dikwijls jonge kinderen (< 5 jaar), de infectieuze dosis van STEC is (zeer) laag en er is sprake van voortdurende verandering van het STEC-genoom (nieuwe infectieuze stammen). Dit maakt de overheid en controle instanties huiverig, waardoor men wellicht rigoureuze maatregelen neemt, dan strikt op basis van een goed risico-inschatting noodzakelijk is.

In principe gaat het bij STEC om genetische kenmerken die nodig zijn om gevaarlijk (ziekmakend, zelfs dodelijk) te worden: (1) de productie van het gif shigatoxine en (2) de mogelijkheid tot aanhechting in een darmkanaal. Door de voortdurende mutaties zijn er inmiddels vele STEC-stammen/ typen met vergelijkbaar gevaar. Wanneer men de gen-combinaties van STEC in patiënten met bloederige diarree en HUS onder de loep neemt, dan levert het gen *stx*₂ en bepaalde sub-varianten de meeste problemen op, in combinatie met aanhechtingsgenen.

De bedrijfsmaatregelen om STEC in kaasmelk voor te zijn, concentreren zich op: sterk verhoogde melk- en stalhygiëne, droge ligbedden en het vermijden van stress. Jongvee kan de meeste STEC uitscheiden, maar ook nieuwmelkse koeien en vooral vaarzen.

Algemene regels, dat kaas minstens 60 dagen gerijpt moet zijn, om geen gevaar te herbergen, kloppen niet altijd. Het maken van een veilige Goudse boerenkaas is mogelijk, maar vraagt kennis en aandacht, en is door een opeenstapeling van preventieve maatregelen in combinatie met een geregelde controle van de kaasmelk en het volgen van een HACCP. Duidelijk is dat wanneer men af wil zien van thermisatie of pasteurisatie de aantallen *E. coli* en derhalve ook STEC zeer laag moeten zijn in de kaasmelk. Het sturen op zeer lage *E. coli* aantallen in de kaasmelk zelf (< 10 bacteriën/ ml) is een belangrijke maatregel om STEC in het eindproduct te voorkomen.

STEC-bepaling in melk en kaas met behulp van de PCR-test is een kwalitatieve methode. Het beantwoordt een vondst, geen concentratie aan STEC. Om echter een uitspraak te doen over het risico voor de volksgezondheid is verder onderzoek noodzakelijk. Duidelijk moet worden welke concentraties aan STEC in geconsumeerde kaas daadwerkelijk risico's voor de volksgezondheid opleveren. Verder moet er onderzoek worden gedaan of en hoe vaak rauwmelkse boerenkaas (onderscheid naar type kaas) in verband te brengen is met ziektegevallen of dood door EHEC.

6. Bijlagen

Bijlage 1. Een STEC-uitbraak wordt altijd breed uitgemeten

Een uitbraak is gedefinieerd als een STEC-vondst, waarbij meer dan 1 persoon betroffen is. Elke uitbraak krijgt veel media-aandacht. Er is angst, wat begrijpelijk is, maar men moet altijd een uitbraak in perspectief zien, zoals de omvang van het aantal getroffen personen tegenover de hoeveelheid product wat geconsumeerd is (geweest). In elk productieproces kunnen uitschieters voorkomen, wat niet altijd hoeft te betekenen, dat er altijd gevaar is.

Bij een uitbraak van STEC O157 in Canada (Boyd et al. 2021) gaat het om een rauwmelkse kaas naar Goudse recept. Zeven volwassenen werden ziek, geen van hen belandde in het ziekenhuis. Hoe het ziek-zijn gedefinieerd is, blijft onduidelijk. Zowel in Canada als in de VS geldt/ gold nog steeds een regel, dat Goudse kaas gemaakt van rauwe melk en die meer dan 60 dagen gerijpt was, veilig voor consumptie is (Engstrom et al., 2021). Het hele bedrijf werd binnenste buiten gekeerd en vele monsters werden genomen. Op basis van de interviews kwam de consumptie van rauwmelkse kruidenkaas ('spicy cheese') van een kleine melkverwerker (45 melkkoeien) van datum 31 maart aan het licht. Deze kaas kon worden bemonsterd en testte positief voor stx_2 en bleek serotype O121 te zijn. Dit serotype kwam (nauw) overeen met monsters van patiënten. Andere kazen van latere datum van het bedrijf bevatten stx_1 , maar deze konden niet uitgroeien op een kweekplaat. Omgevingsmonsters ($n=11$) waaronder de melkfilters en de rauwe melk zelf, andere kaas en andere kaassoorten van het bedrijf ($n=36$) testen negatief. Alle kruidenkazen van dit type werden vastgehouden, zo goed mogelijk teruggeroepen en uiteindelijk vernietigd.

In de discussie geven de auteurs in een bijzin aan, dat de uitbraak door kaasconsumptie ontstaan is door de besmetting van de rauwe melk. De partij kaas van 31 maart was overigens de enige positieve batch die men gevonden heeft, alle andere monsters waren negatief. Ook de 2 andere batches (waar stx_1 werd gevonden), wordt in het rapport aangehaald als 'kaas die STEC bevatte'. Strikt genomen klopt dit niet, je kunt alleen zeggen dat er een verdacht is op STEC, maar er was geen uitgroei en ook geen koppeling aan een serotype mogelijk. Behalve dat de onderzoekers erop ingaan, dat dit het 4^e Canadese geval is waarin meer dan 60 dagen oude Goudse rauwmelkse kaas betrokken is, is de producent ertoe overgegaan om zijn kaasmelk vooraf te pasteuriseren. De onderzoekers pleiten voor tenminste een thermisatie-stap van de rauwe melk, opdat een $5\log_{10}$ reductie van *E. coli* kan plaatsvinden (zie ook Engstrom et al., 2021; Silva et al., 2023). Gek genoeg geven de onderzoekers onder het kopje 'beperkingen van de studie' aan, dat ze geen info hebben of de gevonden stam O121 ook daadwerkelijk in de rauwe melk of in/ op de koeien gevonden is.

Bijlage 2. Virulentiedatabase STEC-verwanten

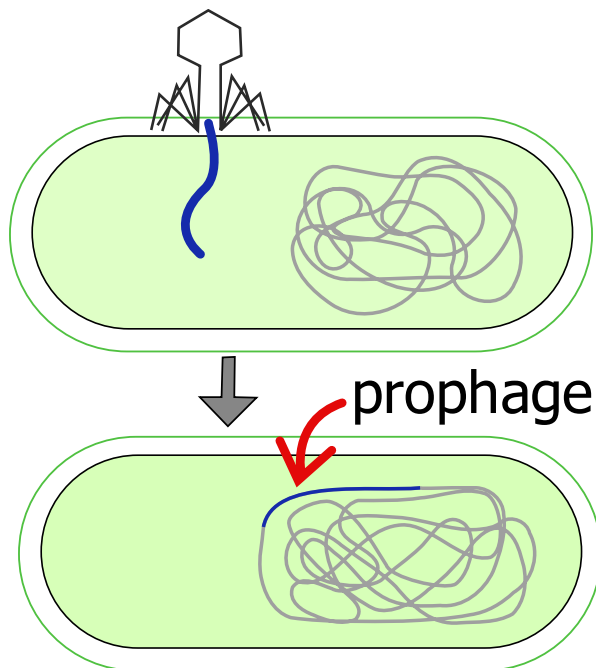
Tabel 3. Patho-typen en benaming van *Escherichia coli* op basis van virulentie-eigenschappen, afkomstig uit de virulentie database (Uit: Carter et al., 2022)

Afkorting	Engelse naam	Karakteristiek
AIEC	Adherent Invasive <i>E. coli</i>	Aanhechting
APEC	Avian Pathogenic <i>E. coli</i>	Vogels
EAEC	Enteraggregative <i>E. coli</i>	Aanhechting darm
STEC	Shigatoxin producing <i>E. coli</i>	Gifstoffen
EHEC	Enterohaemorrhagic <i>E. coli</i>	HUS
EPEC	Enteropathogenic <i>E. coli</i>	Diarree
ETEC	Enterotoxigenic <i>E. coli</i>	Gifstoffen
NMEC	Neonatal Meningitis-associated <i>E. coli</i>	Hersenvliesontsteking
UEC	Uropathogenic <i>E. coli</i>	Blaas, urinewegen

Er bestaat een virulentie-database, waarin genetische eigenschappen van *E. coli* worden beschreven en waarin meer dan 30 verschillende pathogene *E. coli* typen (patho-typen) zijn genoemd (tabel 3), (Carter et al., 2022).

Bijlage 3. Evolutie *E. Coli*

Bacteriën staan voortdurend onder druk van verandering, zij muteren en passen zich aan. Wanneer je de afstamming van *E. coli* bekijkt, is er sprake van bacterielijnen, succesvolle mutanten die zich hebben kunnen handhaven en die hun omgeving koloniseren. Het (hoge) antibioticagebruik in mens en dier draagt ook bij aan de voortdurende mutatie en selectie van *E. coli*. Het succes van *E. coli* om zich zowel als commensaal en als pathogeen te manifesteren schrijft men toe aan de plasticiteit van haar genoom, dat vele genen omvat (Horesh et al., 2021). Het pan-genoom van *E. coli* beschrijft alle variëteit, mutaties en allelen binnen de *E. coli*-lijnen. *E. coli* functioneert wereldwijd als pool om bepaalde, ook ongewenste eigenschappen (genen) te verspreiden (Cobo-Simón et al., 2023). Merkwaardigerwijze worden de pathogene kenmerken zoals stx, in het *E. coli* genoom ingebracht door bacteriofagen (= virussen die bacteriën infecteren), (Rodríguez-Rubio et al., 2021), opdat het vervolgens in het bacterie DNA wordt opgenomen, vermenigvuldigd en doorgegeven aan het nageslacht. Dit laatste noemt men verticale gen-overdracht. Het proces van inbouw van faag-DNA in bacterie-DNA is bekend als horizontale gen-overdracht: stx-genen worden door fagen in bacteriën ingebracht (Figuur 8). Niet alleen wordt uitgewisseld tussen fagen en *E. coli* of tussen verschillende *E. coli* types, maar ook bijvoorbeeld met de nauw verwante *Shigella dysenteriae* bacterie. Dysenterie is een ernstige vorm van diarree. Door het opnemen van nieuwe virulentie-eigenschappen wordt *E. coli* een pathogeen of door het overnemen van resistentie genen wordt *E. coli* resistent tegen bepaalde antibiotica.



Figuur 8. Een bacteriofaag brengt DNA in een bacterie. Wanneer dit DNA, genoemd de profaag, wordt geïntegreerd en verder gegeven aan het nageslacht, dan veranderen de eigenschappen van de bacterie (bron: wikipedia).

Veelal wordt door de WHO en FAO gekozen voor de genetische kenmerken van STEC. Daarbij gaat het om een ja/ nee verhaal: draagt een STEC een bepaald kenmerk of niet en is er sprake van een correlatie met een bepaald ziektebeeld? Het gaat daarbij om 'verhoogde kansen', 'verhoogd risico' en een 'potentieel gevaar'. Er zijn momenteel naar schatting 470 verschillende stammen van STEC bekend en naar schatting 60 tot 100 hiervan kunnen een potentieel gevaar vormen (EFSA, 2020). De FAO/WHO expert groep rondom STEC (FAO/WHO STEC Expert Group, 2019), komt tot een inschatting van risiconiveaus (1-5; hoog tot laag), wanneer bepaalde stx-genen in combinatie met aanhechtingsgenen worden gevonden in levensmiddelen.

Bijlage 4. PCR-techniek vindt delen van een dode of levende bacterie

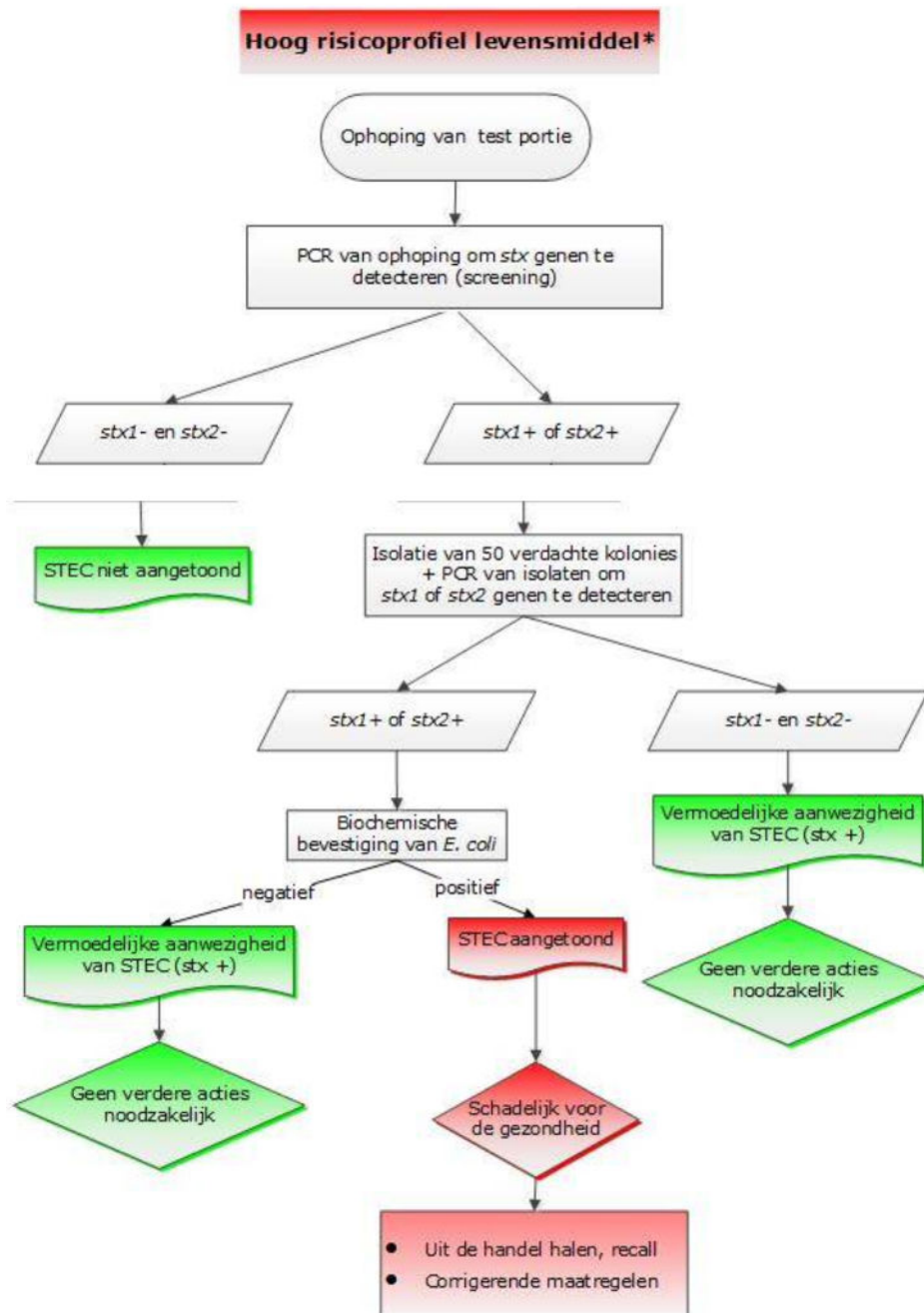
PCR staat voor 'polymerase chain reaction', een laboratoriumtechniek om bacterie DNA of specifieke genen stapsgewijs te vermenigvuldigen, opdat men kan aantonen, dat een bepaald stuk bacterie- of virus-DNA aanwezig is. Zo'n uniek stukje van het DNA wordt gebruikt als marker. Als voorbeeld: in 20 vermenigvuldigingen ga je van 2 kopieën van het DNA naar 2 miljoen kopieën. Men noemt dit 'opwerken' of 'ophoping' van het specifieke stuk DNA (Eng.: amplification).

Aangezien STEC al in zeer lage concentraties tot problemen kan leiden, moet je de 'pakkans' verhogen: je vergroot je hoeveelheid monster (melk of kaas), je neemt meerdere monsters (herhaling van monstername) of je zoekt een plek op, waar zich veel bacteriemateriaal concentreert, zoals in de melkfilters. De langjarige ervaring met de real-time PCR-test biedt voldoende aanknopingspunten om te besluiten of er sprake is van een echte STEC-herkenning. Wanneer voor de opwerking (amplification) te veel cycli nodig zijn, wordt het monster als STEC-negatief beoordeeld.

Om van een echte, positieve uitslag in je kaas te kunnen spreken, is dus van groot belang te weten met welke meetmethode een laboratorium werkt, hoeveel opwerkingscycli men

hanteert, om uiteindelijk van een positieve uitslag te spreken. In de Europese ISO13136 norm is dit allemaal gereguleerd. Verbeterde PCR tests maken onderscheid tussen DNA afkomstig van dode (na hittebehandeling) of levende *E. coli* (Lehniger et al., 2021), maar zijn nog niet opgenomen in routine tests.

Bijlage 5. EU hanteert een en dezelfde methode voor STEC



Figuur 9. Afloop STEC-bepaling (overgenomen van NVWA).

Op de website van de NVWA staat informatie over STEC (<https://www.nvwa.nl/onderwerpen/e-coli-bacterien-stec-ehec/hoe-stec-in-levensmiddelen-voorkomen>).

Internationaal heeft men vastgelegd, hoe STEC in een laboratorium te meten is. De methode is beschreven als de ISO/TS 13136. In figuur 9 geeft de stappen weer die men volgt om STEC vast te stellen en te bepalen of een product van de markt verwijderd moet worden. Rauwmelkse boerenkaas is 'levensmiddel met een hoog risicoprofiel'. In stap 1 wordt de *E. coli* gekweekt ('ophoping') door 25 gram kaas of melk in een kweekvloeistof (bouillon) 24 uur te bebroeden. Uit de gefilterde vloeistof vindt via de PCR een screening plaats op specifieke genen (stx1, stx2 en eae). De PCR werkt met DNA-markers, die zich heel specifiek koppelen aan stukjes van het bacterie-DNA.

Specificiteit en sensitiviteit

Sensitiviteit is de gevoeligheid van een test in de diagnostiek, dat wil zeggen hoe goed de test erin slaagt het verschijnsel aan te tonen waarop getest wordt. Specificiteit bepaalt hoe specifiek de test is, dat wil zeggen hoe goed de test erin slaagt de afwezigheid van het verschijnsel aan te tonen. De sensitiviteit en de specificiteit worden beide uitgedrukt als fractie, of in procenten, bijvoorbeeld 0,9 of 90%.

De sensitiviteit van een methode zegt iets over de kans op vals-negatieve uitslagen, terwijl de specificiteit aangeeft op er vals-positieve uitslagen zijn. Elke meetmethode wil de kans op vals-negatieve en vals-positieve uitslagen minimaliseren. Vals-negatief betekent dat je STEC-uitslagen mist (die er wel zijn), wat een potentieel gevaar is voor de volksgezondheid, terwijl vals-positief betekent dat je monsters onterecht als STEC betitelt, terwijl er geen gevaar uit voortvloeit.

Fouten kunnen zowel passeren bij het gebruik van kweekplaten als bij de PCR. Elke meetmethode heeft zijn beperkingen, en daarom is validatie van een methode in combinatie met het vergelijken van uitslagen door verschillende methoden van belang. De PCR-techniek krijgt de voorkeur boven de traditionele kweekplaten, vooral door zijn grotere sensitiviteit, met andere woorden er worden meer STEC-bacteriën gevonden. Verder geeft de PCR een veel snellere monsteruitslag en kan men het proces van opwerken en uitwerken sterk automatiseren. Op kweekplaten is men naast vaststelling van een bepaalde bacterie, uit op kwantificering, aangezien men kolonies op de agar-plaat telt. Kweekplaten hebben een lagere sensitiviteit dan de PCR, echter de kans op een vals-positieve is hier weer laag. Technisch is het mogelijk om in een monster tegelijkertijd meerdere genen via de PCR te bepalen. Meerdere genen die men in dezelfde run bepaalt, betekent een grotere specificiteit, een betere herkenning van specifieke genetische kenmerken van een STEC-bacterie.

Bijlage 6. Pasteurisatie is ook niet heilig

Hoewel altijd gepropageerd wordt, dat pasteurisatie de oplossing is voor het zoonose-probleem, zijn er ook tal van uitbraken gekoppeld aan gepasteuriseerde melk. Ook bij pasteurisatie staat of valt het met controle (her- of nabesmetting) en naleven van verdere hygiënenormen en veiligheidsrichtlijnen. Voor de VS plus Canada beoordeelden Sebastianski et al., (2022) de verschillen in ziekte, ziekenhuisopname en sterfte tussen gepasteuriseerde en ongepasteuriseerde consumptie van zuivelproducten in de periode 2007 - 2020. Er zijn 32 uitbraken gekoppeld aan zuivel, 20 door rauwmelkse, 12 door gepasteuriseerde zuivel; er zijn 449 zieken, 124 opnames in het ziekenhuis en 5 doden na rauwmelkse zuivel, echter ook 174 zieken, 134 opnames in het ziekenhuis en 17 doden plus 7 spontane abortussen na

gepasteuriseerde zuivel. Bij de gepasteuriseerde zuivel was in 10 van de 12 uitbraken sprake van een Listeria-besmetting.

Door de veel hogere consumptie van gepasteuriseerde zuivel in vergelijking met rauwmelkse zuivel is het kwantitatieve risico van gepasteuriseerde zuivel uiteraard veel kleiner dan voor rauwmelkse zuivel. Wat echter opvallend is, is dat een nul-risico niet bestaat, ook niet wanneer melk gepasteuriseerd is. Bovendien is het veel moeilijker om de uitbraak van een levensmiddel dat velen consumeren (gepasteuriseerde melkproducten) te herleiden tot de bron, dan iets als rauwe melk en boerenkaas, dat door veel minder wordt geconsumeerd. Hierdoor ontstaat zogenaamde ‘opsporings-bias’ ten nadele van rauwmelkse producten, wat zich weerspiegelt in de literatuur.

Bijlage 7. STEC en weidegang

Weidegang wordt vaak genoemd als periode met verhoogde STEC-uitscheiding. Onderzoek op twee Nieuw-Zeelandse bedrijven, waar de melkkoeien vrijwel altijd buiten zijn en een lang weideseizoen kennen, laat zien dat STEC alom vertegenwoordigd is (Rapp et al., 2021): *“De plekken waar overal STEC werd aangetoond geven aan, dat koeien waarschijnlijk bacteriën met STEC-virulentiefactoren binnenkrijgen via weiland, grond, drinkwater op recent begraasde weilanden of strooisel van buiten de weide.”* De grasopname is hoog en minstens 89% van de droge stofopname bestaat uit vers gras. Evenals besmetting van sla, spinazie en andere bladgroente door koemest of opspattend water, wordt ook weidegras besmet. Overigens ook in Ierland, als Europees weideland bij uitstek, is de STEC-besmetting in melk en vleesvee hoog en navenant heeft Ierland de hoogste STEC-incidentie binnen Europa (Brehony et al., 2018), ongeveer het 10-voudige als het EU-gemiddelde. Voor Ierland is de dichtheid aan rundvee blijkt een significante voorspeller te zijn voor het aantal STEC-patiënten binnen een regio, met O157 en O26 als koplopers. Verder Iers onderzoek laat zien, dat ook zoet water (meren en rivieren) en zelfs zeewater besmet is met STEC (O’Connor, 2021), respectievelijk in 78% en 57% van de genomen recreatieve watermonsters. Het stimuleren van weidegang staat hoog in het vaandel vanuit het oogpunt van dierwelzijn, traditie en energiegebruik. Verder is er op kleinschalige bedrijven de tendens om meerdere diersoorten te houden. Naast melkkoeien kan het zijn, dat ook varkens (verwerken wei), of kippen worden buitengehouden, soms in dezelfde weide. Traditioneel werd in de typische weideregio’s in Nederland naast melkvee ook schapen gehouden. Een andere tendens is het gebruik van natuurgebieden, waar veelal jongvee de zomer door weidt. Hier is een grotere contactmogelijkheid van allerlei wild (ree, hert), zowel herkauwers als ook vogels en insecten (vliegen).

Bijlage 8. STEC-uitscheiders onder vee

Het STECAMONT-project, geleid van 2015 tot 2018 door het Institut de l’Elevage (Frankrijk) heeft via praktijkonderzoek STEC op melkveebedrijven geanalyseerd. Op een bedrijf kunnen STEC-stammen circuleren door een circuit van fecale besmetting. Dit betekent, dat als de monsters van verschillende plekken worden vergeleken, er binnen een bedrijf een overeenkomst van STEC-stammen geïsoleerd uit uitwerpselen, strooisel en uieroppervlakte. Kortom er treedt ‘versmering’ plaats.

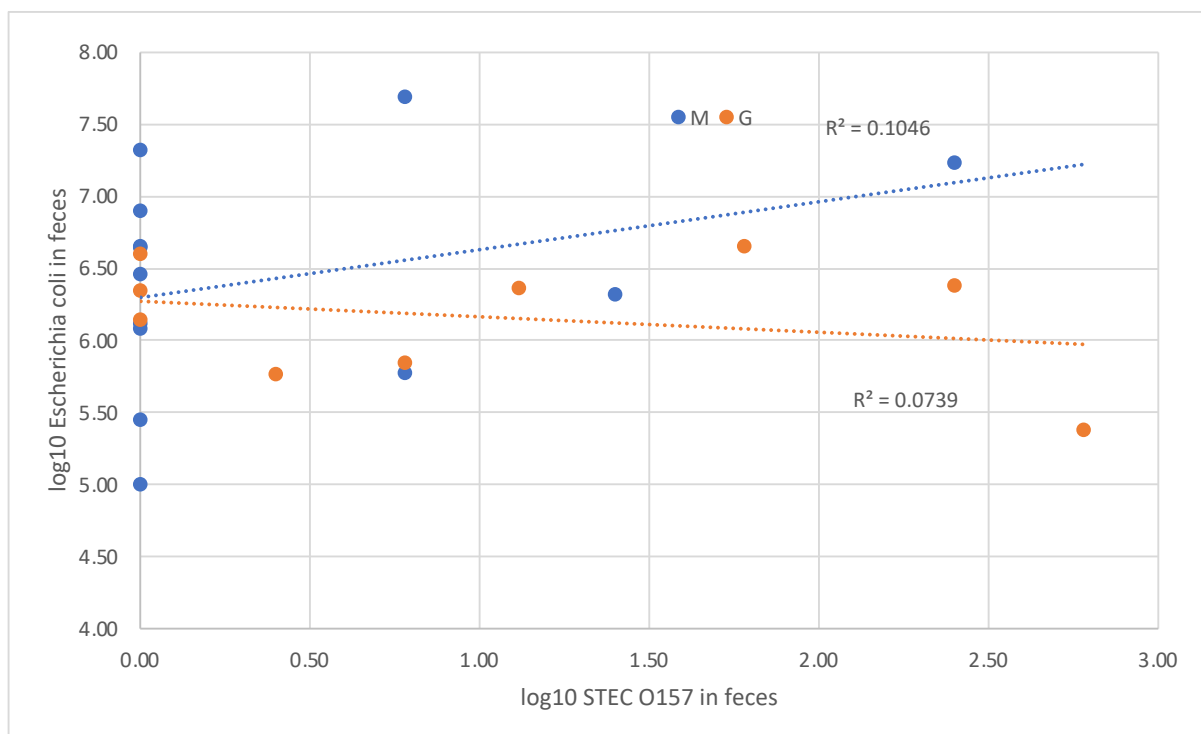
Er is vaak sprake van intermitterende en vaak incidentele besmetting van melk op de bedrijven en monsters genomen op dezelfde dag waren vaker positief voor de melkfilters.

Gezonde dieren kunnen dragers zijn van STEC. Sommige onderzoekers gaan ervan uit, dat het STEC-probleem zich laat oplossen, als men de STEC-uitscheiding op de individuele bedrijven in zijn greep krijgt (Widgren et al., 2018).

Uitscheiders zijn niet altijd gemakkelijk te vinden, omdat de STEC-uitscheiding een grillig verloop kan hebben en bovendien slechts alleen in een korte periode plaatsvindt.

Men richt zich als eerste op die dieren die overmatig veel STEC uitscheiden, de 'super-shedders' of de 'super-spreaders'. Wanneer men meer dan 10^4 bacteriën/ g feces vindt, spreekt men van een super-shedder; zij scheiden 100 - 1.000x meer STEC uit dan gemiddeld. Doel is echter om het gemiddelde niveau aan STEC in de feces terug te dringen, en te voorkomen dat er sprake is van een persistente eigen herbesmetting (Tamminen et al., 2020). Dus, kleine aantallen super-shedders in een kudde kunnen telkens een groot deel van de rest van de kudde besmetten. Of super-shedders ook werkelijk super-spreaders worden hangt van tal van bedrijfsfactoren af.

Dierwelzijn vormt een dilemma, als het om het terugdringen van STEC gaat. Onderling contact tussen kalveren, dieren van verschillende leeftijden of koe-kalf-betrekkingen zijn vanuit welzijnsoogpunt wenselijk, maar het lijkt juist, dat lik-contact tussen dieren bijdraagt aan de verspreiding van STEC in een kudde (Tamminen et al., 2020).



Figuur 10. Relatie op twee bedrijven (M en G) in feces van jonge mest-stieren tussen STEC O157 en totaal *E. coli* (afgeleid van data van Bibbal et al., 2022).

Om kenmerken van bedrijven met super-shedders te identificeren en om de super-shedders beter te begrijpen werd in Frankrijk onderzoek gedaan onder stierkalveren. Van 13 bedrijven werden er 2 geïdentificeerd als bedrijven met een constante verhoging in STEC O157. Binnen deze bedrijven werden altijd besmettelijke stierkalveren gevonden, niet de moederdieren. Echter voor 60% van de dieren die STEC uitscheidten, waren de aantallen in hun feces laag (<10 bacteriën/ g) en slechts één dier gold als super-shedder. Er was geen verband tussen de totale *E. coli* aantallen in feces en de STEC-aantallen (Bibbal et al., 2022). Stieren met de

hoogste STEC O157 aantallen (rechts in de grafiek, figuur 10) behoorden zelfs tot de laagste *E. coli* waarden, en ook de spreiding in *E. coli* bij dieren die onder de detectiegrens vielen (= \log_{10} STEC = 0), is groot. Zulke onduidelijke uitslagen geven aan, dat er andere factoren zijn, die men niet heeft kunnen meten, en die van invloed zijn op het gebrek aan correlatie. STEC-uitscheiders hebben vaak een iets andere darm-samenstelling, met name de *Fermitutes* groep is verhoogd, daarbinnen de *Clostridia*, waar de familie van de *Ruminococcaceae* onder vallen. Het duiden van de verschillen is echter ingewikkeld (Vasco et al., 2021). De verschillen in taxa valt samen met verschillen in rantsoen. Gek genoeg misschien, hebben bedrijven met verhoogde STEC-uitscheiders een rantsoen met juist veel ruwvoer (80-100%) en zonder inzet van ontwormingsmiddelen. In samenhang daarmee was het darmkanaal eerder rijker qua bacteriesoorten (hogere alfa-diversiteit). Men tast nog in het duister, waarom een jong dier STEC-uitscheider wordt. Om dit te simuleren werd in een muizenmodel naast STEC O157 tegelijkertijd 18 andere commensale stammen van *E. coli* gegeven. Het blijkt, dat door aanwezigheid van deze diversiteit aan commensalen, STEC O157 op een veel lager niveau wordt gevonden in de muis (Lange et al., 2023).

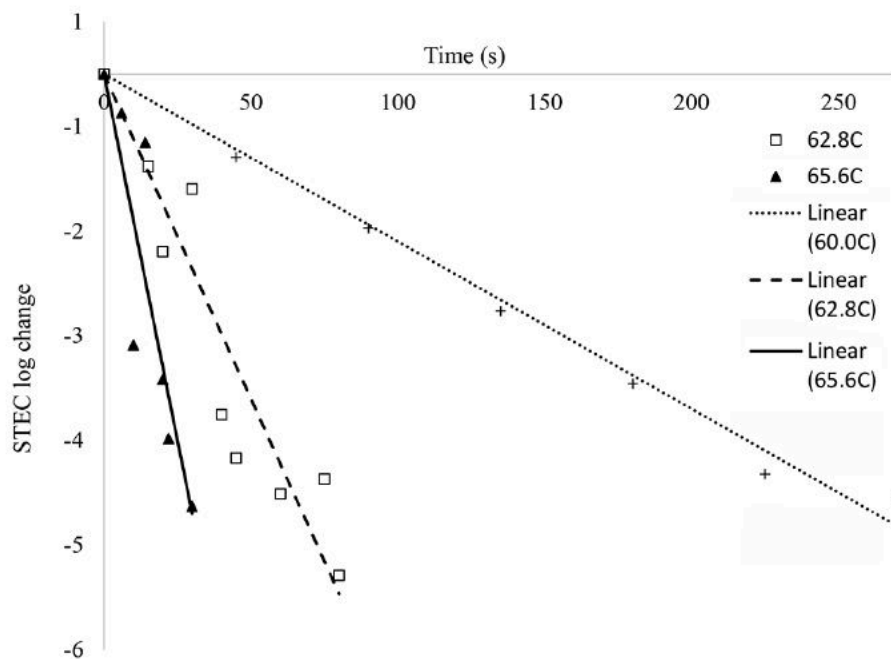
Bijlage 9. STEC-uitscheiders onder mensen

Wanneer mensen (ook kaasmakers) besmet raken, kunnen ook zij STEC verspreiden. Niet alleen de melk en het vlees, maar ook het contact met landbouwhuisdieren kan een bron van besmetting. In een Amerikaanse studie noemde 52% van de HUS-patiënten, dat er (recent) contact is geweest met boerderijdieren (Vachon et al., 2020).

In Canada is het onder medewerkers van kinderdagverblijven verplicht, om je als volwassene 'vrij te testen', wanneer er STEC bij diarree is gevonden. Het blijkt, dat volwassenen er gemiddeld 18 dagen over doen om STEC-negatief te worden, een tijdsduur die overeenkomt met de uitbraak van STEC O104 in Hamburg in 2011 (Bording-Jorgensen et al., 2020). Ook STEC O26 is bekend als vector bij mens-tot-mens overdracht in kinderdagverblijven (versmering). Deze O26 draagt het *stx*₂ gen en is bekend als virulente stam (Scavia et al., 2018).

Bijlage 10. Thermisatie kaasmelk reduceert STEC

Hoewel het voor sommige lijkt op het vloeken in de kerk, voor anderen kan (tijdelijke) thermisatie een oplossing bieden om de twijfel bij de consument en handel weg te nemen. Thermisatie combineert een positieve fosfatase-test en biedt daarmee geen onderscheid met werkelijke rauwe melk, die niet boven de 40°C verhit is geweest. Door thermisatie is er sprake van een 'gevoelige tik' voor de niet-welkome zoonoses, waaronder *Listeria* en STEC van 3 tot 4 \log_{10} . Aangezien STEC hittegevoeliger is dan *Listeria* wordt voor STEC een nog wat grotere reductie van levende bacteriën verwacht.



Figuur 11. \log_{10} reductie in STEC bij thermisatie op 60,0; 62,8 en 65,6 °C (overgenomen uit: Engstrom et al., 2021).

Thermisatie wordt uitgevoerd tussen 50°C en 70°C en hoe hoger de temperatuur, hoe korter de benodigde tijd is om een bepaalde reductie te behalen. Net als bij pasteurisatie is ook het effect van thermisatie een resultaat van tijd x temperatuur (figuur 11). Hoe lager de temperatuur (zie figuur 12 bij 60°C), hoe vlakker de lijn. Om een \log_{10} reductie van 3 te behalen (lees: 10.000 bacteriën/ ml minder), heb je respectievelijk ca 160 sec, 40 sec of 20 seconden nodig. Om de veiligheid van kaas te verbeteren hanteert de Canadese overheid een minimale $3\log_{10}$ reductie als thermisatie-effect in kaasmelk voor 'ongepasteuriseerde kaas'. Ter vergelijking echte pasteurisatie (fosfatase negatief) is een $T \times T$ van 71,5°C gedurende 15 seconden. Thermisatie heeft een beperkte impact op de kaaseigenschappen van rauwmelkse kaas, zoals caseïne verandering en smaak. Enzymen die mede de smaak bepalen, zijn minder gedeactiveerd als bij hogere temperaturen (Silva et al., 2023).

Bijlage 11. Hoe diep avondmelk koelen?

Vroeger werd 2x daags Goude boerenkaas gemaakt, in houten tobbes en zonder zuursel. Er werd alleen lebstremsel gebruikt. De houten tobbe wand fungeerde als bron van zuurselbacteriën. Daarna ontstond de dubbelwandige tobbe, waarin de tussenruimte benut werd om de melk te koelen of op te warmen. In plaats van 2x daags ging men over op 1x daags kaasmaken. In Nederland wordt de roestvrije stalen (RVS) tobbe gebruikt, in berggebieden eerder de koperen tobbe. RVS en koper verschillen in hun mogelijkheid om bacteriegroei af te remmen. Met de dubbelwandige tobbes, en het RVS deden ook gestandaardiseerde kaaszuursels hun intrede. De kaasmelk was als het ware 'te schoon' om nog spontaan vele Lactobacillen te kunnen leveren. Door de overgang van handmelken in emmers naar gesloten melkstallen en melkleidingen nam de besmettingskans van de melk nog verder af. Actieve zuursels werden de standaard voor het kaasmaken.

In de boeken over Goudse kaasmaking, maar ook in Zwitserse recepten voor harde kaas, wordt de avondmelk veelal gekoeld tussen de 8°C en 11°C, soms zelfs hoger. Deze 12-uurs

bewaartijd wordt gebruikt om de kaasmelk te laten rijpen. Koelen van de avondmelk wordt gedaan om de bacteriegroei stil te leggen, met name van de mesofiele Lactobacillen. In traditionele kaasgebieden, waar nog steeds rauwmelkse kaas fabrieksmatig wordt gemaakt, wil men de avondmelk niet onder de 12°C koelen, vanwege verliezen aan kaasopbrengst, stijging van de pH, de toename van spontane vetsplitsing smaakverandering (bitter). Te diep koelen (in de buurt van de 4°C) kost onnodig veel energie (koelen en opwarmen), geeft verandering in de melk, waardoor eiwitsplitsing optreedt en leidt tot ongewenste smaak. Te weinig koelen leidt ertoe, dat mesofiele bacteriën zich makkelijker kunnen vermenigvuldigen, de melk pH daalt al en het risico van vermeerdering van zoonotische bacteriën neemt toe.

Het Zwitserse Agroscope (Eugster et al., 2019) bekeek dezelfde vraag voor de harde rauwmelkse kaas die een belangrijk marktaandeel vormt in het land en concludeerde: *“Er kan worden gesteld dat het 's nachts bewaren van avondmelk bij 12-13°C de kwaliteit en veiligheid van 60 dagen gerijpte kazen niet in twijfel trekt, op voorwaarde dat het risico op besmetting met Listeria wordt aangepakt met gerichte beheersmaatregelen.”* Dit wordt bevestigd door andere onderzoeken in kaasmelk.

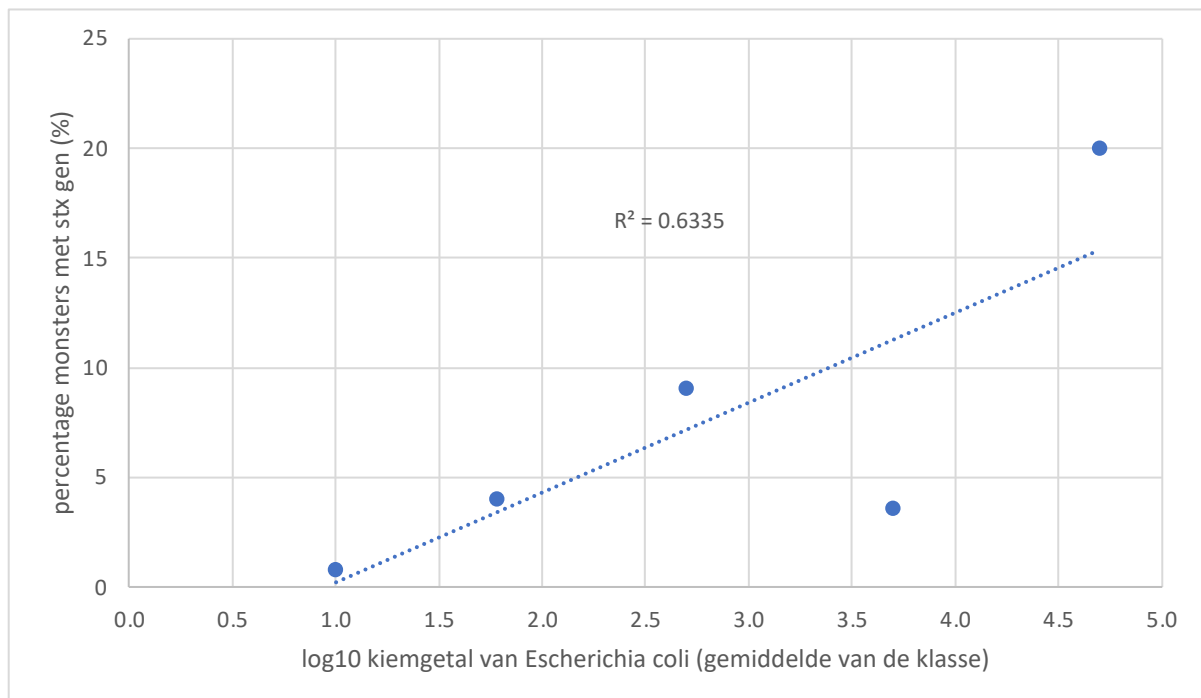
Bijlage 12. Andere handhaving en controle rauwe melk

Voor de consumptie van rauwe melk is het belangrijk, dat de melk (diep)gekoeld is, het liefste onder de 4°C. De grootste producent van rauwe melk, bedoeld voor verse consumptie, Raw Farm (voorheen: Organic Pastures) in California, zorgt ervoor, dat alle melk binnen een uur tijd na melken gekoeld is naar ongeveer 2°C. Naast de check of *E. coli* wordt de melk vervolgens verpakt en krijgt een houdbaarheidsdatum van maximaal 21 dagen. Dat is enorm en evenaart gepasteuriseerde en gefiltreerde melk. Recent Noors onderzoek bevestigt de impact van koeling (Idland et al., 2022). In rauwe melk gekoeld bij 4°C of 6°C neemt de hoeveelheid STEC eerder af in de eerste 24 uren van bewaren, om daarna constant te blijven in de volgende 48 uur, ondanks dat men zeer hoge hoeveelheden STEC had geïnoculeerd (3.000 - 5.000 bacteriën/ ml). Bewaard bij 8°C is er een licht stijgende tendens zichtbaar van het aantal STEC-kolonies. Dit wordt door andere studies bevestigd, die STEC-groei bij 5°C en 7°C (geen groei) vergeleken met 15°C (groei).

Een probleem voor de veiligheid van rauwe melk is datgene, wat de consument doet. Melk kan ongekoeld getransporteerd worden en rauwe melk wordt bewaard bij te hoge koelkasttemperatuur, dan wel blijft buiten de koelkast een paar uren op tafel staan. Dit is waarschijnlijk een van de redenen, waarom de Duitse wetgeving aan Vorzugsmilch een verkoopbeperking van 96 uur geven. De meeste bedrijven produceren dergelijke melk vanuit slechts een melkmaal. De rauwe melk wordt gekoeld afgevoerd en binnen 12 uur bij de consument of in de winkels afgeleverd. Een modelmatig overzicht van koeling, verpakking, transport en consumentengedrag op de uitgroei van *E. coli* en STEC bij lage temperaturen is beschreven in Feliciano et al., (2021). Een vraag, die bij de samenstelling van het model speelde, wat de effecten zijn in warmere regio's van Europa al dan niet met de toenemende stijging van de temperatuur in de zomer. De Franse hygiëneregels schrijven voor, dat rauwe melk voor consumptie niet meer dan $2\log_{10} = 100$ bacteriën *E. coli* mogen herbergen. Zelfs stellen de boeren die op markten rauwe melk verkopen de *E. coli*-grens nog scherper, slechts $1\log_{10} = 10$ bacteriën/ ml (Feliciano et al., 2021).

Bijlage 13. STEC in Engelse rauwmelkse kaas

Recent onderzoek in Engeland onder rauwmelkse kazen van allerlei soorten geeft aan, dat het merendeel van de kaas STEC-vrij is. In totaal was 10 van de 619 monsters positief, 1,6% (Willis et al., 2022). Tussen het \log_{10} *E. coli* kiemgetal en het percentage monsters in die groep met een *stx*-gen bestaat een correlatie (figuur 12). Dit verband moet je met enige voorzichtigheid interpreteren. Ten eerste gaat het om gemiddelde waarden van een groep, waardoor de werkelijke relatie per monster verloren gaat, en ten tweede zijn alle kaassoorten op een hoop geveegd. Toch is de waarschuwing duidelijk, namelijk een verhoogde *E. coli*-concentratie heeft een relatie met een verhoogd risico op STEC.



Figuur 12. Gemiddelde \log_{10} *E. coli*-kiemgetal per klasse en het aandeel monsters met een *stx*-vondst (afgeleid uit data van Willis et al., 2022).

Echter Cortimiglia et al., (2021) vinden veel hogere waarden in 75 (Italiaanse) half-harde rauwmelkse kazen met een prevalentie van 5,3%. Deze resultaten komen overeen met eerdere gegevens over andere rauwmelkse kazen, waarbij de volgens prevalenties van STEC werden gerapporteerd: 3,7% in 2006 tot 6,3% in 2007 in Zwitserland (Stephan et al., 2008), 11,3% in Egypte (Elhadidy and Mohammed, 2013), 17,5% in Iran (Mohammadi et al., 2013), en 13% in Frankrijk (Vernozy-Rozand et al., 2005). Verschillen tussen onderzoeken kunnen te maken hebben met de verschillen in laboratorium-methode en definitie van een positieve uitslag.

Bijlage 14. Hoeveel en hoe vaak monsteren?

Monsterfrequenties kun je eindeloos opvoeren, wat tot hoge kosten voor de verwerker zal leiden. Wanneer de kwalitatieve uitslag (ja/ nee) vervolgens geen duidelijkheid geeft of de gevonden STEC ook werkelijk een ziekteprobleem na consumptie zal leiden, zowel in kwantitatieve zin, als door het feit dat je niet precies weet met welke virulente stam je te maken hebt, dan sta je voor een dilemma. Ook de FAO beaamt dit, als zij schrijft: “De vondst van een virulentiegen is op zich nog geen weerspiegeling van het gezondheidsrisico door het

differentiële of gebrek aan stx-genexpressie. Het subtyperen van de stx-genvarianten is ook belangrijk om subtypes die het vaakst geassocieerd worden met ziekten bij de mens te onderscheiden van subtypes die mogelijk geen menselijke infecties veroorzaken. Isolatie van de STEC-bacterie uit vermoedelijk positieve monsters is een vereiste voor bevestiging en dit wordt vaak uitgevoerd met traditionele kweekmethoden.”“Afhankelijk van de omvang van de melkverwerker (kleine, middelgrote of grote schaal) zijn er verschillende bemonsteringsmethoden beschikbaar, waaronder periodieke, willekeurige, samengestelde en universele bemonstering. De bemonstering kan één keer per week of één keer per twee weken plaatsvinden, of periodiek met onregelmatige tussenpozen. Monsters rauwe melk kunnen als steekproef worden genomen of monsters kunnen over een bepaalde periode worden samengevoegd (samengestelde monsters) en getest”. Vanwege contaminatie van apparatuur bij de verwerker zijn aanvullende monsters nodig: “Zo worden in fabrieken routinematig monsters van kleppen, apparatuur, filters en omgevingsbronnen verzameld voor microbiologische analyse”.

Jaakkonen et al. (2019) voerden een eenjarig longitudinaal onderzoek uit naar de aanwezigheid van STEC en *Campylobacter jejuni* op Finse melkveebedrijven en in rauwe melk. STEC O157:H7 werd geïsoleerd uit 17% van het vee, maar uit slechts 2% van de melkfilters en niet (0%) uit monsters van rauwe melk. Het stx-gen werd echter met een hogere frequentie gedetecteerd melkfilters (37%) dan in rauwe melk (7%), wat erop wijst dat de filters een effectiever bemonsteringspunt kunnen zijn dan rauwe melk.’ Ook geeft het aan, dat het STEC-gevaar afhankelijk is van je definitie.

7. Literatuur

- Abbring, S., Kusche, D., Roos, T. C., Diks, M. A., Hols, G., Garssen, J., ... & van Esch, B. C. (2019). Milk processing increases the allergenicity of cow’s milk—Preclinical evidence supported by a human proof-of-concept provocation pilot. *Clinical & Experimental Allergy*, 49(7), 1013-1025.
- Baars, T., van Esch, B., van Ooijen, L., Zhang, Z., Dekker, P., Boeren, S., ... & Kort, R. (2023). Raw milk kefir: microbiota, bioactive peptides, and immune modulation. *Food & Function*, 14(3), 1648-1661.
- Bagel, A., Bouvier-Crozier, M., Canizares, M., Hamadou, B., Courcol, L., Lopez, C., ... & Sergentet, D. (2023). Surface proteins of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* mediate association with milk fat globules in raw milk. *Frontiers in Microbiology*, 14.
- Ballem, A., Goncalves, S., Garcia-Meniño, I., Flament-Simon, S. C., Blanco, J. E., Fernandes, C., ... & Almeida, C. (2020). Prevalence and serotypes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) in dairy cattle from Northern Portugal. *PLoS One*, 15(12), e0244713.
- Berge, A. C., & Baars, T. (2020). Raw milk producers with high levels of hygiene and safety. *Epidemiology & Infection*, 148, e14.
- Bibbal, D., Ruiz, P., Sapountzis, P., Mazuy-Cruchaudet, C., Loukiadis, E., Auvray, F., ... & Brugère, H. (2022). Persistent circulation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) O157: H7 in cattle farms: Characterization of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7 strains and fecal microbial communities of bovine shedders and non-shedders. *Frontiers in Veterinary Science*, 9, 852475.
- Biesta-Peters E. (2018). Enterobacteriaceae, coliformen en *Escherichia coli*; wanneer welk onderzoek en hoe (NEN-EN-ISO 21528, NEN-ISO 4831, NEN-ISO 4832 en NEN-(EN-)ISO 16649). In: FIMM Symposium – nieuwe normen voor het lab, Wageningen (NI).
- Bizot, E., Cointe, A., Béchet, S., Sobral, E., Cohen, R., Mariani-Kurkdjian, P., ... & Bonacorsi, S. (2021). Shiga toxin-producing *Escherichia coli* carriage in 959 healthy French infants. *Archives of Disease in Childhood*, 106(12), 1239-1240.

- Bording-Jorgensen, M., Parsons, B. D., Tarr, G. A., Shah-Gandhi, B., Lloyd, C., & Chui, L. (2020). Association of Ct Values from Real-Time PCR with Culture in Microbiological Clearance Samples for Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* (STEC). *Microorganisms*, 8(11), 1801.
- Boyd, E., Trmcic, A., Taylor, M., Shyng, S., Hasselback, P., Man, S., ... & Galanis, E. (2021). Foodborne and Animal Contact Disease Outbreaks: *Escherichia coli* O121 outbreak associated with raw milk Gouda-like cheese in British Columbia, Canada, 2018. *Canada Communicable Disease Report*, 47(2), 11.
- Brehony, C., Cullinan, J., Cormican, M., & Morris, D. (2018). Shiga toxigenic *Escherichia coli* incidence is related to small area variation in cattle density in a region in Ireland. *Science of the Total Environment*, 637, 865-870.
- Bruyand, M., Mariani-Kurkdjian, P., Le Hello, S., King, L. A., Van Cauteren, D., Lefevre, S., ... & De Valk, H. (2019). Paediatric haemolytic uraemic syndrome related to Shiga toxin-producing *Escherichia coli*, an overview of 10 years of surveillance in France, 2007 to 2016. *Eurosurveillance*, 24(8), 1800068.
- Callon, C., Arluguie, C., & Montel, M. C. (2016). Control of Shigatoxin-producing *Escherichia coli* in cheese by dairy bacterial strains. *Food microbiology*, 53, 63-70.
- Carter, M. Q., Laniohan, N., Lo, C. C., & Chain, P. S. (2022). Comparative genomics applied to systematically assess pathogenicity potential in shiga toxin-producing *Escherichia coli* O145: H28. *Microorganisms*, 10(5), 866.
- Choi, K. H., Lee, H., Lee, S., Kim, S., & Yoon, Y. (2016). Cheese microbial risk assessments—A review. *Asian-Australasian journal of animal sciences*, 29(3), 307.
- Cobo-Simón, M., Hart, R., & Ochman, H. (2023). *Escherichia coli*: What is and Which are?. *Molecular Biology and Evolution*, 40(1), msac273.
- Cortimiglia, C., Borney, M. F., Bassi, D., & Cocconcetti, P. S. (2021). Genomic investigation of virulence potential in Shiga toxin *Escherichia coli* (STEC) strains from a semi-hard raw milk cheese. *Frontiers in Microbiology*, 11, 629189.
- Craig, C. (2023). *Expired. Covid the untold story*. Publishing Aloud Ltd, UK, 492 pp.
- D'Amico, D. J., Druart, M. J., & Donnelly, C. W. (2010). Behavior of *Escherichia coli* O157: H7 during the manufacture and aging of Gouda and stirred-curd Cheddar cheeses manufactured from raw milk. *Journal of Food Protection*, 73(12), 2217-2224.
- Donnelly, C. (2018). Review of controls for pathogen risks in Scottish artisan cheeses made from unpasteurised milk. *Food Standards Scotland*, 4.
- EFSA Biohaz Panel, Koutsoumanis, K., Allende, A., Alvarez-Ordóñez, A., Bover-Cid, S., Chemaly, M., ... & Bolton, D. (2020). Pathogenicity assessment of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and the public health risk posed by contamination of food with STEC. *Efsa Journal*, 18(1), e05967.
- Elhadidy, M., & Mohammed, M. A. (2013). Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from raw milk cheese in Egypt: prevalence, molecular characterization and survival to stress conditions. *Letters in applied microbiology*, 56(2), 120-127.
- Engstrom, S. K., Mays, M. F., & Glass, K. A. (2021). Determination and validation of D-values for *Listeria monocytogenes* and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in cheese milk. *Journal of Dairy Science*, 104(12), 12332-12341.
- Eppinger, M., Almería, S., Allué-Guardia, A., Bagi, L. K., Kalalah, A. A., Gurtler, J. B., & Fratamico, P. M. (2022). Genome Sequence Analysis and Characterization of Shiga Toxin 2 Production by *Escherichia coli* O157: H7 Strains Associated With a Laboratory Infection. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 12, 888568.
- Eugster, E., & Jakob, E. (2019). Pre-treatments of Milk and their Effect on the Food Safety of Cheese. *Milk Science International: journal of nutrition research and food science*, 72(8), 45-52.
- FAO/WHO Stec Expert Group. (2019). Hazard identification and characterization: criteria for categorizing Shiga toxin-producing *Escherichia coli* on a risk basis. *Journal of food protection*, 82(1), 7-21.
- Feliciano, R., Boué, G., Mohssin, F., Hussaini, M. M., & Membré, J. M. (2021). Probabilistic modelling of *Escherichia coli* concentration in raw milk under hot weather conditions. *Food Research International*, 149, 110679.
- Ferdous, M., Zhou, K., Mellmann, A., Morabito, S., Croughs, P. D., de Boer, R. F., ... & Friedrich, A. W. (2015). Is Shiga toxin-negative *Escherichia coli* O157: H7 enteropathogenic or enterohemorrhagic *Escherichia coli*? Comprehensive molecular analysis using whole-genome sequencing. *Journal of Clinical Microbiology*, 53(11), 3530-3538.
- Flink, C., & Nyberg, K. (2020). Occurrence of *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp. and shiga toxin-producing *Escherichia coli* in inline milk filters from Swedish dairy farms. *Journal of Food Safety*, 40(1), e12726.

- Halkman, H.B.D., & Halkman, A.K., (2014). Indicator organisms. In: Robinson, R. K. (2014). Encyclopedia of food microbiology. Academic press.
- Hancock, D., & Besser, T. (2006). E. coli O157: H7 in hay-or grain-fed cattle.
- Horesh, G., Blackwell, G. A., Tonkin-Hill, G., Corander, J., Heinz, E., & Thomson, N. R. (2021). A comprehensive and high-quality collection of Escherichia coli genomes and their genes. *Microbial genomics*, 7(2).
- Hua, Y., Chromek, M., Frykman, A., Jernberg, C., Georgieva, V., Hansson, S., ... & Bai, X. (2021). Whole-genome characterization of hemolytic uremic syndrome-causing Shiga toxin-producing Escherichia coli in Sweden. *Virulence*, 12(1), 1296-1305.
- Idland, L., Bø-Granquist, E. G., Aspholm, M., & Lindbäck, T. (2022). The Ability of Shiga Toxin-Producing Escherichia coli to Grow in Raw Cow's Milk Stored at Low Temperatures. *Foods*, 11(21), 3411.
- Jaakkonen, A., Castro, H., Hallanvuoto, S., Ranta, J., Rossi, M., Isidro, J., ... & Hakkinen, M. (2019). Longitudinal study of Shiga toxin-producing Escherichia coli and Campylobacter jejuni on Finnish dairy farms and in raw milk. *Applied and Environmental Microbiology*, 85(7), e02910-18.
- Joseph, A., Cointe, A., Mariani Kurkdjian, P., Rafat, C., & Hertig, A. (2020). Shiga toxin-associated hemolytic uremic syndrome: A narrative review. *Toxins*, 12(2), 67.
- Khan, I. U., Gannon, V., Kent, R., Koning, W., Lapen, D. R., Miller, J., ... & Edge, T. A. (2007). Development of a rapid quantitative PCR assay for direct detection and quantification of culturable and non-culturable Escherichia coli from agriculture watersheds. *Journal of microbiological methods*, 69(3), 480-488.
- Kintz, E., Brainard, J., Vanderes, M., Vivancos, R., Byrne, L., Butt, S., ... & Hunter, P. (2023). Animal and environmental risk factors for sporadic Shiga toxin-producing Escherichia coli (STEC) infection in England: a case control study for O157, O26 and other STEC serotypes. *Pathogens and Global Health*, 1-9.
- Lange, M. E., Clarke, S. T., Boras, V. F., Brown, C. L., Zhang, G., Laing, C. R., ... & Inglis, G. D. (2023). Commensal Escherichia coli Strains of Bovine Origin Competitively Mitigated Escherichia coli O157: H7 in a Gnotobiotic Murine Intestinal Colonization Model with or without Physiological Stress. *Animals*, 13(16), 2577.
- Lehniger, L., Rudloff, A., Pollok, S., Große, N., Wessel, K., Brendel, M., ... & Weber, K. (2021). A Model System for Sensitive Detection of Viable E. coli Bacteria Combining Direct Viability PCR and a Novel Microarray-Based Detection Approach. *Chemosensors*, 9(12), 357.
- Lu, Y. T., Ma, Y., Wong, C. W., & Wang, S. (2022). Characterization and application of bacteriophages for the biocontrol of Shiga-toxin producing Escherichia coli in Romaine lettuce. *Food Control*, 140, 109109.
- Mansilla, F. I., Miranda, M. H., Uezen, J. D., Maldonado, N. C., Villar, M. A. U., Merino, L. A., ... & Nader-Macias, M. E. F. (2023). Effect of probiotic lactobacilli supplementation on growth parameters, blood profile, productive performance, and fecal microbiology in feedlot cattle. *Research in Veterinary Science*, 155, 76-87.
- Matussek, A., Mernelius, S., Chromek, M., Zhang, J., Frykman, A., Hansson, S., ... & Bai, X. (2023). Genome-wide association study of hemolytic uremic syndrome causing Shiga toxin-producing Escherichia coli from Sweden, 1994–2018. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 42(6), 771-779.
- Minary, K., Tanne, C., Kwon, T., Faudeux, C., Clave, S., Langevin, L., ... & Fila, M. (2022). Outbreak of hemolytic uremic syndrome with unusually severe clinical presentation caused by Shiga toxin-producing Escherichia coli O26: H11 in France. *Archives de Pédiatrie*, 29(6), 448-452.
- Miszczucha, S. D., Bel, N., Gay-Perret, P., Michel, V., Montel, M. C., & Sergentet-Thevenot, D. (2016). Behavior of different Shiga toxin-producing Escherichia coli serotypes (O26: H11, O103: H2, O145: H28, O157: H7) during the manufacture, ripening, and storage of a white mold cheese. *Journal of Dairy Science*, 99(7), 5224-5229.
- Mohammadi, P., Abiri, R., Rezaei, M., & Salmanzadeh-Ahrabi, S. (2013). Isolation of Shiga toxin-producing Escherichia coli from raw milk in Kermanshah, Iran. *Iranian journal of microbiology*, 5(3), 233.
- Nouws, S., Verhaegen, B., Denayer, S., Crombe, F., Piérard, D., Bogaerts, B., ... & De Keersmaecker, S. C. Transforming Shiga toxin-producing Escherichia coli surveillance through Whole Genome Sequencing in food safety practices. *Frontiers in Microbiology*, 14, 1204630.
- Nyberg, K. A., Andersson, G. M., & Elving, J. (2019). Long-term survival of Escherichia coli O157: H7 and Salmonella Typhimurium in cowpats on pasture. *Journal of applied microbiology*, 126(2), 651-660.
- O'Connor, L. (2021). Widespread contamination of recreational seawaters, rivers and lakes with Shiga toxigenic Escherichia coli. *Proceedings of the International Academy of Ecology and Environmental Sciences*, 11(2), 31.
- Peng, S., Hoffmann, W., Bockelmann, W., Hummerjohann, J., Stephan, R., & Hammer, P. (2013). Fate of Shiga toxin-producing and generic Escherichia coli during production and ripening of semihard raw milk cheese. *Journal of dairy science*, 96(2), 815-823.

- Perrin, F., Tenenhaus-Aziza, F., Michel, V., Miszczycha, S., Bel, N., & Sanaa, M. (2015). Quantitative risk assessment of haemolytic and uremic syndrome linked to O157: H7 and Non-O157: H7 shiga-toxin producing *Escherichia coli* strains in raw milk soft cheeses. *Risk Analysis*, 35(1), 109-128.
- Rapp, D., Ross, C. M., Maclean, P., Cave, V. M., & Brightwell, G. (2021). Investigation of on-farm transmission routes for contamination of dairy cows with top 7 *Escherichia coli* O-serogroups. *Microbial ecology*, 81(1), 67-77.
- Rasko, D. A., Webster, D. R., Sahl, J. W., Bashir, A., Boisen, N., Scheutz, F., ... & Waldor, M. K. (2011). Origins of the *E. coli* strain causing an outbreak of hemolytic–uremic syndrome in Germany. *New England Journal of Medicine*, 365(8), 709-717.
- Riesgaard, B. (2022). An Exploration of Cheese Safety Parameters and Aging as Mitigation Strategy for Foodborne Pathogens in Cheese.
- RKI (2021). Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2020.
- Rodríguez-Rubio, L., Haarmann, N., Schwidder, M., Muniesa, M., & Schmidt, H. (2021). Bacteriophages of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and their contribution to pathogenicity. *Pathogens*, 10(4), 404.
- Sadeq, J. N., Al-Husseiny, S. H., Al Muhana, B. M. M., Kshash, Q. H., & Jasim, A. (2024). Isolation and identification of *Escherichia coli* O157: H7 from houseflies (*Musca domestica* L) at cattle barns in Al-Qadisiyah Province, Iraq: <https://doi.org/10.12982/VIS.2024.006>. *Veterinary Integrative Sciences*, 22(1), 65-72.
- Salazar, J. K., Gonsalves, L. J., Natarajan, V., Shazer, A., Reineke, K., Mhetras, T., ... & Tortorello, M. L. (2020). Population dynamics of *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157: H7, and native microflora during manufacture and aging of Gouda cheese made with unpasteurized milk. *Journal of Food Protection*, 83(2), 266-276.
- Scavia, G., Gianviti, A., Labriola, V., Chiani, P., Maugliani, A., Michelacci, V., ... & Morabito, S. (2018). A case of haemolytic uremic syndrome (HUS) revealed an outbreak of Shiga toxin-2-producing *Escherichia coli* O26: H11 infection in a nursery, with long-lasting shedders and person-to-person transmission, Italy 2015. *Journal of Medical Microbiology*, 67(6), 775-782.
- Sebastianski, M., Bridger, N. A., Featherstone, R. M., & Robinson, J. L. (2022). Disease outbreaks linked to pasteurized and unpasteurized dairy products in Canada and the United States: a systematic review. *Canadian Journal of Public Health*, 113(4), 569-578.
- Silva, B. N., Teixeira, J. A., Cadavez, V., & Gonzales-Barron, U. (2023). Mild heat treatment and biopreservatives for artisanal raw milk cheeses: reducing microbial spoilage and extending shelf-life through thermisation, plant extracts and lactic acid bacteria. *Foods*, 12(17), 3206.
- Stephan, R., Giezendanner, N., Corti, S., Zweifel, C., Krause, G., Danuser, J., & Beutin, L. (2008). Prevalence and impact of Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) in raw milk cheeses. *Leipziger Blaue Hefte*, 284.
- Strachan, N. J., Doyle, M. P., Kasuga, F., Rotariu, O., & Ogden, I. D. (2005). Dose response modelling of *Escherichia coli* O157 incorporating data from foodborne and environmental outbreaks. *International Journal of Food Microbiology*, 103(1), 35-47.
- Tamminen, L. M., Söderlund, R., Wilkinson, D. A., Torsein, M., Eriksson, E., Churakov, M., ... & Emanuelson, U. (2019). Risk factors and dynamics of verotoxigenic *Escherichia coli* O157: H7 on cattle farms: An observational study combining information from questionnaires, spatial data and molecular analyses. *Preventive veterinary medicine*, 170, 104726.
- Tamminen, L. M., Hranac, C. R., Dicksved, J., Eriksson, E., Emanuelson, U., & Keeling, L. J. (2020). Socially engaged calves are more likely to be colonised by VTEC O157: H7 than individuals showing signs of poor welfare. *Scientific Reports*, 10(1), 6320.
- Ten Bruggencate, S. J., Frederiksen, P. D., Pedersen, S. M., Floris-Vollenbroek, E. G., Lucas-van de Bos, E., van Hoffen, E., & Wejse, P. L. (2016). Dietary milk-fat-globule membrane affects resistance to diarrheagenic *Escherichia coli* in healthy adults in a randomized, placebo-controlled, double-blind study. *The Journal of nutrition*, 146(2), 249-255.
- Travert, B., Dossier, A., Jamme, M., Cointe, A., Delmas, Y., Malot, S., ... & des Microangiopathies Thrombotiques, C. D. R. (2021). Shiga toxin–associated hemolytic uremic syndrome in adults, France, 2009–2017. *Emerging Infectious Diseases*, 27(7), 1876.
- Vachon, M. S., Khalid, M., Tarr, G. A., Hedberg, C., & Brown, J. A. (2020). Farm animal contact is associated with progression to Hemolytic uremic syndrome in patients with Shiga toxin-producing *Escherichia coli*—Indiana, 2012–2018. *One Health*, 11, 100175.
- Van Hoek, A. H., Lee, S., van den Berg, R. R., Rapallini, M., van Overbeeke, L., Opsteegh, M., ... & van der Voort, M. (2023). Virulence and antimicrobial resistance of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from dairy goat and sheep farms in the Netherlands. *Journal of Applied Microbiology*, 134(1), 1-11.

- Vasco, K., Nohomovich, B., Singh, P., Venegas-Vargas, C., Mosci, R. E., Rust, S., ... & Manning, S. D. (2021). Characterizing the cattle gut microbiome in farms with a high and low prevalence of shiga toxin producing *Escherichia coli*. *Microorganisms*, 9(8), 1737.
- Venegas-Vargas, C., Henderson, S., Khare, A., Mosci, R. E., Lehnert, J. D., Singh, P., ... & Manning, S. D. (2016). Factors associated with Shiga toxin-producing *Escherichia coli* shedding by dairy and beef cattle. *Applied and environmental microbiology*, 82(16), 5049-5056.
- Vernozy-Rozand, C., Mazuy-Cruchaudet, C., Bavai, C., Montet, M. P., Bonin, V., Dernburg, A., & Richard, Y. (2005). Growth and survival of *Escherichia coli* O157: H7 during the manufacture and ripening of raw goat milk lactic cheeses. *International Journal of Food Microbiology*, 105(1), 83-88.
- Vorimore, F., Jaudou, S., Tran, M. L., Richard, H., Fach, P., & Delannoy, S. (2023). Combination of whole genome sequencing and supervised machine learning provides unambiguous identification of eae-positive Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Frontiers in Microbiology*, 14, 1118158.
- Wang, S., Nie, S., Gan, R. Y., & Zhu, F. (2023). Properties of cheese and ground beef in the presence of staghorn sumac. *eFood*, 4(2), e74.
- Widgren, S., Söderlund, R., Eriksson, E., Fasth, C., Aspan, A., Emanuelson, U., ... & Lindberg, A. (2015). Longitudinal observational study over 38 months of verotoxigenic *Escherichia coli* O157: H7 status in 126 cattle herds. *Preventive veterinary medicine*, 121(3-4), 343-352.
- Widgren, S., Engblom, S., Emanuelson, U., & Lindberg, A. (2018). Spatio-temporal modelling of verotoxigenic *Escherichia coli* O157 in cattle in Sweden: exploring options for control. *Veterinary research*, 49(1), 1-13.
- Williams, A. P., Avery, L. M., Killham, K., & Jones, D. L. (2005). Persistence of *Escherichia coli* O157 on farm surfaces under different environmental conditions. *Journal of applied microbiology*, 98(5), 1075-1083.
- Willis, C., McLauchlin, J., Aird, H., Jørgensen, F., Lai, S., & Sadler-Reeves, L. (2022). Assessment of the Microbiological Quality and Safety of Unpasteurized Milk Cheese for Sale in England between 2019 and 2020. *Journal of Food Protection*, 85(2), 278-286.
- Withenshaw, S. M., Smith, R. P., Davies, R., Smith, A. E., Gray, E., & Rodgers, J. (2022). A systematized review and qualitative synthesis of potential risk factors associated with the occurrence of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) in the primary production of cattle. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 21(3), 2363-2390.
- WHO. (2019). Shiga Toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and Food: Attribution, Characterization and Monitoring (Vol. 19). World Health Organization.
- Zhao, G., Kempen, P. J., Zheng, T., Jakobsen, T. H., Zhao, S., Gu, L., ... & Jensen, P. R. (2023). Synergistic bactericidal effect of nisin and phytic acid against *Escherichia coli* O157: H7. *Food Control*, 144, 109324.

Geraadpleegde websites

NVWA, 2014. <https://www.nvwa.nl/documenten/consument/eten-drinken-roken/bacterien/e-coli/beleidslijn-interventie-aanwezigheid-stec-in-levensmiddelen>
<https://www.gesetze-im-internet.de/tier-lmhv/>

8. Eindnoten

ⁱ Dit is een belangrijke afbakening van de brochure. STEC gedraagt zich anders in verse kaas, of witschimmelkaas. Ook de bergkaas kan niet goed als vergelijking dienen, aangezien hier sprake is van een vorm van thermisatie van de wrongel (hoge eindtemperatuur). Typisch voor Goudse boerenkaas is, dat de hoogste temperatuur niet boven de 37-38°C komt.

ⁱⁱ De indeling op basis van serotypen is de oudste opsplitsing van STEC-typen. *E. coli* wordt geserotypiseerd met behulp van antisera tegen de ca. 186 O-antigenen en 53 H-flagellar-antigenen (vergelijk bloedgroepen bij de mens). Hiermee zijn nog minstens 6 verdachte serotypen vastgesteld: O26:H11, O103:H2, O111:H8, O121:H19, O145:H28 en O157:H7. Andere onderzoekers nemen ook O45 als STEC op en hebben het over een top-7 in plaats van een top-6 van groepen die vaak problemen geven met HUS bij mensen (Rapp et al., 2020). De WHO (2018) geeft aan, dat meer dan 100 van de 470 in totaal gevonden serotypen in verband zijn gebracht met ziekte.

ⁱⁱⁱ Meer dan 10 sub-types van het stx-gen zijn beschrijven: stx_{1a}, stx_{1c}, stx_{1d}, stx_{2a}, stx_{2a-2g} (Harada et al., 2023). Om het nog complexer te maken, moet je realiseren, dat het eae-gen ook uit vele verschillende subtypen bestaat, door mutaties van het DNA (genetische allelen). Sommige eae-subtypes zijn gevaarlijker (pathogener of virulenter) dan andere. Hetzelfde geldt voor de subtypen van stx₁ en stx₂.

Om het nog gecompliceerder te maken voor de controle-instanties blijken pathogene *E. coli*-bacteriën hun stx-gen te kunnen verliezen. Dergelijke stx-negatieve varianten worden dus in routine laboratoria gemist, dat wil zeggen als STEC-negatief monster aangeduid (Ferdous et al., 2015).

^{iv} In Noors onderzoek heeft men HUS en niet-HUS patiënten beoordeeld op aanwezigheid van virulentie-eigenschappen binnen de gevonden STEC (Matussek et al., 2023). De aanwezigheid van subtypes stx_{2a} en stx_{2a}+stx_{2c} zijn bovenmatig vertegenwoordigd in HUS-patiënten, echter stx_{1a} juist een kenmerk zou zijn bij afwezigheid van HUS.

^v De uitspraak over een al dan niet gevaarlijke STEC-variant zou nog sterk verbeterd kunnen worden, wanneer meer informatie over de patiënt aanwezig is. Behalve de leeftijd en geslacht is het van belang ook kennis te hebben van onderliggend lijden, aanwezigheid van welvaartsziekten, etc.

^{vi} De FAO/WHO (2019) benoemt niveaus van pathogeniteit. Niveau 1 is het hoogste niveau en wordt gevormd door de combinatie van stx_{2a} + eae of aggR; niveau 2 betreft stx_{2d}; niveau 3: stx_{2c} + eae; niveau 4: stx_{1a} + eae en het laagste niveau betreft elke andere stx-subtype.

^{vii} Coliforme bacteriën worden gedefinieerd als facultatief anaërobe, gramnegatieve, niet-sporenvormende staafjes die lactose krachtig fermenteren tot zuur en gas bij 35 ± 2°C binnen 24 of 48 uur. Coliforme bacteriën behoren over het algemeen tot vier geslachten van de *Enterobacteriaceae*: *Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes*, *E. coli* en *Klebsiella pneumoniae*.

Sommige coliforme bacteriën worden geassocieerd met de darmen (colon) van warmbloedige dieren (fecale coliformen genoemd), terwijl andere gerelateerd zijn aan plantaardig materiaal.

Coliforme bacteriën worden beschouwd als indicatororganismen omdat hun aanwezigheid in voedingsmiddelen aangeeft dat de omstandigheden geschikt zijn voor de aanwezigheid van darmpathogenen en mogelijk duiden op onvoldoende hygiënische omstandigheden (Halkman et al., 2014).