



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

Surveillance zoönosen in melkvee 2021

RIVM-briefrapport 2022-0080
T. Cuperus et al.



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

Surveillance zoönosen in melkvee 2021

RIVM-briefrapport 2022-0080
T. Cuperus et al.

Colofon

© RIVM 2022

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

Het RIVM hecht veel waarde aan toegankelijkheid van zijn producten. Op dit moment is het echter nog niet mogelijk om dit document volledig toegankelijk aan te bieden. Als een onderdeel niet toegankelijk is, wordt dit vermeld. Zie ook www.rivm.nl/toegankelijkheid.

DOI 10.21945/RIVM-2022-0080

T. Cuperus (auteur), RIVM
M. Opsteegh (auteur), RIVM
K. van der Ark (auteur), RIVM
N. Neppelenbroek (auteur), RIVM
B. Wit (auteur), NVWA
B. Wullings (auteur), WFSR
J. Kool (auteur), RIVM
C. Dierikx (auteur), RIVM
E. van Duijkeren (auteur), RIVM
A. van den Hoek (auteur), RIVM
P. Hengeveld (auteur), RIVM
M. Bos (auteur), RIVM
E. Kuipers (auteur), LUMC
J. van der Giessen (auteur), RIVM

Contact:

Marieke Opsteegh
Infectieziekten en Vaccinologie/Zoönosen en
Omgevingsmicrobiologie/Dier en Vector
marieke.opsteegh@rivm.nl

Dit onderzoek werd verricht in opdracht van de NVWA in het kader van Monitoring pathogenen landbouwhuisdieren

Dit is een uitgave van:

**Rijksinstituut voor Volksgezondheid
en Milieu**

Postbus 1 | 3720 BA Bilthoven

Nederland

www.rivm.nl

Publiekssamenvatting

Surveillance zoönosen in melkvee 2021

Dieren kunnen ziekteverwekkers bij zich dragen waar mensen ook ziek van kunnen worden. De ziekten die hierdoor worden veroorzaakt, noemen we zoönosen. In 2021 onderzochten het RIVM, de NVWA en WFSR (Wageningen Food Safety Research) hoe vaak een aantal van deze ziekteverwekkers voorkwamen bij melkvee op 185 Nederlandse melkveebedrijven. Ook hebben 107 melkveehouders, gezinsleden en medewerkers aan dit onderzoek meegedaan om te kijken of zij deze ziekteverwekkers ook bij zich dragen.

Bij de onderzochte koeien en kalveren komen een aantal ziekteverwekkers vaak voor. Ze zitten in de darmen van de dieren en dus ook in de mest. Melk kan tijdens het melken in aanraking komen met mest en op die manier besmet raken. Mensen kunnen de kans op een besmetting verkleinen door geen rauwe melk of rauwe melkproducten, zoals kaas, te consumeren. Het vlees kan tijdens de slacht besmet raken. Het is daarom belangrijk om rundvlees goed gaar te eten.

Het RIVM heeft gekeken of dezelfde ziekteverwekkers in de ontlasting of in de neus van deze mensen voorkwamen. De meeste van deze ziekteverwekkers veroorzaken bij mensen diarree, maar soms kunnen infecties ernstiger verlopen. Daarnaast is er naar ESBL-producerende bacteriën en MRSA gekeken, omdat belangrijke groepen antibiotica daar niet tegen werken.

Van de onderzochte ziekteverwekkers kwam *Campylobacter* het meest voor bij het melkvee: op 91 procent van de bedrijven. Bij de veehouders en gezinsleden werd *Campylobacter* bij 1 persoon gevonden. Het hoge percentage bij de dieren is dus niet direct terug te zien bij de veehouders.

Daarnaast kwamen de *Listeria* en STEC-bacteriën regelmatig voor bij melkvee; namelijk op 34 procent (*Listeria*) en 21 procent (STEC) van de bedrijven. Twee deelnemers van de veehouders en gezinsleden droegen *Listeria* bij zich en één deelnemer STEC.

ESBL-producerende bacteriën zijn op 8 procent van de bedrijven gevonden en bij 3 deelnemers. Het percentage bij de deelnemers is ongeveer hetzelfde als bij de Nederlandse bevolking. MRSA is op de huid van 4 procent van de koeien gevonden en bij één deelnemer.

De bacterie *Clostridioides* is zowel bij koeien als bij kalveren onderzocht en kwam bij de kalveren jonger dan 4 weken vaker (18 procent) voor dan bij oudere dieren (4 procent). Dit was ook het geval bij de parasiet *Cryptosporidium*, die bij veel van de jonge kalveren voorkwam (72 procent). Zowel *Clostridioides* als *Cryptosporidium* zijn niet bij de deelnemers gevonden.

Tenslotte werd op 4 bedrijven *Salmonella* gevonden. *Salmonella* werd niet bij de deelnemers aangetroffen.

Kernwoorden: melkvee, koeien, runderen, zoönosen, prevalentie, *Campylobacter*, *Salmonella*, ESBL-producerende *E. coli*, *Listeria*, STEC, *Cryptosporidium*, *Clostridioides*, MRSA

Synopsis

Surveillance into zoonoses in dairy cattle 2021

Animals can carry pathogens that can also cause disease in humans. Such diseases are known as zoonoses. In 2021, RIVM, the Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority (*Nederlandse Voedsel- en Warenautoriteit*, NVWA) and WFSR (Wageningen Food Safety Research) investigated how regularly some of these pathogens occur in dairy cattle. This study involved dairy cattle at 185 Dutch dairy farms as well as 107 livestock farmers, family members and employees.

A number of pathogens occur frequently on the investigated dairy cattle farms. They are present in the animals' intestines and therefore end up in the manure as well. Dairy can become contaminated during milking when it comes into contact with manure. Humans can lower the risk of infection by not consuming raw milk or raw milk products, such as cheese. Meat can become contaminated during slaughter. It is therefore important to only eat beef that has been thoroughly cooked.

RIVM assessed whether the same pathogens also occurred in the faeces or nose of the investigated persons. Most of these pathogens usually cause diarrhoea in humans, but the infections can sometimes be more severe. RIVM also tested for the presence of bacteria that produce extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), as these bacteria are resistant to important groups of antibiotics.

Of the investigated pathogens, *Campylobacter* was found most frequently, namely in dairy cattle on 91% of the farms. Among livestock farmers and family members, *Campylobacter* was found in 1 person. The high percentage of *Campylobacter* in animals is not reflected in the farmers.

In addition, *Listeria* and shigatoxigenic *Escherichia coli* (STEC) bacteria were found regularly in dairy cattle, namely on 34% (*Listeria*) and 21% (STEC) of the dairy cattle farms. Two human participants carried *Listeria* and one participant carried STEC.

ESBL-producing bacteria were found on 8% of the dairy cattle farms and in 3 human participants. The percentage in human participants is comparable to the percentage in the general Dutch population. MRSA was found on the skin of 4% of the dairy cattle and in one human participant.

The *Clostridioides* bacteria was investigated in both adult cattle and calves and occurred more regularly in calves younger than four weeks (18% compared to 4%). This was also the case for the parasite *Cryptosporidium*, which occurred in many of the young calves (72%). Both *Clostridioides* and *Cryptosporidium* were not found in human participants.

Finally, *Salmonella* was found on four dairy cattle farms. *Salmonella* was not found in the human participants.

Keywords: dairy cattle, cattle, zoonoses, prevalence, *Campylobacter*, *Salmonella*, ESBL-producing *E. coli*, *Listeria*, STEC, *Cryptosporidium*, *Clostridioides*, MRSA

Inhoudsopgave

1	Achtergrond — 11
1.1	Doel van het surveillanceprogramma — 11
1.2	Pathogenen — 11
1.2.1	<i>Campylobacter</i> — 11
1.2.2	<i>Clostridioides difficile</i> — 12
1.2.3	<i>Cryptosporidium parvum</i> — 13
1.2.4	ESBL-producerende <i>E. coli</i> — 13
1.2.5	<i>Listeria monocytogenes</i> — 14
1.2.6	Meticilline-resistente <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA) — 14
1.2.7	<i>Salmonella</i> — 15
1.2.8	Shiga-toxine producerende <i>Escherichia coli</i> (STEC) — 16
2	Methode — 17
2.1	Studieverloop en monsternamen — 17
2.2	Microbiologische analyse — 18
2.2.1	<i>Campylobacter</i> — 18
2.2.2	<i>Clostridioides difficile</i> — 19
2.2.3	<i>Cryptosporidium parvum</i> — 19
2.2.4	ESBL-producerende <i>E. coli</i> — 20
2.2.5	<i>Listeria monocytogenes</i> — 20
2.2.6	MRSA — 21
2.2.7	<i>Salmonella</i> — 21
2.2.8	STEC — 22
2.3	Bepaling van het microbioom — 22
2.4	Data-analyse — 23
2.4.1	Beschrijvende statistiek — 23
2.4.2	Risicofactoranalyse — 23
2.4.3	Microbioomanalyse — 24
3	Resultaten — 25
3.1	Respons — 25
3.2	Beschrijvende statistiek melkveehouderij — 25
3.2.1	Bedrijfskenmerken — 25
3.2.2	Melk en zuivel — 26
3.2.3	Aan- en afvoer — 26
3.2.4	Huisvesting, weidegang en voeding — 26
3.2.5	Hygiëne — 28
3.2.6	Afkalven en diergezondheid — 30
3.3	Zoönotische pathogenen bij melkvee — 32
3.3.1	Prevalentie volwassen melkvee — 32
3.3.2	Prevalentie kalveren — 33
3.3.3	Prevalentie verschillen tussen leeftijdscategorieën — 34
3.3.4	Typering — 34
3.4	Beschrijvende statistiek humane deelnemers — 38
3.5	Zoönotische pathogenen bij humane deelnemers — 40
3.5.1	Prevalentie — 40
3.5.2	Typering — 40
4	Risicofactoranalyse — 43
4.1	Risicofactoren voor <i>Listeria monocytogenes</i> bij melkvee — 43
4.2	Risicofactoren voor Shiga-toxine producerende <i>E. coli</i> in melkvee — 44

- 4.3 Risicofactoren voor *Clostridioides difficile* in jonge kalveren — 44
- 4.4 Risicofactoren voor *Cryptosporidium parvum* bij jonge kalveren — 45

5 Microbioomanalyse — 47

6 Discussie — 53

- 6.1 *Campylobacter* — 53
 - 6.1.1 Prevalentie melkvee — 53
 - 6.1.2 Resultaten bij veehouders, medewerkers en gezinsleden — 53
 - 6.1.3 Risico voor de mens — 54
- 6.2 *Clostridioides difficile* — 54
 - 6.2.1 Prevalentie melkvee — 54
 - 6.2.2 Risicofactoren jonge kalveren — 55
 - 6.2.3 Resultaten bij veehouders, medewerkers en gezinsleden — 55
 - 6.2.4 Risico voor de mens — 56
- 6.3 *Cryptosporidium parvum* — 56
 - 6.3.1 Prevalentie melkvee — 56
 - 6.3.2 Risicofactoren jonge kalveren — 57
 - 6.3.3 Resultaten bij veehouders, medewerkers en gezinsleden — 57
 - 6.3.4 Risico voor de mens — 57
- 6.4 ESBL-producerende *E. coli* — 58
 - 6.4.1 Prevalentie melkvee — 58
 - 6.4.2 Resultaten bij veehouders, medewerkers en gezinsleden — 58
 - 6.4.3 Risico voor de mens — 58
- 6.5 *Listeria monocytogenes* — 59
 - 6.5.1 Prevalentie melkvee — 59
 - 6.5.2 Risicofactoren melkvee — 60
 - 6.5.3 Resultaten bij veehouders, medewerkers en gezinsleden — 61
 - 6.5.4 Risico voor de mens — 61
- 6.6 MRSA — 62
 - 6.6.1 Prevalentie melkvee — 62
 - 6.6.2 Resultaten bij veehouders, medewerkers en gezinsleden — 62
 - 6.6.3 Risico voor de mens — 62
- 6.7 *Salmonella* — 63
 - 6.7.1 Prevalentie melkvee — 63
 - 6.7.2 Resultaten bij veehouders, medewerkers en gezinsleden — 64
 - 6.7.3 Risico voor de mens — 64
- 6.8 STEC — 64
 - 6.8.1 Prevalentie melkvee — 64
 - 6.8.2 Risicofactoren melkvee — 64
 - 6.8.3 Resultaten bij veehouders, medewerkers en gezinsleden — 65
 - 6.8.4 Risico voor de mens — 65
- 6.9 Microbioom — 66

7 Conclusie — 69

Referenties — 71

Bijlage 1 *Listeria monocytogenes*: uitkomsten univariabele logistische regressie van variabelen met $p < 0,1$ — 87

Bijlage 2 Shiga-toxine producerende *E. coli*: uitkomsten univariabele logistische regressie van variabelen met $p < 0,1$ — 90

Bijlage 3 *Clostridioides difficile* bij jonge kalveren: uitkomsten univariabele logistische regressie van variabelen met $p < 0,1$ – 92

Bijlage 4 *Cryptosporidium parvum* bij jonge kalveren: uitkomsten univariabele logistische regressie van variabelen met $p < 0,1$ – 95

1 Achtergrond

Alle EU-lidstaten dienen in het kader van de Zoönosenrichtlijn (2003/99/EC) informatie te verzamelen over het vóórkomen en de trends van zoönoseverwekkers bij de mens, dieren en (dierlijke) producten en daarover jaarlijks aan ECDC (humaan) en EFSA (dier en dierlijke producten) te rapporteren. In dit kader voert het Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu (RIVM) in samenwerking met de Nederlandse Voedsel- en Warenautoriteit (NVWA) en Wageningen Food Safety Research (WFSR) een surveillanceprogramma naar zoönotische agentia bij landbouwhuisdieren uit.

1.1 Doel van het surveillanceprogramma

Het doel van dit surveillanceprogramma is om inzicht te krijgen in het vóórkomen en de trends van zoönosenverwekkers bij landbouwhuisdieren, evenals de antibioticumresistentie van (een deel van) deze pathogenen. Daarnaast is het doel om, aan de hand van de typering van pathogenen, epidemiologische verbanden te kunnen leggen tussen het vóórkomen van deze pathogenen bij landbouwhuisdieren en het optreden van infecties bij veehouders en hun gezinsleden, die nauw contact hebben met landbouwhuisdieren. Een analyse van risicofactoren kan handvatten bieden voor interventie maatregelen waarmee verspreiding van zoönoseverwekkers onder dieren en van dieren naar mensen kan worden voorkómen. In een meerjarige cyclus wordt ieder jaar een dierketen onder de loep genomen. De ketens die worden gemonitord op diverse relevante pathogenen zijn varkens, pluimvee, runderen, vleeskalveren en kleine herkauwers. In 2013 is gestart met varkensbedrijven, daaropvolgend zijn tussen 2015 en 2019 legpluimveebedrijven, melkgeiten- en melkschapenhouderijen, vleesveebedrijven en vleeskuikenbedrijven onderzocht. In 2021 zijn melkveebedrijven nader onderzocht. Op alle bezochte bedrijven zijn mestmonsters verzameld van volwassen melkvee en kalveren van twee verschillende leeftijden. Deze mestmonsters zijn onderzocht op *Campylobacter*, *Clostridioides difficile*, *Cryptosporidium*, ESBL-producerende *E. coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* en Shiga-toxine producerende *E. coli* (STEC). Ook zijn stofmonsters en huidswabs verzameld en onderzocht op de aanwezigheid van Meticilline-resistente *S. aureus* (MRSA). Daarnaast zijn ontlastingsmonsters en neusswabs van veehouders, medewerkers en gezinsleden verzameld en onderzocht op dezelfde pathogenen. In dit rapport worden de prevalentieschattingen en de risicofactoranalyse uit het surveillanceprogramma in 2021 beschreven.

1.2 Pathogenen

1.2.1 *Campylobacter*

De bacterie *Campylobacter* is de belangrijkste veroorzaker van voedselinfecties in Nederland. Het aantal gevallen van gastro-enteritis door *Campylobacter*-infecties in Nederland werd in 2020 geschat op ongeveer 47.000 (Benincà et al., 2021). Er zijn meer dan 30 *Campylobacter* soorten, waarvan de meest voorkomende *C. jejuni* en *C. coli* zijn. Deze soorten zijn ook het meest van belang voor humane

infecties. De meest voorkomende oorzaak van humane *Campylobacter*-infecties is de consumptie van rauw of niet geheel gaar vlees. Andere mogelijke besmettingsbronnen zijn verontreinigd water en direct contact met besmette dieren of hun uitwerpselen.

Veel dieren, inclusief rundvee, dragen *Campylobacter* asymptomatisch bij zich. Nederlandse bronattributiestudies schatten dat humane gevallen van campylobacteriose voor ongeveer 10-25% kunnen worden toegeschreven aan runderen. Dit betreft de som van alle mogelijke besmettingsroutes en niet alleen consumptie van besmet voedsel (Mughini-Gras et al., 2021; Mughini Gras et al., 2012). Op vers rundvlees in de winkel wordt slechts incidenteel *Campylobacter* gevonden (Vlaanderen et al., 2020). De consumptie van rauwe melk is mogelijk een risicofactor voor humane *Campylobacter*-infecties (Mughini-Gras et al., 2021). In 2018 en 2019 zijn door de NVWA melktaps voor rauwe melk bemonsterd, hierbij werd slechts eenmaal *Campylobacter* aangetroffen (Vlaanderen et al., 2020).

In Nederlandse vleesrunderen werd in 2017 in dit surveillanceprogramma op 85% van de bedrijven *Campylobacter* aangetoond (Cuperus et al., 2019).

1.2.2 *Clostridioides difficile*

Clostridioides difficile (voorheen *Clostridium difficile*) is een Grampositieve bacterie die incidenteel voorkomt in het maagdarmkanaal van mensen en gewoonlijk geen gezondheidsklachten veroorzaakt. Bij personen met sterk verminderde weerstand of na gebruik van antibiotica kan de bacterie uitgroeien en toxinen produceren met diarree en darmontstekingen als gevolg (Martin et al., 2016).

Ook bij verschillende diersoorten wordt *C. difficile* regelmatig gevonden (Hensgens et al., 2012). Bij biggen is *C. difficile* een belangrijke oorzaak van neonatale diarree en bij kalveren zijn er aanwijzingen voor een rol van *C. difficile* in kalverdiarree (Keessen et al., 2011). De vraag in hoeverre *C. difficile* zoönotisch kan zijn, is in de afgelopen jaren op verschillende manieren onderzocht. Vergelijkbare of identieke *C. difficile* types (ribotypes 012, 033, 078) en isolaten worden zowel bij mensen als bij dieren (e.g. kalveren en biggen) gevonden (Hensgens et al., 2012; Knetsch et al., 2014; Koene et al., 2012; Werner et al., 2020). Met behulp van whole genome sequencing (WGS) is daarnaast aangetoond dat er een sterk gelinkte verspreiding en evolutie van ribotype 078 bestaat tussen menselijke en dierlijke isolaten (Knetsch et al., 2014).

In twee studies waarbij rundveehouders en de runderen op hun bedrijf zijn vergeleken, werden geen *C. difficile* infecties bij de veehouders gevonden, terwijl bij de dieren regelmatig *C. difficile* wordt aangetroffen (Redding et al., 2021; Rodriguez et al., 2017). Tot nu toe ontbreken dit type studies vanuit Nederland, maar in een recente Nederlandse risicofactoranalyse werd contact met landbouwhuisdieren niet als risicofactor geïdentificeerd om geïnfecteerd te raken met *C. difficile* (van Dorp et al., 2019).

In Slovenië werd *C. difficile* op melkveebedrijven gevonden in mestmonsters van 10% van de volwassen koeien en van 35% van de kalveren jonger dan 6 maanden (Bandelj et al., 2016). De meest

recente prevalentieschatting voor Nederland stamt uit 2009/2010 waar in een slachthuisstudie bij 1% van het volwassen melkvee *C. difficile* in mestmonsters werd gevonden (Koene et al., 2012).

1.2.3 *Cryptosporidium parvum*

Cryptosporidium is een eencellige parasiet die bij mensen heftige, waterdunne diarree kan veroorzaken die meestal vanzelf overgaat. Bij immuun-gecompromitteerde patiënten kan een infectie echter levensbedreigend zijn. Transmissie kan plaatsvinden van mens op mens, dier op mens en via voedsel en water (zwemmen in of drinken van gecontamineerd water). *Cryptosporidium* kent twee voor de mens belangrijke types: *Cryptosporidium hominis* en *Cryptosporidium parvum*, waarvan *C. parvum* zoönotisch kan zijn.

In 2012 en 2013 waren er opvallende stijgingen in het aantal infecties van respectievelijk *C. hominis* en *C. parvum*. Reizen bleek een belangrijke risicofactor, maar ook blootstelling aan vee, barbecueën en zwemmen in een rivier of meer (Nic Lochlainn et al., 2019; Zomer, 2014).

Bij runderen kan *Cryptosporidium* bij jonge kalveren diarree veroorzaken. Bij oudere dieren komt de parasiet veel minder vaak voor en veroorzaakt het meestal geen symptomen (Fayer et al., 2007). In de Surveillance Landbouwhuisdieren bij vleesvee werd in de mest van volwassen vleesrunderen geen *Cryptosporidium* gevonden (Cuperus et al., 2019). In een recente studie onder kalveren op melkveebedrijven in Nederland, België en Frankrijk werd een bedrijfsprevalentie van 93% gevonden (Pinto et al., 2021).

1.2.4 *ESBL-producerende E. coli*

ESBL-producerende bacteriën produceren 'Extended Spectrum β -Lactamase' enzymen. Deze enzymen kunnen een specifieke groep antibiotica afbreken, de β -lactam antibiotica zoals penicillines en cephalosporines. Bacteriën die een ESBL produceren zijn daarmee veel minder gevoelig voor deze belangrijke groep antibiotica. ESBL enzymen kunnen in verschillende bacteriën vóórkomen, *E. coli* wordt gebruikt als indicator organisme. De resistentie van ESBL-producerende bacteriën kan zich snel en efficiënt verspreiden doordat de genen die coderen voor ESBL's vaak op mobiele elementen liggen, zoals plasmiden.

Er zijn verschillende reservoirs van ESBL-producerende bacteriën aangetoond, waaronder gezelschaps- en landbouwhuisdieren, milieu en voedsel. In de ESBLAT rapportage (ESBL-Attributieanalyse, Mevius et al. (2018)) wordt beschreven dat de types ESBL-producerende *E. coli* die vaak bij mensen worden gevonden, relatief weinig teruggevonden worden in dierlijke bronnen. Dit suggereert dat vee en vlees een relatief kleine bijdrage leveren aan ESBL's bij de mens, in vergelijking tot de overdracht van mens-tot-mens. Dit wordt tevens bevestigd door een recente modelleringsstudie, waarbij berekend is wat de relatieve bijdrage is van verschillende bronnen aan ESBL-dragerschap bij mensen. De mens bleek hierbij de belangrijkste bron voor de mens (Mughini-Gras et al., 2019). Echter, een uitzondering hierop vormen mensen die beroepsmatig veel contact met dieren hebben, zoals pluimvee- en varkenshouders. De ESBL types in deze bevolkingsgroep vertonen vaak

een sterke gelijkenis met die in het eigen vee en deze mensen zijn vaker drager van ESBL-producerende *E. coli* dan mensen in de algemene bevolking (Dierikx et al., 2013; Dohmen et al., 2015). Echter, in een recente studie onder melkveehouders werd geen verband gevonden tussen de aanwezigheid van ESBL-producerende *E. coli* bij melkvee en de veehouders (Hordijk et al., 2019).

De prevalentie van ESBL-producerende *E. coli* bij landbouwhuisdieren wordt elk jaar gerapporteerd in de MARAN rapportage. In 2021 was de prevalentie bij melkvee 10,3%. De prevalentie van ESBL-producerende *E. coli* bij melkvee fluctueert al jaren rond de 10% (MARAN 2022, 2022). Bij jonge kalveren op Nederlandse melkveebedrijven werd een hogere prevalentie van ESBL-producerende *E. coli* gevonden (19,3%) in vergelijking tot het volwassen melkvee (<1%, Heuvelink et al. (2019)).

1.2.5 *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes is een ubiquitair voorkomende bacterie, die onder andere voorkomt in feces, grond, water en op vegetatie. Onder bepaalde omstandigheden, zoals op voedsel in de koelkast, kan deze bacterie zich vermeerderen, terwijl veel andere soorten door de lage temperatuur juist worden geremd. Ook kan *Listeria* zich in voedsel productieomgevingen, vaak gedurende langere tijd, in biofilms ophouden. Veel dieren dragen *Listeria* zonder symptomen bij zich en scheiden deze uit in de feces.

Mensen raken vooral geïnfecteerd door de consumptie van met *Listeria* besmet voedsel. Humane *Listeria* infecties worden voornamelijk toegeschreven aan de consumptie van fruit, groente en zuivel (Benincà et al., 2021; Mughini-Gras et al., 2022). Met behulp van WGS is het sinds enkele jaren mogelijk om *Listeria* stammen van patiënten heel direct te koppelen aan voedselbronnen. In oktober 2019 werd bekend gemaakt dat met behulp van deze techniek een cluster van 20 patiënten kon worden gekoppeld aan vleeswaren van één specifiek bedrijf (RIVM, 2019).

Sinds 2005 bestaat een geïntensiveerde surveillance van *Listeria monocytogenes* in Nederland, vanaf 2008 is deze pathogeen daarnaast meldingsplichtig bij mensen. In 2020 werden 95 patiënten gemeld, in 2019 was de hoogste incidentie te zien sinds de meldingsplicht met 120 gevallen (Vlaanderen et al., 2020).

Bij onderzoek van de NVWA naar vóórkomen van *L. monocytogenes* in levensmiddelen wordt regelmatig *Listeria* geïsoleerd en ook vanuit vers rund- of kalfsvlees (5-10%) of rauw te consumeren vleesbereidingen (15-20%, bijv. filet americain, ossenworst etc., Vlaanderen et al. (2020) en persoonlijke communicatie Ben Wit). In twee recente studies uit Noorwegen en Letland werd in 20-30% van de mestmonsters van melkveebedrijven *Listeria monocytogenes* gevonden (Idland et al., 2022; Terentjeva et al., 2021).

1.2.6 *Meticilline-resistente Staphylococcus aureus (MRSA)*

S. aureus is een bacterie die bij veel mensen en dieren voorkomt op de huid of de slijmvliezen. Het merendeel van deze dragers heeft geen klachten. Wanneer er echter beschadigingen van de huid zijn kunnen er wond- of invasieve infecties ontstaan.

MRSA zijn *S. aureus* die ongevoelig zijn voor β -lactam antibiotica zoals penicilline of cephalosporines. MRSA infecties bij mensen waren in eerste instantie geassocieerd met ziekenhuizen en verpleeghuizen (hospital acquired of HA-MRSA), maar werd later ook in de algemene bevolking (community acquired of CA-MRSA) en in landbouwhuisdieren (livestock associated of LA-MRSA) aangetroffen. Sinds het begin van deze eeuw is het duidelijk dat LA-MRSA kan worden overgedragen van landbouwhuisdieren naar mensen die veelvuldig contact met deze dieren hebben (Wagenaar & Van de Giessen, 2009). Recente ontdekkingen lijken erop te wijzen dat LA-MRSA ook van mens-tot-mens kan worden overgedragen en daarmee vervagen de grenzen tussen de verschillende MRSA types (Bal et al., 2016; Bosch et al., 2016).

In 2011 werd voor het eerst een homoloog van het MRSA-gen *mecA*, dat codeert voor β -lactam resistentie, gevonden in zowel humane als dierlijke monsters genaamd *mecC* (Garcia-Alvarez et al., 2011; Shore et al., 2011). Alhoewel dit type MRSA in meerdere landen in melkmonsters of bij melkvee is aangetroffen, is *mecC* niet specifiek voor melkvee. Ook de humane gevallen van *mecC* MRSA zijn niet alleen te herleiden tot contact met melkvee (Lindgren et al., 2016).

In Nederland zijn in 2011/2012 huidswabs van melkvee in het slachthuis getest op de aanwezigheid van MRSA. Er werd een prevalentie van 3,9% gevonden (van Duijkeren et al., 2014). Alle isolaten behoorden tot het bekende LA-MRSA complex 398 en er werden geen isolaten met het *mecC* gen gevonden. Onder Nederlandse melkveehouders is niet eerder gekeken naar dragerschap van MRSA. In een studie uit België werden onder melkveehouders geen MRSA dragers gevonden, in tegenstelling tot varkens- en vleeskalverhouders (Vandendriessche et al., 2013).

1.2.7 *Salmonella*

Salmonella is een bacterie die voorkomt in de darmen van dieren en bij zowel mens als dier diarree kan veroorzaken. Een infectie door *Salmonella* komt in Nederland veel voor, naar schatting lopen zo'n 17.000 mensen per jaar salmonellose op, waarvan ongeveer 1.000 personen in het ziekenhuis moeten worden opgenomen (Benincà et al., 2021). Humane *Salmonella* infecties worden slechts voor een klein deel (<10%) toegeschreven aan runderen (Mughini-Gras et al., 2014; Vlaanderen et al., 2020).

Er is geen verplichte *Salmonella* monitoring voor melkvee in Nederland, wel moeten melkveehouders in het kader van de zuivelkwaliteitssystemen aan hun zuivelonderneming kunnen aantonen dat zij onderzoek doen naar antilichamen in tankmelk (uitgevoerd door Qlip). Wanneer na optimalisatie van de bedrijfsvoering en na 12 maanden nog altijd antilichamen in de tankmelk worden gevonden, wordt aangeraden om de *Salmonella* dragende koeien op te sporen en af te voeren. Op basis van serologie op tankmelk waren in het laatste kwartaal van 2021 95% van de deelnemende melkveebedrijven onverdacht voor *Salmonella* (GD, 2021). Een prevalentie op basis van kweek uit mestmonsters is voor Nederlands melkvee niet bekend. In een recente studie uit Spanje werd een bedrijfsprevalentie van 3,7% gevonden (Hurtado et al., 2017). In de Surveillance Landbouwhuisdieren

uit 2017 onder Nederlands vleesvee werd op 4,9% van de bedrijven *Salmonella* aangetroffen (Cuperus et al., 2019).

1.2.8

Shiga-toxine producerende Escherichia coli (STEC)

STEC zijn *E. coli* bacteriën die Shiga toxine produceren. Symptomen van STEC-infecties bij mensen kunnen variëren van milde diarree tot gecompliceerde bloederige diarree (colitis). In 2-7% van de gevallen kan het hemolytisch uremisch syndroom (HUS) optreden wat gepaard gaat met acuut nierfalen. Humane STEC infecties zijn in Nederland meldingsplichtig sinds 2007. In 2020 werden in totaal 323 patiënten gemeld (Vlaanderen et al., 2020).

Net als andere pathogene *E. coli*, wordt STEC serologisch getypeerd naar O- en H- antigenen. STEC O157:H7 is het meest bekende serotype, maar er zijn meer dan 200 STEC serotypen beschreven. Recent is door EFSA een rapport gepubliceerd wat aangeeft dat alle serotypen in principe kunnen leiden tot ernstig verloop infecties (BIOHAZ et al., 2020). In de afgelopen 10 jaar zijn bij Nederlandse humane patiënten O26, O63, O103, O145 en O146 samen met O157 de meest voorkomende serotypen (Vlaanderen et al., 2020).

Herkauwers zoals runderen, geiten en schapen vormen het belangrijkste reservoir van STEC. De bacterie wordt via de mest uitgescheiden en kan op deze manier ook op karkassen en in het milieu terecht komen.

Mensen kunnen besmet raken via voedselproducten (bijvoorbeeld het eten van onvoldoende verhit (rund)vlees of kruisbesmetting bij het bereiden) of door contact met besmette dieren of mest. Nederlandse bronattributiestudies stellen dat zo'n 50% van de humane STEC besmettingen kunnen worden toegeschreven aan rundvee (Mughini-Gras et al., 2017).

De prevalentie van STEC O157 in de Nederlandse melkveesector was 8% op bedrijfsniveau tussen 1996 en 2005 (Berends et al., 2008). De prevalentie van STEC non-O157 in melkvee in Nederland is onbekend. In de Surveillance Landbouwhuisdieren bij vleesvee (2017) werd op 24,9% van de bedrijven STEC gevonden, waarvan op 4,1% van de bedrijven het type O157 betrof (Cuperus et al., 2019).

2 Methode

2.1 Studieverloop en monsternamen

Volgens cijfers van de CBS Landbouwtelling waren er in 2020 in Nederland 15.731 melkveebedrijven.

Voor deze studie zijn alleen bedrijven geselecteerd met meer dan 50 stuks volwassen melkvee. Uit een dataset met alle melkveebedrijven in Nederland (GDI 2020, afkomstig van NVWA) zijn 250 bedrijfsrelatienummers (BRS) random geselecteerd waarbij de kans op selectie toenam met het aantal melkgevend runderen op het bedrijf (R software, probability sampling without replacement). De steekproefgrootte is berekend met behulp van Winepi.net en is gebaseerd op het aantal benodigde bedrijven om een uitspraak te kunnen doen over de prevalenties van de verschillende pathogenen met een betrouwbaarheid van 95%. Vanuit deze steekproef zijn per maand bedrijven aangeschreven, afhankelijk van de werkvoorraad van de monsternemende inspecteurs, tot het einde van de studie.

Geselecteerde bedrijven kregen een brief en informatiefolder toegestuurd en zijn door de NVWA bezocht tussen februari en december 2021. Per bedrijf werd volwassen melkvee en, indien aanwezig, twee leeftijden jongvee bemonsterd (kalveren jonger dan 4 weken en kalveren tussen 4 weken-4 maanden). In de stal van het volwassen melkvee werden vier gepoolde mestmonsters genomen van de vloer van de stal bestaande uit 12 schepjes verse mest per monster. Ook werd van deze vier monsters één mengmonster gemaakt. In de stallen van de twee leeftijden jongvee werd per leeftijd één gepoold mestmonster genomen. Voor de kalveren jonger dan 4 weken werden schepjes mest genomen uit de iglo's of eenlingboxen van zoveel mogelijk verschillende kalveren uit deze leeftijd (met een maximum van 12). Voor de kalveren van 4 weken-4 maanden werd één gepoold mestmonster genomen uit het verblijf van deze dieren, bestaande uit 12 schepjes mest.

Daarnaast werden van drie volwassen melkkoeien huidswabs genomen door met een veegdoekje langs de lieshuid te gaan (tussen de achterpoot en uier). Tenslotte werden drie stofmonsters genomen door met een veegdoekje de stangen van de ligboxen te bemonsteren. Voor de risicofactoranalyse is samen met de veehouder een digitale vragenlijst ingevuld met vragen over bedrijfskenmerken, hygiënemaatregelen en diergezondheid.

De monsters werden vervolgens gekoeld vervoerd naar Wageningen Food Safety Research (WFSR). Hier zijn de mestmonsters van volwassen melkkoeien onderzocht op het voorkomen van *Campylobacter*, ESBL-producerende *E. coli*, *L. monocytogenes* en *Salmonella*. Voor *C. difficile* en STEC werd één mengmonster geanalyseerd. De veegdoekjes zijn door WFSR onderzocht op de aanwezigheid van MRSA. De mestmonsters van de kalveren zijn onderzocht op de aanwezigheid van *C. difficile* en ESBL-producerende *E. coli*.

Ingevroren mestmonsters werden verstuurd naar het RIVM. Hier zijn de monsters van de kalveren onderzocht op de aanwezigheid van *Cryptosporidium*.

Parallel aan de bedrijfsbezoeken bij de melkveehouderijen zijn bedrijven benaderd voor deelname aan het humane deel van het onderzoek. Hierbij werden veehouders, gezinsleden en medewerkers (≥ 18 jaar) gevraagd twee ontlastingsmonsters (één regulier monster en één monster in DNA/RNA Shield vloeistof voor de microbioomanalyse), een fecesswab en een neusswab af te nemen en deze per reguliere post terug te sturen naar het RIVM. Deze materialen zijn door het RIVM onderzocht op de aanwezigheid van *Campylobacter*, *C. difficile*, *Cryptosporidium*, ESBL-producerende *E. coli*, *L. monocytogenes*, *Salmonella* en STEC. Tevens werd deze deelnemers gevraagd om een vragenlijst met achtergrondinformatie in te vullen.

2.2 Microbiologische analyse

2.2.1 *Campylobacter*

2.2.1.1 *Melkvee*

De kweekmethode is gebaseerd op ISO 10272 deel 1B: Microbiology of food and feeding stuff – Horizontal method for detection and enumeration of *Campylobacter* spp. Part 1B 'Detection in products with high background of non-campylobacters'. Een fecesswab werd opgehoopt in 10 ml Preston bouillon en na bebroeding afgestreeken op Modified Charcoal Cefoperazone Deoxycholate Agar (mCCDA). Een selectie van isolaten van *Campylobacter* werden getest op gevoeligheid voor verschillende klassen antibiotica met de Micro Broth Dilution methode gelijkwaardig aan ISO 20776. Gebruikte panels van antibiotica zijn conform EU regelgeving voor monitoring van antimicrobiële resistentie (AMR, uitvoeringsbesluit (EU) 2020/1729).

2.2.1.2 *Humaan*

De deelnemers hebben via de reguliere post een ontlastingsmonster en een fecesswab (Transwab met Cary Blair medium) opgestuurd. Na ontvangst werd dezelfde dag de kweek voor *Campylobacter* ingezet. De swab werd direct afgestreeken op mCCDA en vervolgens opgehoopt in 5 ml Preston bouillon. Daarnaast werd ongeveer 1 gram ontlasting afgewogen en opgehoopt in 9 ml Preston bouillon. Incubatie vond plaats onder micro-aerofiele condities bij 41,5 °C, de ophopingen 24 uur en de mCCDA-plaat 48 uur. Van beide ophopingen werd 10 µl met een öse afgestreeken op mCCDA en 48 uur geïncubeerd. Koloniën op deze plaat zijn microscopisch beoordeeld en wanneer *Campylobacter* verdacht werden ze bevestigd met behulp van de MALDI-TOF.

Naast de kweek voor *Campylobacter* werd ook een PCR direct op ontlasting uitgevoerd. Ontlasting, ruwweg 1:1 gemengd met TSB met 20% glycerol, werd opgeslagen bij -80°C. Uit 200 mg van deze monsters is DNA geïsoleerd met de QIAmp Fast DNA Stool Mini Kit volgens het protocol van de fabrikant. De qPCR is uitgevoerd zoals eerder beschreven (Jensen et al., 2005) voor *C. coli* en *C. jejuni* met toevoeging van een aangepaste competitive internal amplification control (Opsteegh et al., 2010).

2.2.2 *Clostridioides difficile*

2.2.2.1 Melkvee

De detectie van *Clostridioides difficile* in mest van melkvee (één mengmonster per bedrijf) is gebaseerd op een selectieve ophoping, isolatie op selectief agarmedium en aansluitend bacteriële identificatie van de karakteristieke koloniën met behulp van de MALDI Biotyper. De methode is deels gebaseerd op de methode beschreven door Rodriguez-Palacios et al. (2007). Per monster werd 5 g mest toegevoegd aan 45 ml *Clostridioides difficile* broth moxalactam, norfloxacin, cysteine hydrochloride (CDEB MOD) medium, gehomogeniseerd en vervolgens 10 dagen anaeroob geïncubeerd bij 37°C. Daarna werd 2 ml van de ophopingsvloeistof gemengd met 2 ml alcohol (absolute), gehomogeniseerd en afgedraaid (3.800xg voor 10 min). Deze pellet werd met een 1 µl öse afgestreken op *Clostridioides difficile* moxolactam norfloxacin (CDAMN) met 7% paardenbloed agar. De platen werden gedurende 2 dagen anaeroob bij 37°C geïncubeerd en beoordeeld op karakteristieke grijswitte, zwermende, niet-hemolytische en ruwe koloniën. Verdachte losliggende koloniën (1-5 per plaat) werden reingestroken op Columbia schapenbloedagar. De platen werden 48 uur anaeroob bebroed bij 37°C. Tenslotte werden de koloniën geïdentificeerd met de MALDI Biotyper. Bevestigde *C. difficile* isolaten werden opgestuurd naar het Referentielaboratorium *C. difficile* (LUMC) voor ribotypering en bepaling van de aanwezigheid van toxine genen.

2.2.2.2 Humaan

Ontlasting, ruwweg 1:1 gemengd met TSB met 20% glycerol, werd opgeslagen bij -80°C. Van deze monsters werd 1 gram gemengd met 9 ml *Clostridioides difficile* broth (CDBMN). Deze oplossing werd 12 dagen anaëroob geïncubeerd bij 37°C. Vervolgens werd met een öse 10 µl afgestreken op chromID *Clostridioides difficile* agar. Daarnaast is met dezelfde oplossing een alcoholshock uitgevoerd (50 min incubatie bij kamertemperatuur van 2 ml ophoping gemengd met 2 ml 96% ethanol) en na afdraaien (3800xg, 10 min) met een 1 µl öse pelletmateriaal afgestreken op chromID *Clostridioides difficile* agar. De platen werden beoordeeld na 2-3, 4 en 5 dagen anaëroob incuberen bij 37°C. *Clostridioides* verdachte koloniën werden reingestroken op Columbia schapenbloed agar en 48 uur anaëroob geïncubeerd bij 37°C. Verdachte koloniën op de bloedplaten werden bevestigd met MALDI-TOF.

2.2.3 *Cryptosporidium parvum*

2.2.3.1 Melkvee en humaan

Er werd 2 gram fecesmonster afgewogen en gemengd met 7 ml lysis buffer (100 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA, 200 mM NaCl, 0,4% SDS, pH 8,0) in een 15 ml buis. Het monster werd gelyseerd doormiddel van bead-beating in combinatie met de daarop volgende incubatie stap van 30 minuten bij 98 °C. Na incubatie werd 5 ml lysis buffer en 2 ml water toegevoegd, waarna het monster 15 minuten bij 3500 g werd gecentrifugeerd. Het supernatant werd afgepipetteerd in een schone 15 ml buis en gebruikt voor de Magnetic Capture. Magnetic Capture is een methode waarbij het doel-DNA (*gp60* gen van *C. parvum*) uit het monster wordt gevangen door het gebruik van specifieke biotine gelabelde capture oligo's, magnetische beads gecoat met streptavidine (Dynabeads M-270) en magneten (Opsteegh et al., 2010). Het verzamelde DNA werd met een real-time PCR gescreend op de

aanwezigheid van *C. parvum*. Bij een positieve PCR uitslag werd het *gp60* gen gesequenced en op basis van de sequentie werd een typering uitgevoerd (Alves et al., 2003; Yanta et al., 2021).

2.2.4 *ESBL-producerende E. coli*

2.2.4.1 *Melkvee*

Een fecesswab werd rechtstreeks afgestreken op MacConkey agar met cefotaxime (1 mg/l) en opgehoopt in BPW en na incubatie (16-20 uur bij 37°C) eveneens afgestreken op MacConkey agar met cefotaxime. Bevestiging van verdachte *E. coli* vond plaats met MALDI-TOF. Karakteristieke isolaten werden verzameld en getest op antibiotica gevoeligheid door WFSR, de aanwezigheid van ESBL-genen werd door RIVM bepaald zoals beschreven bij de humane isolaten (zie hieronder). De ESBL verdachte isolaten werden getest op gevoeligheid voor verschillende klassen antibiotica met de Micro Broth Dilution methode gelijkwaardig aan ISO 20776. Gebruikte panels van antibiotica zijn conform EU regelgeving voor monitoring van antimicrobiële resistentie (AMR, uitvoeringsbesluit EU 2020/1729).

2.2.4.2 *Humaan*

Met een swab werd materiaal van het opgestuurde ontlastingsmonster uitgestreken op zowel Brilliance *E. coli*/coliform selective agar (BECSA) als BECSA met cefotaxime (1 mg/l). Daarnaast werd dezelfde swab selectief opgehoopt in 2 ml Luria Bertani (LB) broth met cefotaxime (1 mg/l). De platen en ophoping zijn overnacht geïncubeerd bij 37°C. Van de LB ophoping werd 10 µl met een öse afgestreken op BECSA met cefotaxime (1 mg/l) en de plaat werd overnacht geïncubeerd bij 37°C. Per monster zijn, indien aanwezig, drie verdachte koloniën onderzocht, bij voorkeur van de plaat zonder selectieve ophoping. Een deel van de verdachte *E. coli* koloniën (indien roze) werden bevestigd met MALDI-TOF. Alle *E. coli* isolaten zijn onderzocht op aanwezigheid van diverse ESBL/AmpC gen families (CMY, CTX-M groep 1, 2 en 9, OXA-1-like, SHV en TEM) met behulp van PCR en sequentie-analyse. Op isolaten waarbij geen van deze genen zijn gevonden, is een disk diffusie test uitgevoerd. Isolaten met een AmpC fenotype zijn vervolgens met behulp van PCR onderzocht op aanwezigheid van de ACC, ACT en DHA gen families.

2.2.5 *Listeria monocytogenes*

2.2.5.1 *Melkvee*

De methode is gebaseerd op ISO 11290-1:1996. Van 25 gram mest (of een 1:10 verdunning daarvan) werd een 1:10 verdunning gemaakt in Half Fraser bouillon en 24 uur geïncubeerd bij 30 °C. Uit deze voorophoping werden Fraser bouillon buizen en twee selectieve platen (ALOA en Listeria Prisma-plaat) beënt en gedurende 48 uur bij 37°C bebroed. Verdachte koloniën werden na reinkweek op Colombia bloedagar bevestigd met het MALDI Biotyper systeem. De *Listeria monocytogenes* isolaten zijn vervolgens geanalyseerd met behulp van WGS. Op basis van WGS zijn de isolaten genetisch gekarakteriseerd en is de serogroep, clonal complex en sequentietype bepaald. Indien uit de WGS analyse bleek dat meerdere isolaten van één bedrijf een overeenkomend sequentietype hebben is per sequentietype maar één isolaat in de analyse meegenomen. Gedurende het jaar is besloten om niet langer alle isolaten van een bedrijf (max. 5 per positief monster) met WGS te analyseren, maar maximaal één per bedrijf.

2.2.5.2 *Humaan*

Humane ontlastingsmonsters werden grotendeels op dezelfde manier als hierboven geanalyseerd. Voor de voorophoping werd gebruik gemaakt van 1 gram ontlasting in 9 ml Half Fraser bouillon. Voor selectieve platen werd gebruik gemaakt van ALOA en PALCAM platen. Verdachte koloniën van bloedagar platen werden bevestigd met MALDI-TOF voorafgegaan door een extractie met mierenzuur.

2.2.6 *MRSA*

2.2.6.1 *Melkvee*

De isolatie van MRSA werd uitgevoerd op Brilliance MRSA-2 agar na een voorophoping van de veegdoekjes in Mueller-Hinton broth met 6,5% NaCl. Brilliance MRSA-2 agar remt de groei van meticilline-gevoelige *Staphylococcus* en de meeste andere bacteriën en schimmels. Vermoedelijke MRSA koloniën zijn blauw op de Brilliance MRSA-2 agar. Bevestiging van *Staphylococcus aureus* is uitgevoerd met behulp van het MALDI Biotyper systeem. Verdachte isolaten werden bevestigd met PCR gericht op *mecA* en/of *mecC* genen.

2.2.6.2 *Humaan*

Voor de kweek van MRSA werd door deelnemers een neusswab (Dryswab) opgestuurd. De swab werd opgehoopt in 10 ml Mueller Hinton Broth met 6,5% NaCl en overnacht geïncubeerd bij 37°C. Van de ophoping werd 10 µl met een öse afgestreeken op Brilliance MRSA-2 agar en 1 ml werd overgepipetteerd naar een selectieve ophoping (9 ml Tryptone Soy Broth met 3,5 mg/l cefoxitine en 75 mg/l aztreonam). De plaat en selectieve ophoping werden overnacht geïncubeerd bij 37°C. Van de selectieve ophoping werd 10 µl met een öse afgestreeken op Brilliance MRSA2 agar en de plaat werd overnacht geïncubeerd bij 37°C. MRSA verdachte koloniën zijn met een multiplex PCR getest op aanwezigheid van de genen *lukF-PV*, *mecA*, *mecC* en *spa* (Stegger et al., 2012). Na bevestiging zijn de MRSA isolaten getypeerd op basis van WGS.

2.2.7 *Salmonella*

2.2.7.1 *Melkvee*

10 g mest werd onderzocht gelijkwaardig met ISO 6579-1. Isolaten zijn met de Check&Trace methode getypeerd op serotype. Isolaten van *S. Enteritidis* en *S. Typhimurium* werden opgestuurd naar het RIVM voor WGS analyse en moleculaire serotypering.

2.2.7.2 *Humaan*

Ongeveer 1 g ontlasting werd afgewogen in 9 ml gebufferd pepton water (BPW) en overnacht geïncubeerd bij 37°C. Van deze ophoping werd 100 µl in drie druppels aangebracht op een MRSV plaat met novobiocine. Na incubatie van 24 of 48 uur bij 41,5 °C werd van verdachte platen een reinstrijk gemaakt op Brilliance Salmonella Agar (BSA) platen. BSA platen werden 24 uur geïncubeerd bij 37°C. Indien er verdachte koloniën waren, werden per BSA plaat drie koloniën biochemisch bevestigd en geënt op bloedagar.

2.2.8 STEC

2.2.8.1 Melkvee

Fecesswabs van één mengmonster per bedrijf werden conform ISO/TS 13136 (2012) onderzocht. Kortweg bestaat dit uit een verrijking, een PCR screening op *stx*₁ en *stx*₂ genen, en isolatie in het geval van positieve PCR screening. Op basis van de diversiteit van aanwezigheid van de *stx* genen worden één of meerdere koloniën per monster verder geanalyseerd. Uit de positief gescreende monsters, werd getracht STEC te isoleren en indien succesvol, zijn met behulp van PCR de aanhechtingsgenen *eae*, *aggR* en *aaiC* gedetecteerd en is elk isolaat geanalyseerd met WGS.

2.2.8.2 Humaan

Ingevroren humane ontlasting werd ontdooid en 1 g werd overgebracht naar een buisje met 9 ml BPW en overnacht opgehoopt bij 37°C. De ophoping werd met PCR gescreend op de aanwezigheid van *stx* genen. Bij een positieve PCR screening werden er conform ISO/TS 13136 (2012) verdunningen van de ophoping uitgeplaat op BECSA en/of TBX en voor 24 uur geïncubeerd bij 37°C. In totaal werden 50 koloniën van de platen geanalyseerd om te bepalen of dit STEC betrof. Bij isolatie van STEC werd een typering van de isolaten uitgevoerd (O en H antigenen) met behulp van WGS analyse.

2.3 Bepaling van het microbioom

Voor het bepalen van het microbioom van humane deelnemers werden deelnemers die aangaven in de afgelopen 6 maanden antibiotica te hebben gebruikt uitgesloten. Ook werden deelnemers met chronische darmklachten niet meegenomen.

Voor DNA isolatie werd 1 mL ontlastingsmateriaal, verzameld in DNA/RNA Shield oplossing (Zymo Research), in een buisje gebracht met Zirconia beads (0,1 mm) en 5 glazen beads (2,5 mm). De cellen werden mechanisch gelyseerd door te bead-beaten met behulp van een fastprep, gevolgd door een hittestap. De ontstane lysaten werden gezuiverd door DNA te koppelen aan paramagnetische beads en diverse wasstappen uit te voeren voordat het genomische DNA werd geëluëerd. Dit proces is geautomatiseerd uitgevoerd in een Maxwell® RSC Instrument. Om eventuele remmende componenten uit het DNA te verwijderen werden alle monsters gezuiverd met de OneStep PCR Inhibitor Removal Kit (Zymo Research).

De hoeveelheid bacterieel DNA in de gezuiverde monsters werd gemeten met een kwantitatieve PCR, waarbij gebruik gemaakt is van universele primers op het 16S rRNA gen (Eub341F en Eub534R) (Muyzer et al., 1993).

Resultaten van de kwantitatieve PCR werden gebruikt om een gelijke hoeveelheid materiaal (100 pg DNA) te gebruiken voor de PCR, waarbij de hypervariabele V4 regio van het 16S rRNA gen geamplificeerd werd. De primers die gebruikt werden in de PCR bevatten een specifiek gedeelte voor het V4 fragment (515F en 806R), een unieke 8-nt barcode combinatie zodat elk monster gelabeld werd, en de Illumina flow cell adapter (Caporaso et al., 2018). Met het Qiaxcel Advanced Systeem

werd het ontstane fragment gecontroleerd op grootte en gekwantificeerd om de samples equimolair te kunnen poolen (Hasrat et al., 2021). De pool werd 2 keer gezuiverd door gebruik te maken van 0,9 x AMPure XP magnetische beads en gekwantificeerd met de KAPA library quantification kit. Paired-end sequencing werd uitgevoerd op een Illumina MiSeq instrument.

2.4 Data-analyse

2.4.1 Beschrijvende statistiek

De bedrijfsvragenlijsten zijn geanalyseerd om inzicht te krijgen in bedrijfsaspecten van de melkveehouderij. Leveringen van antibiotica voor de 3 maanden voorafgaand aan het bedrijfsbezoek zijn opgevraagd uit de database MediRund wanneer veehouders hiervoor toestemming hadden gegeven (93% van de deelnemende bedrijven). Deelnemers die hiervoor geen toestemming gaven vulden zelf hun eigen antibiotica gebruik in.

Per pathogeen werd de prevalentie met 95% betrouwbaarheidsinterval berekend op bedrijfs- en monsterniveau. Een bedrijf wordt positief genoemd als ten minste één van de onderzochte mengmonsters positief was voor het betreffende pathogeen. Voor het 95% betrouwbaarheidsinterval is gebruik gemaakt van de webtool van Ausvet en de Clopper-Pearson methode (<http://epitools.ausvet.com.au/content.php?page=CIProportion>).

2.4.2 Risicofactoranalyse

Ten behoeve van de risicofactoranalyse zijn de uitslagen van de microbiologische analyse gekoppeld aan de ingevulde vragenlijsten. De risicofactoranalyses zijn uitgevoerd op bedrijfsniveau.

In R (Rstudio) werd met behulp van kruistabellen meer inzicht verkregen in de data voor de risicofactoranalyse. Variabelen met te weinig variatie in de gegeven antwoorden werden niet meegenomen in de verdere analyse. Indien nodig werden de antwoordopties van categorische variabelen anders ingedeeld. Met een univariabele logistische regressie werd per ziekteverwekker gekeken naar mogelijke risicofactoren die geassocieerd zijn met infectie. Alle mogelijke risicofactoren met een p-waarde $\leq 0,10$ in de univariabele analyse zijn getest op onderlinge correlaties en interacties. Een selectie van variabelen werd vervolgens meegenomen naar de multivariabele analyse.

In de multivariabele logistische regressie werden de risicofactoren geïdentificeerd met behulp van achterwaartse selectie met significantie ($p < 0,05$) in de *likelihood ratio-test* als criterium. Op deze manier werd het best passende model gezocht. Per stap (het verwijderen van een variabele uit het model) werd gekeken of deze variabele wel of niet significant bijdraagt aan het model en of er mogelijk *confounders* (variabelen die de uitkomst van andere variabelen kunnen beïnvloeden) in het model aanwezig zijn. Indien de variabele wel significant bijdraagt aan het model of indien er *confounding* optreedt, bleef de variabele in het model.

2.4.3 *Microbioomanalyse*

De samenstelling van het microbioom van melkveehouders, gezinsleden en medewerkers werd vergeleken met het microbioom van een groep controle deelnemers (afkomstig uit vaccinatie studies van het RIVM, ontlastingsmonsters verzameld en verwerkt als beschreven in 2.3). Voor 36 deelnemers werd een controle deelnemers gevonden met dezelfde geslacht en een leeftijd die maximaal 5 jaar afweek. Voor de overige 29 deelnemers zijn deze criteria iets ruimer genomen om een match te kunnen maken, deze deelnemers zijn vergeleken met een controle deelnemer met dezelfde geslacht en dezelfde leeftijdsgroep. Hiervoor zijn 2 leeftijdsgroepen gemaakt: groep 1, 18 – 59 jaar en groep 2, 60 jaar en ouder.

Om de ruwe sequentie data te kunnen analyseren werden de reads op kwaliteit gefilterd en taxonomisch geclassificeerd met de DADA2 pipeline (Callahan et al., 2016). Alle analyses zijn uitgevoerd in R (Team, 2013). De alpha- en beta-diversiteit zijn berekend met de "phyloseq" package (McMurdie & Holmes, 2013). Voor de alpha-diversiteit werden drie indexen berekend: Shannon, Simpson en Observed. De significantie van verschillen in alpha-diversiteit werden berekend met de Wilcoxon test, voor de verschillen op compositie niveau werd de PERMANOVA test gebruikt. De mate van stedelijkheid van de deelnemers is bepaald via atlasleefomgeving.nl/check-je-plek. Hier wordt gebruik gemaakt van de omgevingsadressendichtheid van het Centraal Bureau voor de Statistiek.

3 Resultaten

3.1 Respons

In totaal zijn 185 bedrijven bezocht en bemonsterd. Van twee bedrijven zijn vanwege problemen op het laboratorium geen analyses op de monsters uitgevoerd. Van één bedrijf is geen bedrijfsvragenlijst beschikbaar.

Van de 185 bedrijven hebben 60 bedrijven ook meegedaan met het humane gedeelte van het onderzoek (32%). Van één van deze bedrijven zijn de monsters van de dieren niet geanalyseerd. In totaal deden 107 veehouders, medewerkers en gezinsleden mee. Gemiddeld waren er 1,8 deelnemers per bedrijf (range 1-6). Van alle deelnemers is een ingevulde vragenlijst ontvangen.

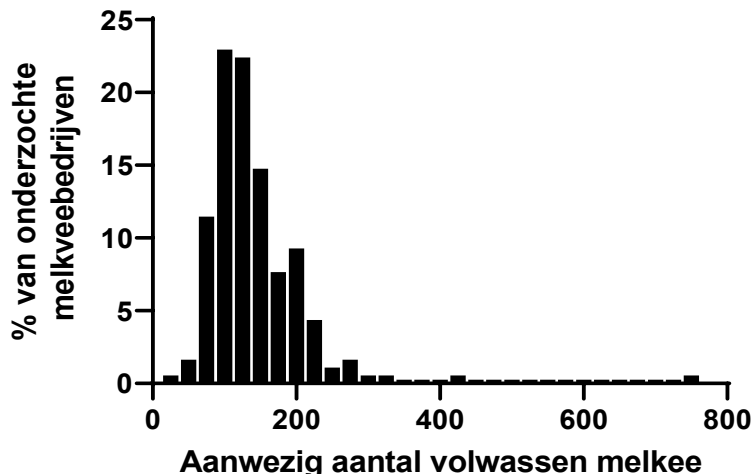
3.2 Beschrijvende statistiek melkveehouderij

De bedrijfsvragenlijsten die zijn ingevuld samen met de veehouder geven waardevolle informatie over de melkveesector. Hieronder worden verschillende bedrijfsaspecten verder toegelicht.

3.2.1 Bedrijfskenmerken

Op de melkveebedrijven in de studie werden gemiddeld 142 stuks volwassen melkvee gehouden (range 25-760, Figuur 1). Eén bedrijf had op het moment van monsternamen minder dan de afkapwaarde (zie 2.1) van 50 stuks volwassen melkvee. Daarnaast werd op de meeste bedrijven ook jongvee gehouden, gemiddeld 7 stuks jongvee <14 dagen (range 1-30), 38 stuks jongvee (range 0-250) tussen 14 dagen en 1 jaar, en 37 stuks jongvee (range 0-260) van 1-2 jaar. Op 48% van de bedrijven waren één of meer dekstieren aanwezig.

Van de onderzochte melkveebedrijven was 2% (4 bedrijven) biologisch (SKAL-keurmerk).



Figuur 1 Verdeling van het aantal aanwezige volwassen melkvee op de onderzochte melkveebedrijven

Op de onderzochte melkveebedrijven werden verschillende rundveerasen gehouden. Zwartbonte Holstein-Friesian koeien waren op 92% van de bedrijven aanwezig, gevolgd door Roodbont Holstein-Friesian (77%), Brown Swiss (17%) en Fleckvieh (17%). Op het merendeel van de bedrijven (82%) werd meer dan één ras rundvee gehouden.

Naast melkvee gaf 21% van de bedrijven aan ook ander bedrijfsmatig vee te houden. Het grootste aandeel hiervan waren vleeschapen, die op 8% van de melkveebedrijven worden gehouden. Daarnaast werden vleeskalveren (5%) en vleesrunderen (4%) relatief vaak gehouden. Op 5% van de bedrijven was naast het melkvee een niet-agrarische bedrijfstak aanwezig (bijv. recreatie, kinderopvang).

3.2.2 *Melk en zuivel*

De melkgevende koeien op de onderzochte bedrijven produceerden gemiddeld 9.248 liter per koe per jaar (range 5.970-12.800). Voor 98% van de bedrijven was de zuivelfabriek de belangrijkste afnemer van melk, voor 3 bedrijven was zelfverwerking het belangrijkste. In totaal verkochten 13 bedrijven (7%) zelf rauwe melk en/of andere zuivelproducten.

Op 61% van de bedrijven werd conventioneel gemolken (groepsgewijs in de melkput), op 38% van de bedrijven werd gebruik gemaakt van een melkrobot en tenslotte werd op 1 bedrijf op de grupstal gemolken.

3.2.3 *Aan- en afvoer*

Van de onderzochte melkveebedrijven gaf 60% aan een volledig gesloten bedrijfsvoering te hebben, daarnaast gaf 10% aan dat er sprake was van een veterinaire eenheid met een jongveebedrijf elders. Een veterinaire eenheid van meerdere locaties met rundvee wordt door onder andere de GD Diergezondheid gezien als één rundveekoppel met gelijke diergezondheidsstatussen.

Op de niet-gesloten bedrijven (29%) werd in het afgelopen jaar gemiddeld 20 dieren aangevoerd (range 1-185). Op 15 bedrijven zijn in het afgelopen jaar dieren uit het buitenland aangevoerd, voornamelijk uit Duitsland (12 bedrijven).

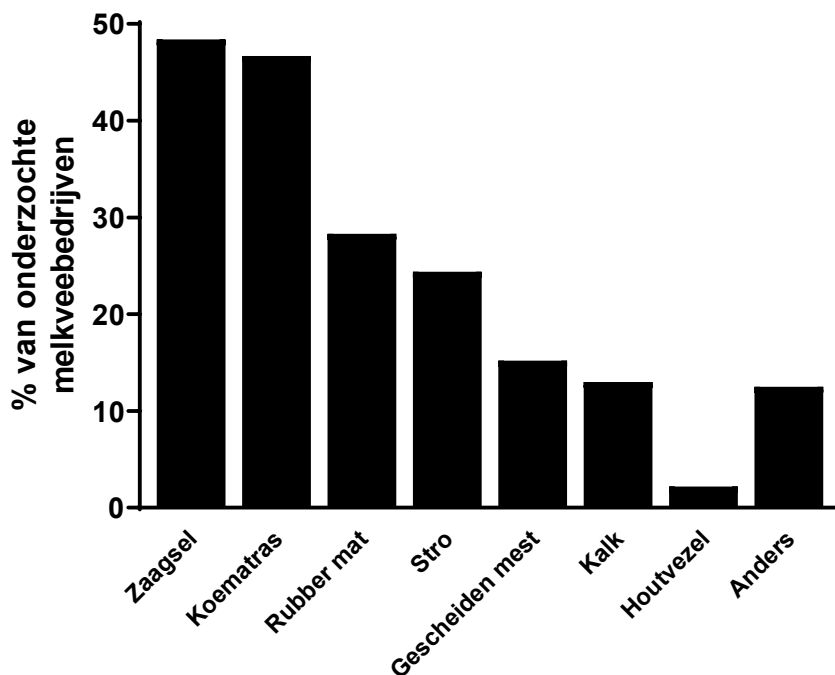
Gemiddeld worden 60% van de vaarskalveren aangehouden voor het eigen bedrijf. De overtollige vaarskalveren worden grotendeels verkocht voor de vleeskalverhouderij (84%). Stierkalveren worden op vrijwel alle bedrijven verkocht (97%).

3.2.4 *Huisvesting, weidegang en voeding*

Op de meeste onderzochte melkveebedrijven (91%) worden alle melkgevende koeien in één stal gehuisvest. Verreweg het meest gebruikte staltype is de ligboxenstal (99%). Op twee bedrijven was een ander staltype aanwezig: een grupstal en een serrestal. Gemiddeld waren er per bedrijf voor alle runderen samen 2 aparte stallen aanwezig (range 1-7).

Verschillende materialen werden gebruikt als bodembedekking (Figuur 2). Bij 93% van de bedrijven komt het gebruikte strooisel geheel of deels van eigen teelt.

De jongste kalveren worden op de meeste bedrijven (70%) buiten in iglo's gehuisvest. Op een leeftijd van gemiddeld 3 weken (range 1-14 weken) verhuizen de kalveren naar groepshuisvesting, meestal (73%) in een stal apart van het melkvee. Op 58% van de bedrijven zijn dit vaste groepen kalveren, bij de overige 42% van de bedrijven worden individuele kalveren toegevoegd of verplaatst.



Figuur 2 Gebruikte bodembedekking in de onderzochte melkveebedrijven

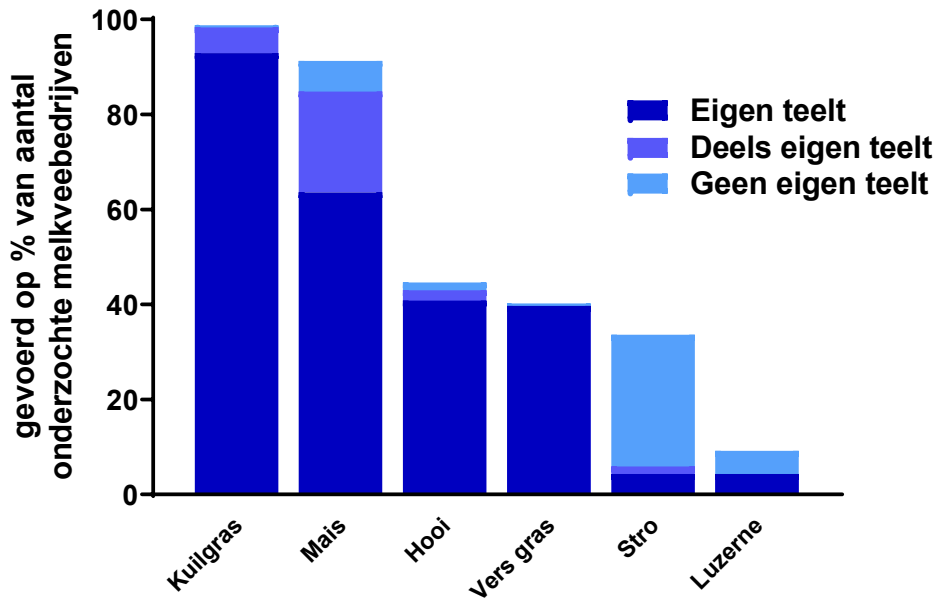
Op 77% van de bedrijven is er sprake van weidegang voor de melkgevende koeien, gemiddeld 158 dagen per jaar (range 40-260). Voor het jongvee was er bij 67% van de bedrijven sprake van weidegang, vanaf een leeftijd van gemiddeld 9-10 maanden (range 1-18 maanden).

Er werden verschillende soorten ruwvoer gevoerd op de onderzochte melkveebedrijven (Figuur 3), het meest gevoerde ruwvoer is kuilgras (99%). Op 86% van de bedrijven worden extra mineralen gevoerd.

Op 64% van de bedrijven wordt grondwater gebruikt als drinkwater in de stal van het melkvee. Ook voor het drinkwater op de weide wordt het meeste gebruik gemaakt van grondwater (49%), daarnaast maakt 29% van de bedrijven op de weide gebruik van oppervlaktewater en 15% van leidingwater.

Jonge kalveren worden zowel met koemelk als met kunstmelk gevoerd. Hierin is een verschil te zien tussen vaarskalveren en stierkalveren. De meeste vaarskalveren (43%) worden uitsluitend met kunstmelk

gevoerd, terwijl stierkalveren vaker (48%) uitsluitend met koemelk worden gevoerd.

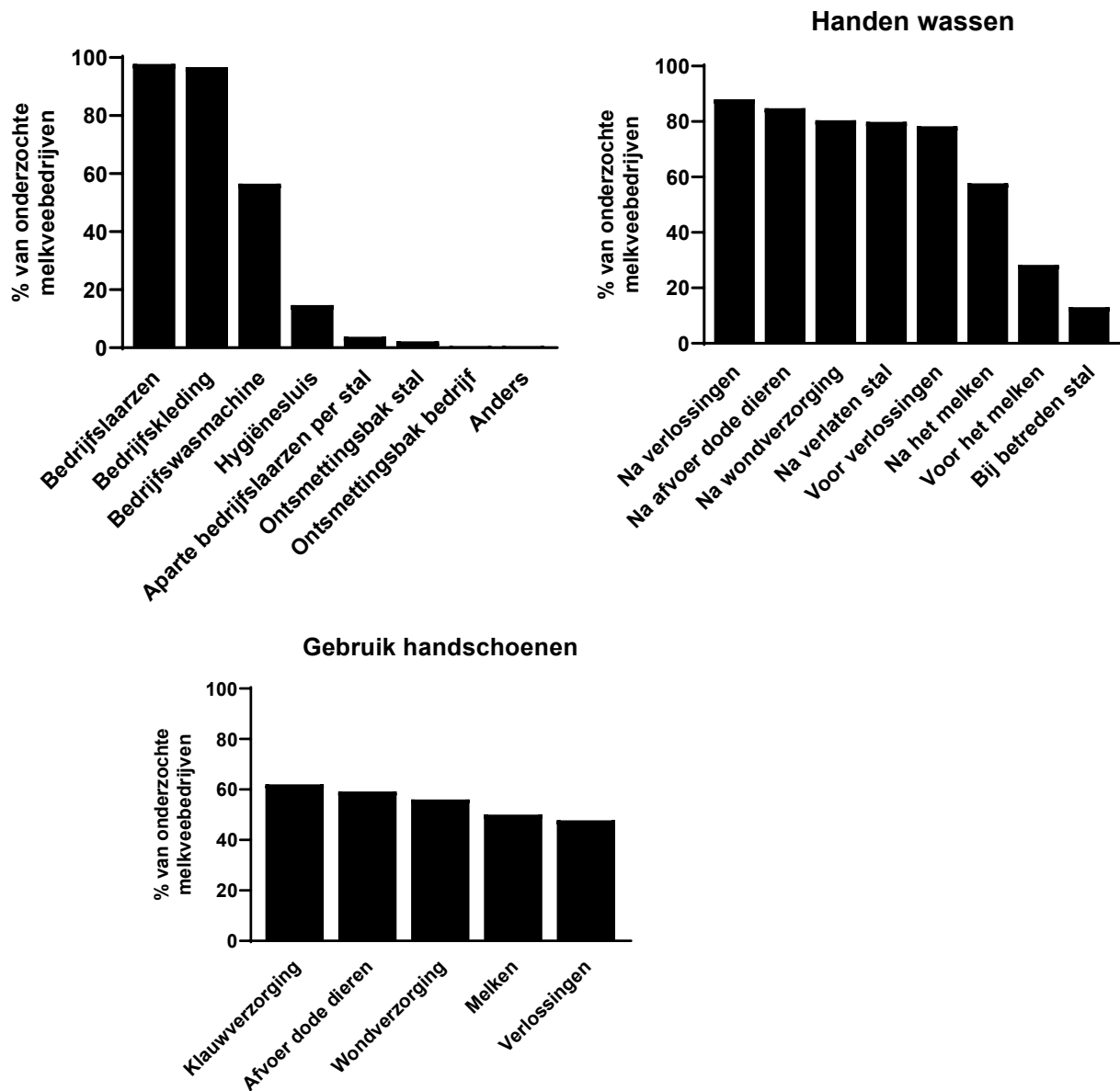


Figuur 3 Gevoerde soorten ruwvoer op de onderzochte melkveebedrijven

3.2.5

Hygiëne

De gebruikte hygiënemaatregelen op de bezochte melkveebedrijven zijn weergegeven in Figuur 4. Op vrijwel alle bedrijven worden bedrijfslaarzen en bedrijfskleding gebruikt. Het gebruik van een hygiënesluis of een ontsmettingsbak is veel minder gebruikelijk bij de onderzochte melkveebedrijven. Op verreweg de meeste bedrijven worden handen gewassen na verlossingen, wondverzorging en het verlaten van de stal. Het wassen van handen rondom het melken is minder gebruikelijk. Op 50-60% van de onderzochte melkveebedrijven worden handschoenen gebruikt voor onder andere klauwverzorging, wondverzorging en melken.



Figuur 4 Gebruikte hygiënemaatregelen op de onderzochte melkveebedrijven. a) algemene hygiënemaatregelen, b) handen wassen, c) gebruik handschoenen

Van de beroepsgerelateerde bezoekers kwamen de dierenarts (100%) en de voerforlichter (92%) het vaakst in de stallen van het melkveebedrijf. Daarnaast zijn ook de klauwverzorger (64%), handelaar (46%) en inseminator (43%) regelmatige bezoekers van veel melkveebedrijven. Op 61 onderzochte melkveebedrijven (33%) komen ook niet-beroepsgerelateerde bezoekers in de stallen van het melkveebedrijf. Op het merendeel van deze bedrijven (24%) is dit slechts enkele keren per jaar. Op ongeveer de helft van deze bedrijven (23) zijn er geen speciale hygiënemaatregelen voor deze groep bezoekers.

Op 58% van de onderzochte bedrijven gaven veehouders aan dat zij in het afgelopen jaar last hadden ervaren van plaagdieren, het ging hierbij om vliegen of muggen (25%), ratten (23%), muizen (19%) en/of vogels (19%). Knaagdieren en vliegen of muggen worden op de meeste melkveebedrijven actief bestreden. Op de meeste bedrijven wordt deze

bestrijding door de veehouder zelf uitgevoerd, op een minderheid van de bedrijven worden knaagdieren (30%) en vliegen of muggen (14%) door een professioneel bedrijf bestreden.

Van de bezochte bedrijven geeft 60% aan dat er soms gereedschap zonder tussendoor ontsmetten wordt gedeeld tussen verschillende stallen op het bedrijf (53%), met andere bedrijfstakken op het bedrijf (30%) of met andere bedrijven (26%). Ook voertuigen worden regelmatig gedeeld met andere bedrijven (28%) of ingehuurd van andere bedrijven (bijv. loonbedrijven, 50%).

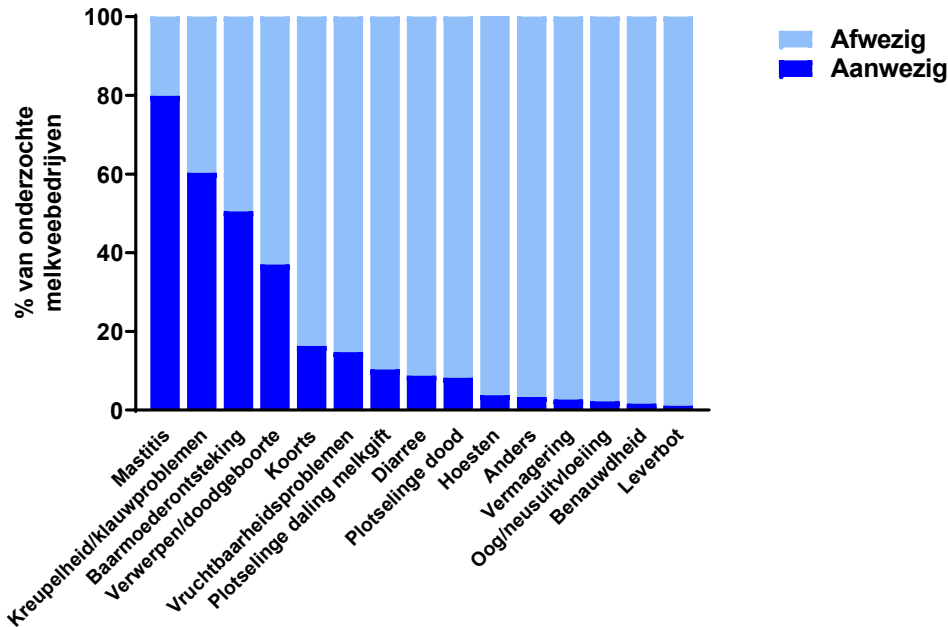
3.2.6 *Afkalven en diergezondheid*

Op 94% van de onderzochte melkveebedrijven wordt kunstmatige inseminatie toegepast. Op verreweg de meeste bedrijven (97%) gebeurt het afkalven jaarrond, in tegenstelling tot in een bepaalde periode. De gemiddelde tussenkalftijd van de melkkoeien is 403 dagen (range 330-445 dagen).

Kalveren op de meeste bedrijven (78%) krijgen alleen biest van de eigen moeder. Kunstbiest wordt vrijwel niet gebruikt (<1% van de bedrijven). Op de meeste bedrijven worden kalveren vrijwel direct na de geboorte bij de koe weggehaald, op ongeveer 10% van de bedrijven blijven kalveren langer dan 5 uur bij de koe.

Op 86% van de bedrijven werd in het halfjaar voor monsternamen bij de melkkoeien één of meerdere ziekteverschijnselen waargenomen (Figuur 5). De meest voorkomende verschijnselen waren mastitis (80%) en kreupelheid of klauwproblemen (60%). Hersenverschijnselen werden op géén van de bezochte bedrijven gerapporteerd.

Op 66% van de bedrijven worden alle gevallen van klinische mastitis behandeld met antibiotica. In het geval van subklinische mastitis (verhoogd celgetal op basis van richtlijn) ligt dit percentage lager en worden op 17% van de bedrijven in al deze gevallen antibiotica toegepast.



Figuur 5 Ziekteverschijnselen bij het melkvee op de onderzochte melkveebedrijven

Bij de jonge kalveren (<14 dagen) werden op 61% van de bedrijven ziekteverschijnselen waargenomen in het halfjaar voor monstername. In het merendeel van de gevallen ging dit om diarree (57%) en in mindere mate om longontsteking (14%) en hoesten (8%).

Bij het overige jongvee (14 dagen-1 jaar) werden op 58% van de bedrijven ziekteverschijnselen waargenomen in het halfjaar voor monstername. Bij deze dieren werden hoesten (24%) en longontsteking (22%) het meest genoemd.

Op de bezochte melkveebedrijven was de gemiddelde dierdagdosering antibiotica (DagDosering per DierJaar, DDDa) over 2020 2,38 (range 0,05-6,26). Van 8 bedrijven (4,3%) lag de DDDa boven de 5, de benchmarkwaarde voor aanvaardbaar gebruik vastgesteld door de Autoriteit Diergeneesmiddelen (SDa, 2022).

Op 94% van de bedrijven werd in de 3 maanden voor monstername antibiotica geleverd voor het volwassen melkvee (Tabel 1). Voor jongvee jonger dan 7 weken werd op 31% van de bedrijven antibiotica geleverd, voor oudere jongvee (tot 2 jaar) gold dit voor 15% van de bedrijven. De meest gebruikte klasse antibiotica was verschillend voor de verschillende leeftijden runderen (Tabel 1): voor volwassen melkvee werden penicillines het vaakst gebruikt (87%), voor het jongste jongvee waren dit aminoglycosiden (11%) en voor het oudere jongvee amfenicolen (7%). Op de onderzochte melkveebedrijven werd in de onderzochte maanden geen gebruik gemaakt van polymyxine antibiotica.

Tabel 1 Levering van antibiotica op de onderzochte melkveebedrijven in de 3 maanden voor de monstername (gebaseerd op informatie uit MediRund)

	Volwassen melkvee	Jongvee jonger dan 7 weken	Jongvee ouder dan 7 weken
Totaal	94,0%	31,5%	14,7%
Penicillines	87,0%	10,9%	2,7%
Tetracyclines	63,6%	1,6%	2,7%
Sulfonamiden/trimethoprim	60,3%	3,3%	1,1%
Aminoglycosiden	36,0%	11,4%	0,5%
Cephalosporines	29,9%	Niet gebruikt	Niet gebruikt
MLS*	26,6%	6,0%	3,3%
Amfenicolen	2,7%	10,3%	7,1%
Fluorochinolonen	1,1%	Niet gebruikt	Niet gebruikt

*Macrolide, lincosamide en streptogram antibiotica

Op 73% van de onderzochte melkveebedrijven worden de runderen tegen één of meer ziekteverwekkers gevaccineerd. Het meest wordt gevaccineerd tegen IBR (infectieuze bovine rhinotracheïtis, 40%) en daarnaast ook tegen pinkengriep (30%), kalverdiarree (27%) en BVD (bovine virus diarree) (26%).

3.3 Zoönotische pathogenen bij melkvee

3.3.1 Prevalentie volwassen melkvee

Alle onderzochte pathogenen zijn aangetoond op melkveebedrijven met een prevalentie variërend van 2,2% voor *Salmonella* tot 90,6% voor *Campylobacter* op bedrijfsniveau (Tabel 2) en van 1,1% voor *Salmonella* tot 79,3% voor *Campylobacter* op monsterniveau (Tabel 3).

Tabel 2 Prevalentie van de onderzochte pathogenen in volwassen melkvee op bedrijfsniveau

	Aantal bedrijven	Aantal positief	Prevalentie	95% BI#	
<i>Campylobacter</i>	181	164	90,6%	85,4-94,4%	
<i>Clostridioides difficile</i>	156	6	3,8%	1,4-8,2%	
ESBL-producerende <i>E. coli</i> *	183	15	8,2%	4,7-13,2%	
<i>Listeria monocytogenes</i>	181	61	33,7%	26,9-41,1%	
MRSA	Stof	181	10	5,5%	2,7-9,9%
	Huid	181	8	4,4%	1,9-8,5%
	Totaal	181	11	6,1%	3,1-10,6%
<i>Salmonella</i>	183	4	2,2%	0,6-5,5%	
STEC	182	39	21,4%	15,7-28,1%	

95% betrouwbaarheidsinterval

* Op 20 bedrijven werden ESBL/AmpC-verdachte koloniën gevonden, op 15 bedrijven werd de aanwezigheid van ESBL-producerende *E. coli* bevestigd. Op 6 bedrijven werd AmpC-producerende *E. coli* aangetroffen.

Tabel 3 Prevalentie van de onderzochte pathogenen in volwassen melkvee op monsterniveau

	Aantal monsters	Aantal positief	Prevalentie	95% BI#
<i>Campylobacter</i>	724	574	79,3%	76,1-82,2%
<i>Clostridioides difficile</i> *	nvt	nvt	nvt	nvt
ESBL-producerende <i>E. coli</i> **	732	31	4,2%	2,9-6,0%
<i>Listeria monocytogenes</i>	724	124	17,1%	14,5-20,1%
MRSA	Stof	18	3,3%	2,0-5,2%
	Huid	11	2,0%	1,0-3,6%
<i>Salmonella</i>	732	8	1,1%	0,5-2,1%
STEC*	nvt	nvt	nvt	nvt

95% betrouwbaarheidsinterval

* Deze pathogenen zijn in één mengmestmonster per bedrijf onderzocht

** In 42 monsters werden ESBL/AmpC-verdachte koloniën gevonden, in 31 isolaten is de aanwezigheid van ESBL-producerende *E. coli* bevestigd. Daarnaast werden 10 isolaten bevestigd als AmpC-producerende *E. coli*. Eén isolaat kon niet worden bevestigd als ESBL of AmpC-producerend.

3.3.2 Prevalentie kalveren

Bij jonge kalveren (<4 weken) en oudere kalveren (4 weken-4 maanden) werden *C. difficile*, ESBL-producerende *E. coli* en *Cryptosporidium parvum* onderzocht. Bij oudere kalveren (4 weken-4 maanden) is slechts een deel van de bedrijven onderzocht op *Cryptosporidium parvum*. Per bedrijf werd één mengmestmonster onderzocht. Alle onderzochte pathogenen werden gevonden (Tabel 4 en Tabel 5).

Tabel 4 Prevalentie van de onderzochte pathogenen in jonge kalveren (<4 weken)

	Aantal bedrijven	Aantal positief	Prevalentie	95% BI#
<i>Clostridioides difficile</i>	143	25	17,5%	11,6-24,7%
<i>Cryptosporidium parvum</i>	117	84	71,8%	62,8-79,7%
ESBL-producerende <i>E. coli</i> *	167	11	6,6%	3,3-11,5%

95% betrouwbaarheidsinterval

* Op 24 bedrijven werden ESBL/AmpC-verdachte koloniën gevonden, op 11 bedrijven werd de aanwezigheid van ESBL-producerende *E. coli* bevestigd. Op 13 bedrijven werden de isolaten bevestigd als AmpC-producerende *E. coli*

Tabel 5 Prevalentie van de onderzochte pathogenen in oudere kalveren (4 weken-4 maanden)

	Aantal bedrijven	Aantal positief	Prevalentie	95% BI#
<i>Clostridioides difficile</i>	151	6	4,0%	1,5-8,5%
<i>Cryptosporidium parvum</i>	78	11	14,1%	7,3-23,8%
ESBL-producerende <i>E. coli</i> *	176	8	4,5%	2,0-8,8%

95% betrouwbaarheidsinterval

* Op 12 bedrijven werden ESBL/AmpC-verdachte koloniën gevonden, op 8 bedrijven werd de aanwezigheid van ESBL-producerende *E. coli* moleculair bevestigd. Op de overige 4 bedrijven werden de isolaten bevestigd als AmpC-producerende *E. coli*

3.3.3 Prevalentie verschillen tussen leeftijdscategorieën

De prevalentie van *C. difficile* is hoger in jonge kalveren vergeleken met de prevalentie in oudere kalveren en volwassen melkvee ($p < 0,001$, Cochran's Q-test). Er is geen statistisch significant verschil tussen oudere kalveren en volwassen melkvee.

De prevalentie van *C. parvum* in jongere kalveren is significant hoger dan in oudere kalveren ($p < 0,001$, Cochran's Q-test).

De prevalentie van ESBL-producerende *E. coli* is niet significant verschillend tussen volwassen melkvee en jongere of oudere kalveren ($p > 0,05$, Cochran's Q-test).

3.3.4 Typering

3.3.4.1 *Campylobacter*

Van op één na alle *Campylobacter*-positieve monsters (573/574) is een subtypering bekend. Van deze isolaten bleek 94% *C. jejuni* te zijn, 5% *C. coli*, 1% *C. lari* en tenslotte 1 isolaat (0,2%) betrof *C. hyointestinalis*.

Op 24 bedrijven werden meer dan één soort *Campylobacter* aangetroffen, op één bedrijf werd zelfs zowel *C. jejuni*, *C. coli* als *C. lari* aangetroffen.

Van 232 *C. jejuni* en *C. coli* isolaten werd de gevoeligheid voor verschillende antibiotica bepaald (Tabel 6). Er werd voornamelijk verminderde gevoeligheid voor ciprofloxacin en tetracycline gevonden en in het geval van *C. coli* werd ertapenem resistentie gevonden.

Tabel 6 Percentage verminderde gevoeligheid (volgens EFSA-guidelines) voor verschillende typen antibiotica van *C. jejuni* en *C. coli* geïsoleerd uit rundermest

Antibioticum	<i>C. jejuni</i> (n=211)	<i>C. coli</i> (n=21)
Chlooramfenicol	0,0%	0,0%
Ciprofloxacin	20,4%	33,3%
Ertapenem	0,5%	19,0%
Erythromycine	0,0%	0,0%
Gentamicine	0,0%	0,0%
Tetracycline	14,2%	42,9%

3.3.4.2 *Clostridioides difficile*

In totaal werd op 30 bedrijven in één of meer van de bemonsterde diercategorieën *C. difficile* aangetroffen (19,1% van de 157 bedrijven waarbij minstens 1 monster is onderzocht op *C. difficile*, 95% BI 13,3-26,1%). Tussen de bedrijven met positieve kalveren was veel overlap, van de 6 bedrijven met positieve oudere kalveren waren bij 4 bedrijven ook de jongere kalveren *C. difficile* positief. Van de 6 bedrijven met positief melkvee werd echter maar bij 2 bedrijven ook bij kalveren *C. difficile* gevonden.

De uitslagen van de ribotypering van *C. difficile* zijn te vinden in Tabel 7. Er werden 11 verschillende ribotypes gevonden, het meest voorkomende ribotype was 695. Voor één isolaat was het niet mogelijk om het ribotype te bepalen.

Tabel 7 Ribotypering van *C. difficile* isolaten uit rundermest

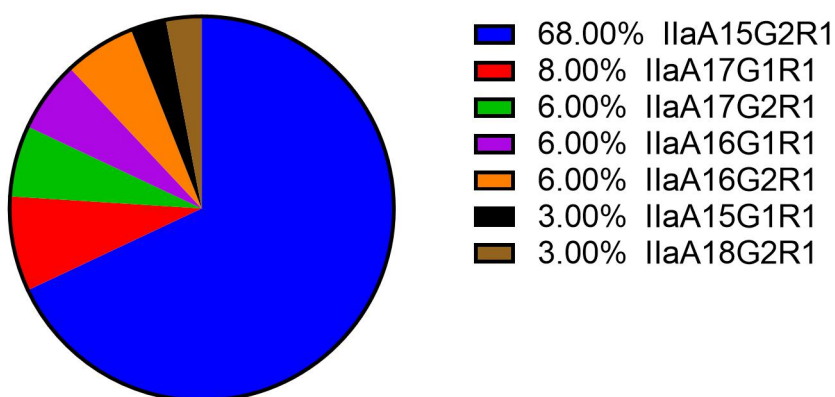
Serotype	Aantal bedrijven
005	1
033	2
035	1
050	1
054	1
078	4
081	1
126	1
288	1
657	1
695	19
Niet typeerbaar	1

Op één na alle isolaten (36/37) hebben toxinegenen voor Toxine A, 34/37 (92%) isolaten hebben toxinegenen voor Toxine B en 32/37 (86%) isolaten hebben genen voor het binaire toxine. Alle geteste isolaten waren negatief voor de aanwezigheid van het plasmide met metronidazole resistente genen.

Op 6 bedrijven werd bij meer dan één diercategorie *C. difficile* aangetroffen. Op 3 van deze bedrijven werd ook meer dan één ribotype gevonden.

3.3.4.3 *Cryptosporidium parvum*

Voor 34 *C. parvum* positieve monsters van jonge kalveren kon het subtype worden bepaald door middel van sequencing van het *gp60* gen. Er werden zeven verschillende subtypes gevonden, het meest voorkomende subtype was IIaA15G2R1 (Figuur 6).



Figuur 6 Typering van 34 *C. parvum* isolaten uit kalveren jonger dan 4 weken oud

3.3.4.4 ESBL-producerende *E. coli*

In 42 mestmonsters van volwassen melkkoeien werden ESBL-verdachte isolaten gevonden. Hiervan zijn 41 isolaten getest voor de aanwezigheid van ESBL-genen.

In 29 isolaten van 13 bedrijven werd de aanwezigheid van een ESBL-gen moleculair bevestigd, er werden zes verschillende ESBL-genen gevonden (Tabel 8). Op vier bedrijven werden twee verschillende ESBL-genen gevonden: *bla*_{CTX-M-15} in combinatie met *bla*_{CTX-M-1} of *bla*_{CTX-M-55} en *bla*_{SHV-12} in combinatie met *bla*_{CMY-2}. Daarnaast hadden 2 isolaten een ESBL fenotype, maar werden er geen ESBL-genen gevonden.

In 24 mestmonsters van jonge kalveren en 12 mestmonsters van oudere kalveren werden ESBL-verdachte isolaten gevonden. Van alle monsters is de aanwezigheid van het ESBL-gen bepaald.

In 11 monsters van jonge kalveren en monsters van oudere kalveren werd de aanwezigheid van een ESBL-gen moleculair bevestigd. Er werden bij de kalveren drie verschillende ESBL-genen gevonden (Tabel 8).

Tabel 8 Typering van ESBL-genen van bevestigde ESBL-producerende *E. coli* uit rundermest

ESBL variant	Aantal bedrijven	Aantal monsters volwassen melkvee	Aantal monsters jonge kalveren	Aantal monsters oudere kalveren
CMY-2	1	1	-	-
CTX-M-1	10	7	6	1
CTX-M-15	15	15	5	6
CTX-M-27	1	4	-	-
CTX-M-32	1	-	-	1
CTX-M-55	1	1	-	-
SHV-12	1	1	-	-

* In twee isolaten met ESBL fenotype werd geen bekend ESBL-gen gevonden

In totaal werd op 27 bedrijven bij één van de typen bemonsterde dieren ESBL-producerende *E. coli* gevonden (14,8%). Op zes bedrijven werd bij méér dan één categorie dieren ESBL-producerende *E. coli* gevonden: vier keer bij volwassen melkkoeien en één van de leeftijden kalveren, één keer bij beide leeftijden kalveren en één keer bij alle drie diergroepen.

Op één van deze bedrijven werd bij twee leeftijden een ander ESBL-gen gevonden: bij jonge kalveren *bla*_{CTX-M-15} en bij de oudere kalveren *bla*_{CTX-M-32}. Op de andere vijf bedrijven waren de gevonden ESBL-genen gelijk.

3.3.4.5 *Listeria monocytogenes*

Van 73 *Listeria monocytogenes* isolaten afkomstig van 58 bedrijven is WGS uitgevoerd, waardoor *in silico* typering kon worden gedaan (Tabel 9). Er werden *Listeria* isolaten van 25 verschillende clonal complexes en singletons gevonden. De meest voorkomende serogroep was IIb (32 bedrijven) en de meest prevalentie clonal complexen CC5 (9 bedrijven) en CC77 (8 bedrijven).

Tabel 9 Typering van *Listeria monocytogenes* isolaten (n=73) uit rundveemest

Serogroep (serotype)	Aantal isolaten/bedrijven	Clonal complex	Sequentietype	Aantal isolaten/bedrijven
IIa (1/2a, 3a)	14	CC11	ST451	4
		CC14	ST91	1
		CC18	ST18	3
		CC19	ST398	1
		CC37	ST37	4
		CC90	ST425	1
		CC200	ST200	1
		CC375	ST375	1
IIb (1/2b, 3b, 7)	32	CC5	ST5	9
		CC59	ST59	3
		CC77	ST77	8
		CC87	ST87	1
		CC191	ST191	2
		CC224	ST224	3
		CC379	ST182, ST808	2
		CC426	ST426	3
		CC489	ST489	2
		CC1000	ST1000	1
		ST773	ST773	1
IVb (4b, 4d, 4e)	20	CC1	ST1	8
		CC4	ST4	3
		CC6	ST6	6
		CC217	ST217	1
		CC388	ST388	2
		CC389	ST389	2

Op 9 bedrijven werden meerdere verschillende clonal complexes en/of serotypes aangetroffen. Gedurende het analysejaar is het selectie criterium voor WGS analyse aangepast (zie 2.2.5.1), hierdoor zijn alleen van bedrijven uit de eerste helft van het jaar meerdere isolaten per bedrijf beschikbaar.

Op basis van core genome Multi Locus Sequence Typing (cgMLST) is een fylogenetische boom gemaakt (Minimal Spanning Tree) van alle gesequente *Listeria* isolaten. Zoals verwacht clusteren de isolaten op basis van de eerder beschreven clonal complexes. Wanneer er gebruik wordt gemaakt van een afkapwaarde van maximaal 8 verschillende allelen werden er in drie van clusters isolaten van twee verschillende bedrijven gevonden. Op deze bedrijven komen dus sterk verwante *Listeria monocytogenes* isolaten voor. In één van deze clusters is er sprake van twee bedrijven die relatief dicht bij elkaar liggen (12 km afstand).

3.3.4.6 MRSA

Op 11 bedrijven werd MRSA gevonden, op zeven bedrijven in beide geteste matrices (stalstof en huidswab), op drie bedrijven alleen in het

stalstof en tenslotte bij één bedrijf alleen in de huidswab. Alle isolaten behoorden tot of waren nauw verwant aan LA-MRSA type ST398 en droegen het *mecA* gen (MARAN 2022, 2022).

3.3.4.7 *Salmonella*

Op vier bedrijven werd *Salmonella* aangetoond. Bij twee bedrijven werd *Salmonella* Dublin gevonden, bij één bedrijf *S. Typhimurium* en bij één bedrijf *S. Mbandaka*.

3.3.4.8 *STEC*

STEC werd in één mengmestmonster per bedrijf onderzocht. Op 39 bedrijven werd STEC aangetroffen. Op vier bedrijven werden binnen de geanalyseerde isolaten verschillende STEC serotypes gevonden, waardoor uiteindelijk 43 unieke STEC isolaten werden verkregen.

Er werden 22 verschillende serotypes gekarakteriseerd (Tabel 10) waarvan O182:H15 het meest voorkomend was. De STEC variant O157:H7 werd niet aangetroffen op de onderzochte melkveebedrijven. De prevalentie van *stx* en *eae* genen binnen deze isolaten is weergegeven in Tabel 11.

Tabel 10 Serotypering van STEC-isolaten uit rundermest

Serotype	Aantal bedrijven	Serotype	Aantal bedrijven
O182:H25	10	O26:H11	1
O113:H4	5	O28:H9	1
O15:H16	3	O84:H2	1
O116:H28	2	O91:H21	1
O136:H12	2	O98:H21	1
O156:H25	2	O103:H2	1
O168:H8	2	O108:H25	1
O177:H11	2	O150:H2	1
O183:H18	2	O153:H25	1
O15:H25	1	O174:H25	1
O22:H8	1	ONT:H12*	1

* O-antigeen niet typeerbaar

Tabel 11 PCR detectie van *stx* en *eae* genen bij STEC-isolaten uit rundermest

		Prevalentie
Shiga toxine genen	Alleen <i>stx</i> ₁ +	49%
	Alleen <i>stx</i> ₂ +	37%
	<i>stx</i> ₁ + en <i>stx</i> ₂ +	14%
Aanhechtingsgen	<i>eae</i> +	51%

3.4 Beschrijvende statistiek humane deelnemers

In totaal hebben 107 deelnemers, afkomstig van 60 bedrijven deelgenomen aan de humane studie. Van deze deelnemers waren 69 man (64,5%) en 38 vrouw (35,5%). De gemiddelde leeftijd was 47 jaar (range 18-76 jaar).

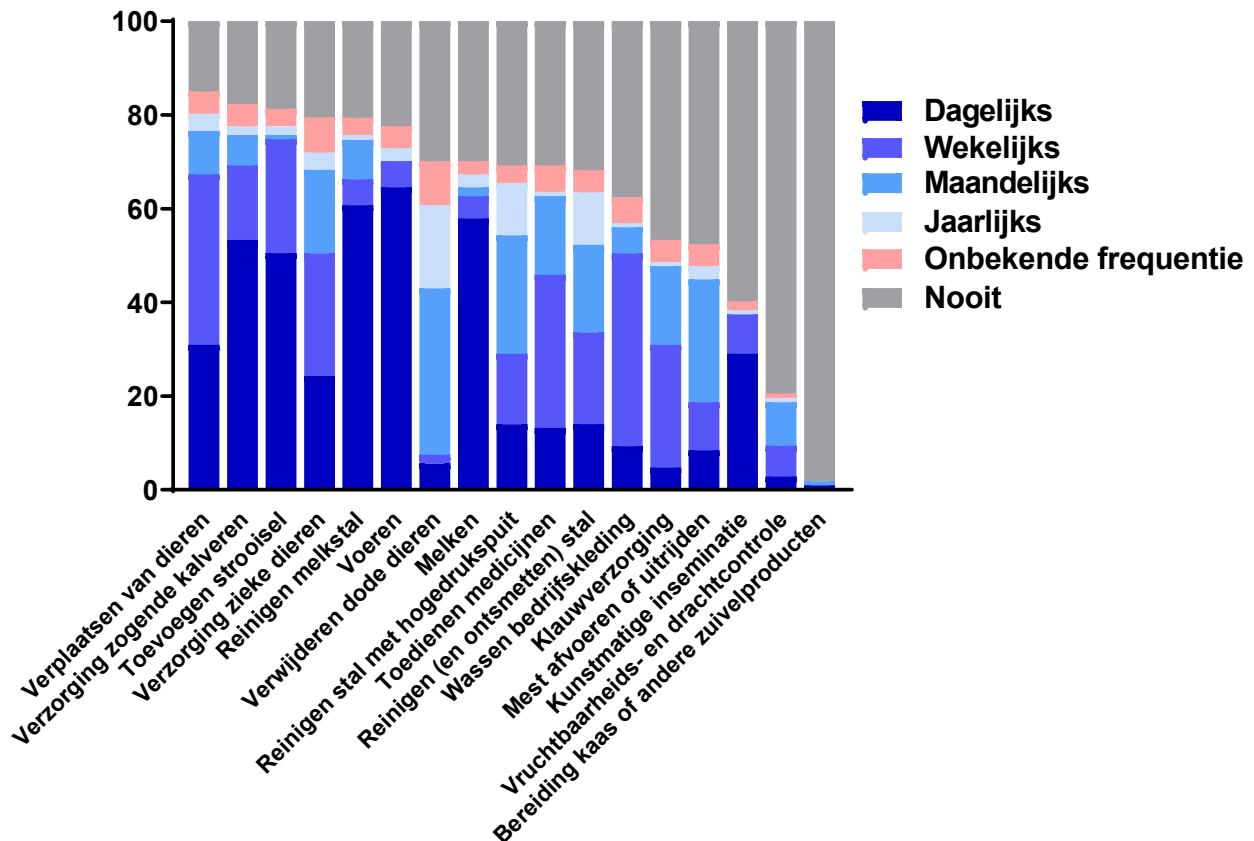
De meeste deelnemers waren zelf melkveehouder (60,7%) of melkveehouder én gezinslid (4,7%). Verder noemden 23 deelnemers

(21,5%) zichzelf alleen echtgeno(o)t(e)/partner en 10 deelnemers (9,3%) alleen familielid (ouder of kind). Slechts twee deelnemers waren medewerker op het bedrijf (1,8%).

Het grootste deel van de deelnemers (89,7%) woonde op het melkveebedrijf. Gemiddeld waren deelnemers 31,7 jaar werkzaam en/of woonachtig op het melkveebedrijf (range 1-70 jaar).

De meeste deelnemers kwamen regelmatig in de stallen met het melkvee, 89,7% gaf aan één of meerdere keren per dag in de stallen te komen. Slechts drie deelnemers gaven aan minder dan eens per week in de stallen te komen. Stallen van andere melkveebedrijven werden door deelnemers relatief weinig bezocht, elf deelnemers (10,3%) gaven aan vaker dan eens per week de stallen van andere melkveebedrijven te bezoeken. Anderzijds gaven 65,4% van de deelnemers aan slechts eens per jaar of minder vaak in de stallen van andere melkveebedrijven te komen.

Door vrijwel alle deelnemers (95,3%) werden in meer of mindere mate werkzaamheden op het melkveebedrijf uitgevoerd (Figuur 7). Voeren en reinigen van de melkstal waren de activiteiten die het meest frequent door de deelnemers werden uitgevoerd. Verplaatsen van dieren werd door de meeste deelnemers uitgevoerd, maar minder frequent.



Figuur 7 Werkzaamheden op melkveebedrijven uitgevoerd door deelnemende veehouders, gezinsleden en werknemers.

Onder de deelnemers was er veel contact met andere diersoorten. Minder dan 5% van de deelnemers gaf aan nooit contact met diersoorten (landbouwhuisdieren en/of gezelschapsdieren) anders dan melkvee te hebben. Diersoorten waar veel contact mee was waren honden (87%), katten (68%), paarden/pony's (38%) en hobbyschapen of -geiten (21%).

Van alle deelnemers gaf 35% aan rauwe zuivel (melk, yoghurt, ijs, etc.) van eigen bedrijf te consumeren. Ook gaf 13% van de deelnemers aan (producten van) rauw rundvlees van eigen bedrijf te consumeren (bijvoorbeeld filet americain, tartaar, biefstuk).

3.5 Zoönotische pathogenen bij humane deelnemers

3.5.1

Prevalentie

Van de onderzochte pathogenen zijn bij humane deelnemers *Campylobacter*, ESBL producerende *E. coli*, *L. monocytogenes*, MRSA en STEC aangetoond (Tabel 12).

Tabel 12 Prevalentie van de onderzochte pathogenen in humane deelnemers afkomstig van melkveebedrijven

	Aantal deelnemers	Aantal positief	Afkomstig van aantal bedrijven	Prevalentie	95% BI#
<i>Campylobacter</i> *	99	1	1	1,0%	0,0-5,5%
<i>Clostridioides difficile</i>	99	0	0	0,0%	0,0-3,7%
<i>Cryptosporidium parvum</i>	88	0	0	0,0%	0,0-4,1%
ESBL-producerende <i>E. coli</i> **	104	3	3	2,9%	0,6-8,2%
<i>Listeria monocytogenes</i>	99	2	2	2,0%	0,3-7,1%
MRSA	107	1	1	0,9%	0,0-5,1%
<i>Salmonella</i>	102	0	0	0,0%	0,0-3,6%
STEC	102	1	1	1,0%	0,0-5,3%

95% betrouwbaarheidsinterval

* Resultaten op basis van qPCR. Op basis van kweek werd in 0 van de 103 deelnemers *Campylobacter* gevonden.

** Bij 7 deelnemers werden ESBL-verdachte koloniën gevonden, bij 3 deelnemers werd de aanwezigheid van ESBL-producerende *E. coli* moleculair bevestigd.

3.5.2

Typering

Bij één deelnemer werd *C. jejuni* via real-time PCR aangetoond. Met behulp van de kweekmethode was het monster van deze deelnemer negatief voor *Campylobacter*. Op het bedrijf van de deelnemer werd in 2/4 mestmonsters ook *C. jejuni* aangetroffen. De betreffende deelnemer rapporteerde geen darmklachten.

Bij 7 deelnemers werden ESBL-verdachte koloniën gevonden. Eén isolaat bleek geen *E. coli* te zijn, maar een *Citrobacter*. Bij drie deelnemers werd de aanwezigheid van ESBL-producerende *E. coli* bevestigd: het gen *bla*_{CTX-M15} werd bij twee van hen gevonden en het gen

*bla*_{CTX-M-1} bij één. Bij één deelnemer werd naast ESBL-producerende *E. coli* (met *bla*_{CTX-M-15}) ook AmpC-producerende *E. coli* gevonden (*bla*_{DHA-1}).

Bij één humane deelnemer werd in de monsters van het bijbehorende bedrijf ook ESBL-producerende *E. coli* gevonden, in dit geval in het monster van jonge kalveren. Zowel in het humane als het dierlijke isolaat werd het gen *bla*_{CTX-M-1} gevonden. Ook was het sequentietype (ST2041) van beide isolaten gelijk en was er op basis van cgMLST weinig verschil te zien tussen de sequencing data van beide isolaten (5 allelen verschil). In beide isolaten werden er genen voor IncFII en IncQ1 plasmiden gevonden, alhoewel op basis van de sequence resultaten (short read sequencing) niet kon worden vastgesteld of het *bla*_{CTX-M-1} gen op één van deze plasmides ligt. Op de twee overige bedrijven met positieve humane deelnemers werd in de diermonsters geen ESBL-producerende *E. coli* gevonden.

Bij één deelnemer werd MRSA gevonden. Het isolaat was *mecA* positief en PVL negatief. Op het bedrijf van deze deelnemer werd in 1/3 veegdoekjes uit de stal ook MRSA gevonden. In de veegdoekjes van de huid van melkkoeien werd op dit bedrijf geen MRSA gevonden. Het isolaat van de veehouder en het isolaat uit de stal zijn beiden gesequenced in het kader van het MRSA surveillance project en met elkaar vergeleken, er bleek geen genetische verwantschap (persoonlijke communicatie Kees Veldman/Mike Brouwer).

Bij twee deelnemers van verschillende melkveebedrijven werd *L. monocytogenes* gevonden. In beide gevallen ging het om een *L. monocytogenes* behorend tot serogroep IIa, maar behorend tot verschillende clonal complexes (CC8 en CC121). Op het bedrijf van één van deze deelnemers werd in de mest van volwassen melkkoeien ook *L. monocytogenes* gevonden. Zowel de serogroep (IIb) als het clonal complex (CC77) van het dierlijke isolaat kwamen niet overeen met de typering van de *L. monocytogenes* van de humane deelnemer. In de monsters van het bedrijf van de andere deelnemer werd geen *Listeria* aangetroffen.

Bij één humane deelnemer werd STEC gevonden. Het isolaat werd getypeerd als O182:H25, *stx*₁ positief en *eae* negatief. In de diermonsters van het bijbehorende bedrijf werd geen STEC aangetroffen.

4 Risicofactoranalyse

Er zijn risicofactoranalyses uitgevoerd voor vier pathogenen: *Listeria monocytogenes* en STEC bij volwassen melkvee en *Clostridioides difficile* en *Cryptosporidium parvum* bij jonge kalveren (<4 weken). Voor de overige pathogenen kon geen betrouwbare risicofactoranalyse worden uitgevoerd omdat de prevalentie hiervoor te hoog of te laag was.

Bij risicofactoranalyses wordt het voorkomen van een pathogeen vergeleken tussen bedrijven met verschillende eigenschappen (variabelen). Eerst wordt een univariabele analyse uitgevoerd waarbij voor alle variabelen afzonderlijk een risico (odds ratio = OR) wordt berekend. Vervolgens wordt in de multivariabele analyse een model gemaakt waarbij alle significante risicofactoren in samenhang worden bekeken. Een OR hoger dan 1 betekent dat de variabele een risicofactor is, bij een OR lager dan 1 is de variabele beschermend.

4.1 Risicofactoren voor *Listeria monocytogenes* bij melkvee

De risicofactoranalyse voor *L. monocytogenes* bij volwassen melkvee werd uitgevoerd op bedrijfsniveau. Uit de univariabele analyse kwamen 24 variabelen naar voren die geassocieerd waren met het vóórkomen van *L. monocytogenes* op het bedrijf ($p < 0,1$, Bijlage 1). Een selectie van deze variabelen, op basis van biologische verklaarbaarheid en ontbreken van correlaties met andere variabelen, werd meegenomen in de multivariabele analyse.

In het definitieve model bleken zes variabelen significant geassocieerd met het vóórkomen van *L. monocytogenes* op het bedrijf (Tabel 13).

Tabel 13 Variabelen geassocieerd met het vóórkomen van *L. monocytogenes* bij volwassen melkvee op basis van multivariabele logistische regressie

Variabele	OR*	95%-BI**	p-waarde
Seizoen monsternamen			0,018
Winter (dec, jan, feb)	Ref		
Lente (maart, april, mei)	0,10	0,02-0,47	0,006
Zomer (jun, jul, aug)	0,04	0,01-0,22	<0,001
Herfst (sept, okt, nov)	0,08	0,01-0,41	0,004
Weidegang voor melkvee			0,017
Nee	Ref		
Ja	3,32	1,31-9,54	
Vervangingspercentage			0,025
<25%	Ref		
≥25%	0,43	0,21-0,90	
Droge koeien in ander gebouw dan melkvee gehuisvest			0,017
Nee	Ref		
Ja	0,33	0,12-0,79	
Gebruik gescheiden mest als bodembedekking			0,010
Nee	Ref		
Ja	0,20	0,05-0,62	

Variabele	OR*	95%-BI**	p-waarde
Diarree bij het melkvee in de afgelopen 6 maanden			0,024
Nee	Ref		
Ja	4,36	1,26-16,89	

*OR=odds ratio

** BI=betrouwbaarheidsinterval

4.2 Risicofactoren voor Shiga-toxine producerende *E. coli* in melkvee

De risicofactoranalyse voor STEC bij volwassen melkvee werd uitgevoerd op bedrijfsniveau. Uit de univariabele analyse kwamen 12 variabelen naar voren die geassocieerd waren met het vóórkomen van STEC op het bedrijf ($p < 0,1$, Bijlage 2). Een selectie van deze variabelen, op basis van biologische verklaarbaarheid en ontbreken van correlaties met andere variabelen, werd meegenomen in de multivariabele analyse.

In het definitieve model bleken 4 variabelen geassocieerd met het voorkomen van STEC op het bedrijf (Tabel 14).

Tabel 14 Variabelen geassocieerd met het vóórkomen van STEC bij volwassen melkvee op basis van multivariabele logistische regressie

Variabele	OR*	95%-BI**	p-waarde
Seizoen monstername			0,069
Winter (dec, jan, feb)	Ref		
Lente (maart, april, mei)	0,61	0,16-2,58	0,473
Zomer (jun, jul, aug)	0,19	0,04-0,87	0,026
Herfst (sept, okt, nov)	0,14	0,03-0,69	0,013
Aanvoer rundermest voor gebruik op bedrijf			0,008
Nee	Ref		
Ja	7,01	1,65-30,78	
Gebruik van penicillines bij het melkvee in de afgelopen 3 maanden			0,001
Nee	Ref		
Ja	0,16	0,06-0,47	
Toepassing van kunstmatige inseminatie op het bedrijf			0,019
Nee	Ref		
Ja	0,20	0,05-0,79	

*OR=odds ratio

** BI=betrouwbaarheidsinterval

4.3 Risicofactoren voor *Clostridioides difficile* in jonge kalveren

De risicofactoranalyse voor *C. difficile* bij jonge kalveren (<4 weken) werd uitgevoerd op bedrijfsniveau. Uit de univariabele analyse kwamen meer dan 20 variabelen naar voren die geassocieerd waren met het vóórkomen van *C. difficile* bij de jonge kalveren ($p < 0,1$, Bijlage 3). Een selectie van deze variabelen, op basis van biologische verklaarbaarheid en ontbreken van correlaties met andere variabelen, werd meegenomen in de multivariabele analyse. Ook werd bij de selectie gekeken in hoeverre de variabelen een relatie hadden met het management van de jonge kalveren. Het aantal kalveren dat werd bemonsterd voor het mengmestmonster was niet significant in de univariabele analyse, maar werd wel meegenomen in de multivariabele analyse vanwege mogelijke invloed op de gevoeligheid van het aantonen van *C. difficile*.

In het definitieve model bleken 5 variabelen geassocieerd met het vóórkomen van *C. difficile* bij de jonge kalveren (Tabel 15).

Tabel 15 Variabelen geassocieerd met het vóórkomen van *C. difficile* bij jonge kalveren op basis van multivariabele logistische regressie

Variabele	OR*	95%-BI**	p-waarde
Verplaatsing van iglo of eenlingbox na ieder kalf			0,024
Ja	Ref		
Nee	5,12	1,38-23,76	0,022
Niet van toepassing	2,66	0,39-17,84	0,302
Jongvee in strohokken niet in vaste groep gehuisvest			0,032
Nee	Ref		
Ja	3,39	1,14-10,86	
Eerste portie biest >2 uur na de geboorte			0,025
Nee	Ref		
Ja	3,66	1,21-12,06	
Geen maatregelen tegen worminfecties			0,014
Nee	Ref		
Ja	0,24	0,07-0,72	
Type melk voor kalveren			<0,001
Koemelk	Ref		
Kunstmelk/melkvervanger	10,29	3,07-41,70	<0,001
Deels koemelk, deels kunstmelk	3,48	0,66-18,37	0,133

*OR=odds ratio

** BI=betrouwbaarheidsinterval

4.4 Risicofactoren voor *Cryptosporidium parvum* bij jonge kalveren

De risicofactoranalyse voor *C. parvum* bij jonge kalveren (<4 weken) werd uitgevoerd op bedrijfsniveau. Uit de univariabele analyse kwamen 20 variabelen naar voren die geassocieerd waren met het vóórkomen van *C. parvum* bij de jonge kalveren ($p < 0,1$, Bijlage 4). Een selectie van deze variabelen, op basis van biologische verklaarbaarheid en ontbreken van correlaties met andere variabelen, werd meegenomen in de multivariabele analyse. Ook werd bij de selectie gekeken in hoeverre de variabelen een relatie hadden met het management van de jonge kalveren. Het aantal kalveren dat werd bemonsterd voor het mengmestmonster was niet significant in de univariabele analyse, maar werd wel meegenomen in de multivariabele analyse vanwege mogelijke invloed op de gevoeligheid van het aantonen van *C. parvum*.

In het definitieve model bleken 3 variabelen geassocieerd met het vóórkomen van *C. parvum* bij de jonge kalveren (Tabel 16).

Tabel 16 Variabelen geassocieerd met het vóórkomen van *C. parvum* bij jonge kalveren op basis van multivariabele logistische regressie

Variabele	OR*	95%-BI**	p-waarde
Seizoen monstername			0,002
Winter (dec, jan, feb)	0,85	0,08-19,74	0,899
Lente (maart, april, mei)	0,12	0,02-0,42	0,003
Zomer (jun, jul, aug)	0,18	0,04-0,71	0,021
Herfst (sept, okt, nov)	Ref		
Aantal bemonsterde kalveren			0,047
<2	Ref		
3-4	4,65	1,58-14,99	0,007
5 of meer	2,54	0,77-9,18	0,136
Verplaatsing van iglo of eenlingbox na ieder kalf			0,093
Ja	Ref		
Nee	0,33	0,11-0,93	0,042
Niet van toepassing	0,33	0,07-1,63	0,160

*OR=odds ratio

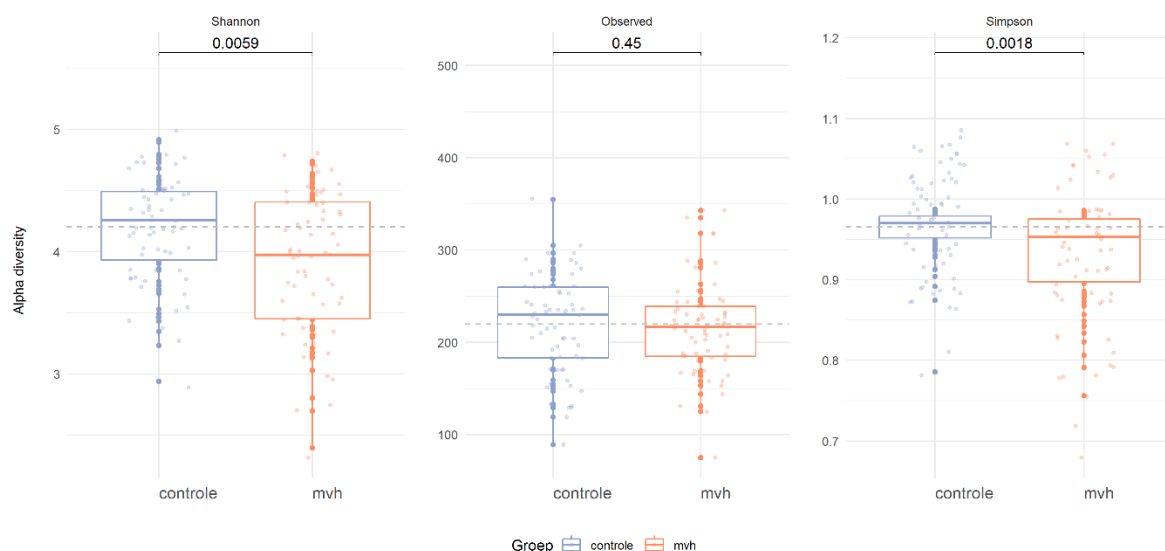
** BI=betrouwbaarheidsinterval

5 Microbioomanalyse

Het microbioom is de verzameling van alle bacteriën in een monster. In het geval van het darm microbioom gaat dit om de bacteriële gemeenschap in de darmen van mensen of dieren. Het microbioom is erg belangrijk voor het functioneren en de gezondheid van mensen en dieren.

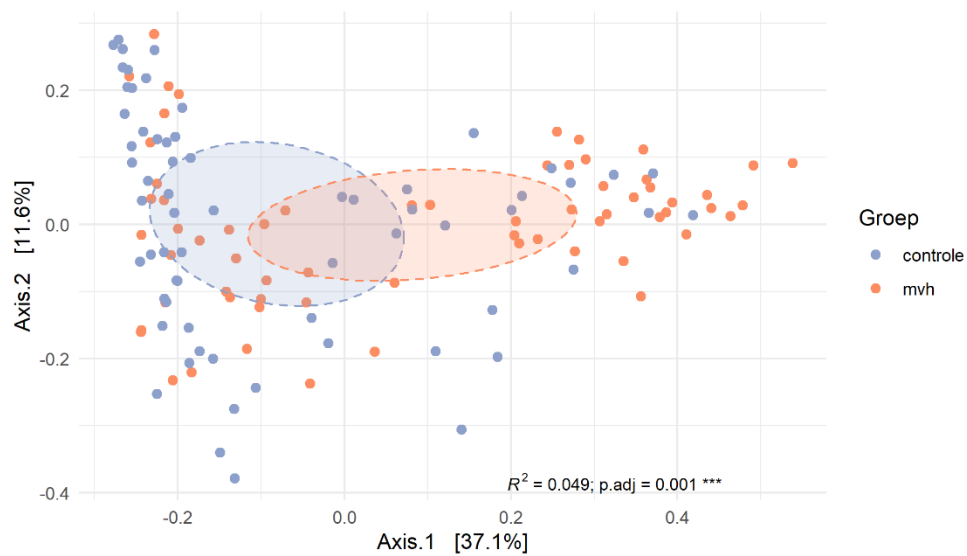
Voor de analyse van de microbiële populatie in de darm van melkveehouders werd het microbioom van 65 humane deelnemers van melkveehouderijen vergeleken met controledoelnemers uit overige RIVM studies. Van deze controledoelnemers is het contact met dieren niet uitgevraagd, maar verwacht wordt dat deze deelnemers (in meerderheid) geen veehouders zullen zijn.

De alpha-diversiteit (maat om aantal soorten/taxa bacteriën in het microbioom weer te geven) van het microbioom van de controle deelnemers was significant hoger dan die van de melkveehouders in 2 van de 3 indexen (Shannon en Simpson, nemen zowel het aantal bacteriële taxa en verdeling hiervan in het monster mee), maar niet volgens de Observed taxa index (neemt alleen het aantal bacteriële taxa mee) (Figuur 8).

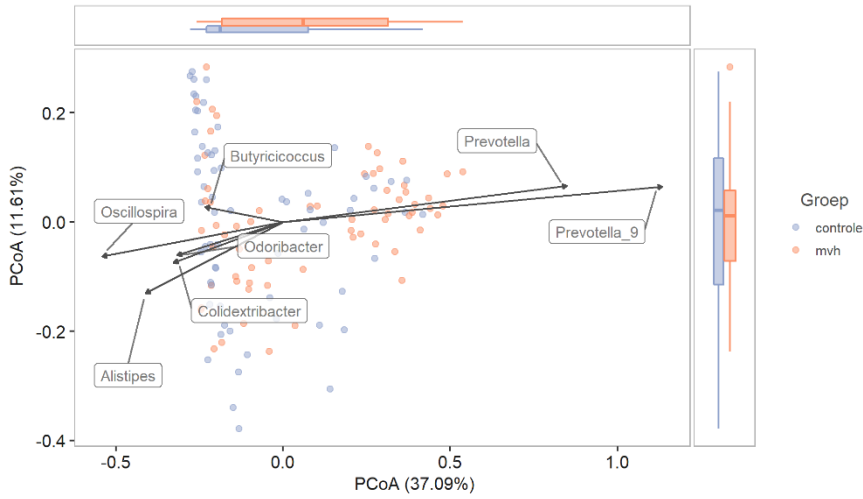


Figuur 8 Vergelijking van alpha-diversiteit van het microbioom van melkveehouders (mvh, oranje) ten opzichte van controle deelnemers (blauw).

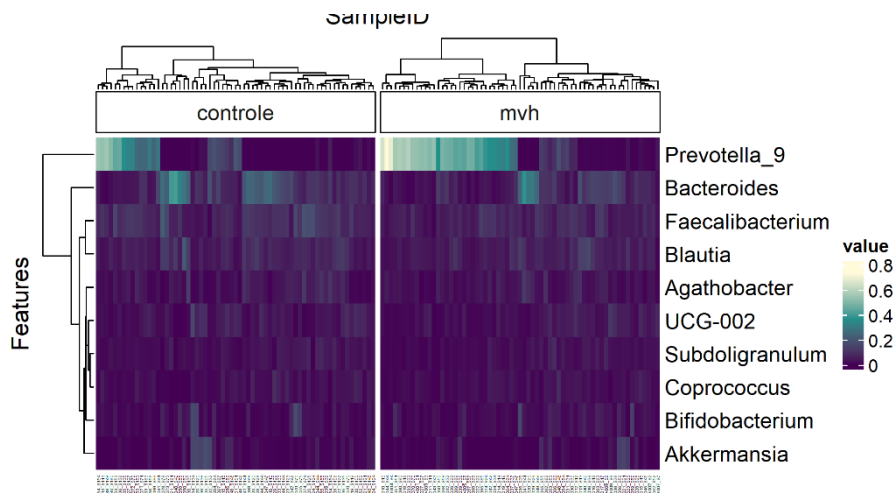
De samenstelling van het microbiom (beta-diversiteit) was significant verschillend ($p=0,001$) tussen de melkveehouders en de controle deelnemers (Figuur 9). Het toepassen van een Principal Coordinate Analysis liet zien dat het verschil tussen de beide groepen voor een groot deel (37%) werd verklaard door de hogere aanwezigheid van de bacteriële genera *Prevotella* en *Prevotella_9* in melkveehouders (Figuur 10). Ook in sommige controledoelnemers werd een hoge aanwezigheid van *Prevotella_9* gezien, maar opvallend was dat *Prevotella_9* in méér veehouders in een hogere dichtheid aanwezig was. In de controle groep waren de genera *Bacteroides*, *Faecalibacterium* en *Subdoligranulum* significant meer aanwezig (Figuur 11).



Figuur 9 Beta-diversiteit van het microbiom van melkveehouders (mvh, oranje) en controledoelnemers (blauw). Elke punt in de grafiek geeft de samenstelling van het microbiom van één deelnemer weer.

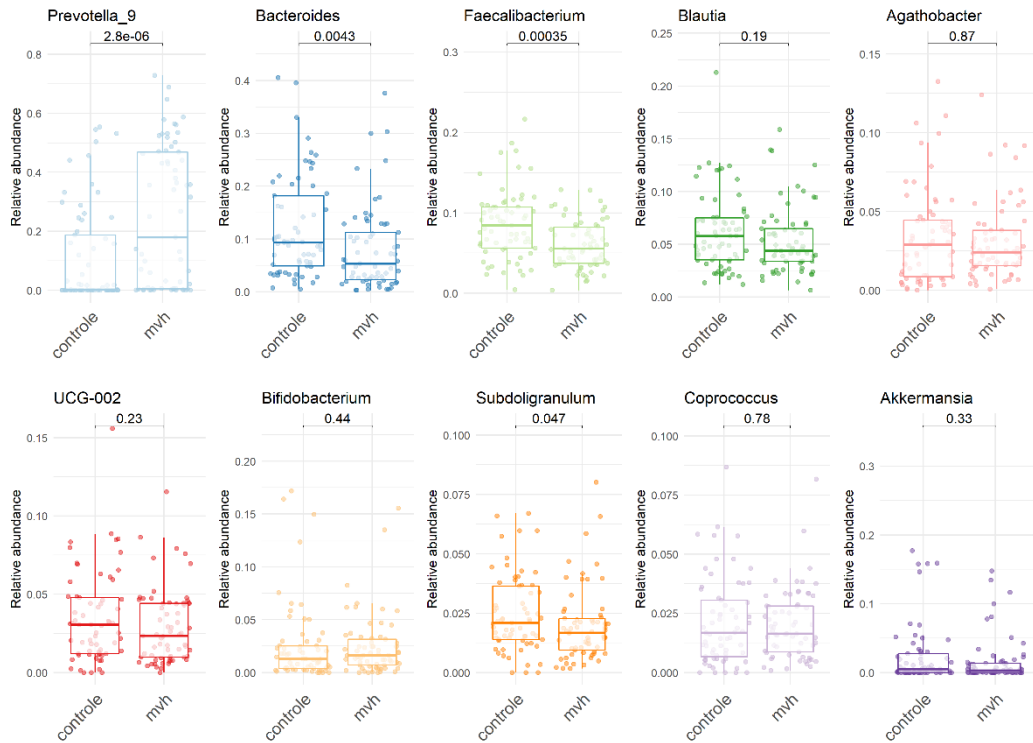


a.



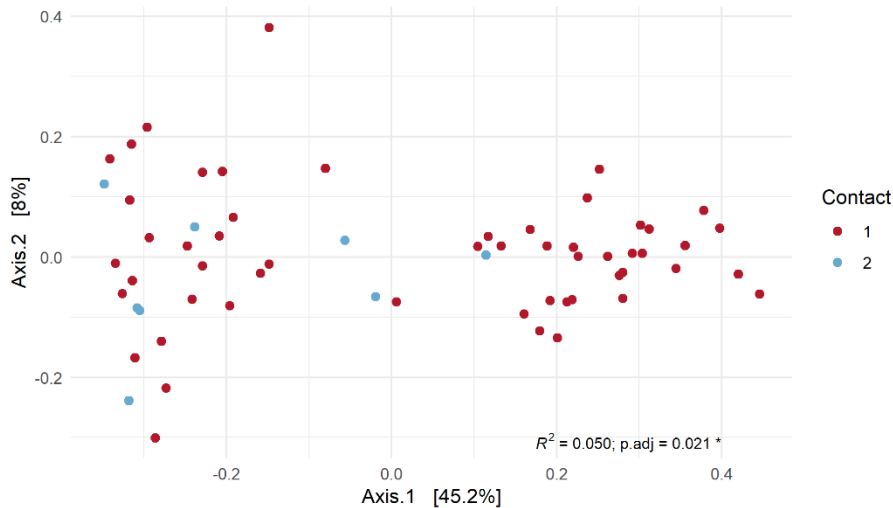
b.

Figuur 10 a Principle Coordinate Analyses (PCoA) plot van samenstelling van het microbiom van melkveehouders (mvh) en controled deelnemers, pijlen geven aan welke bacteriën de samenstelling van het microbiom beïnvloeden, b Heat-map van de top 10 bacteriële genera met de hoogste dichtheid.

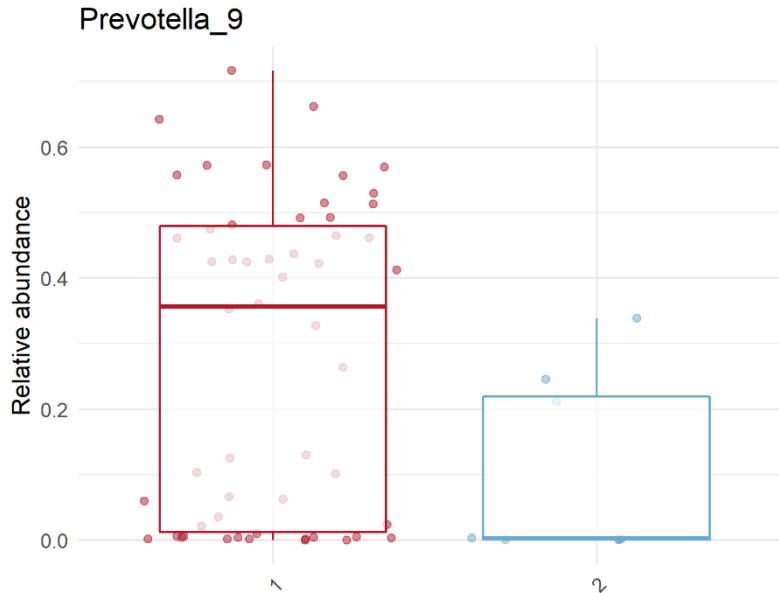


Figuur 11 Vergelijking van de aanwezigheid van de top 10 bacteriële genera met de hoogste dichtheid tussen controledeelnemers en melkveehouders (mvh)

Om te kijken in hoeverre het contact met melkvee van invloed was op het beschreven verschil in microbioom werd binnen de groep van humane deelnemers van melkveehouderijen een onderscheid gemaakt tussen personen met meer of minder contact met melkvee (1x per dag of vaker versus 1x per week of minder vaak). Tussen deze beide groepen was een significant verschil ($p=0,021$) te zien in beta-diversiteit en aanwezigheid van *Prevotella_9* (Figuur 12).



a.



b.

Figuur 12 Relatie tussen het microbioom en de mate van contact met melkvee bij humane deelnemers van melkveehouderijen.

a. Principal Coordinate Analysis plot,

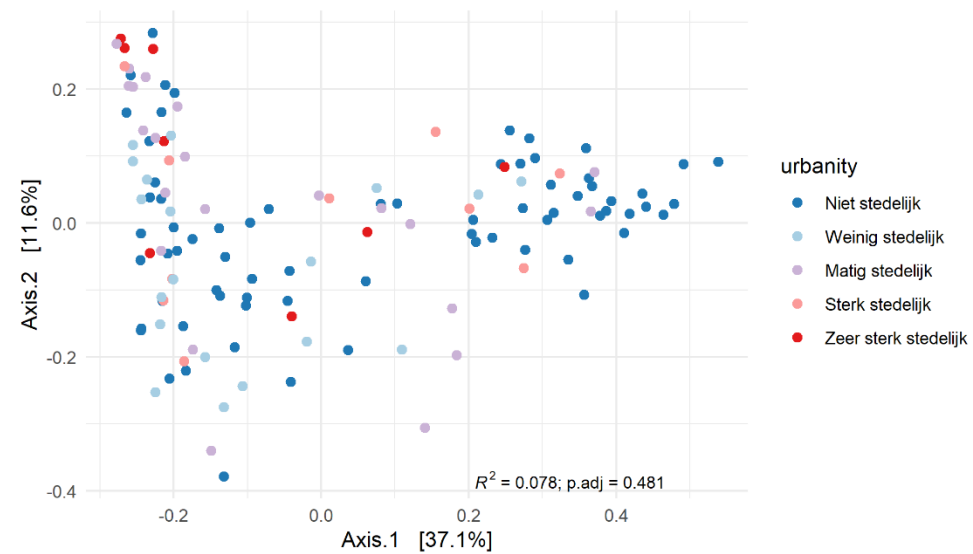
b. relatieve aanwezigheid van Prevotella_9. 1/rood = 1x per dag of vaker contact met melkvee, 2/blauw= 1x per week of minder vaak contact met melkvee

Om het effect van de leefomgeving van de deelnemers op de samenstelling van het microbioom te onderzoeken, werd van het woonadres van alle deelnemers de stedelijkheidsgraad bepaald. Er was een groot verschil in de leefomgeving van beide groepen deelnemers. Van de veehouders was in 100% van de gevallen de leefomgeving 'Niet stedelijk', terwijl dit bij controle deelnemers meer gevarieerd was (Tabel 17).

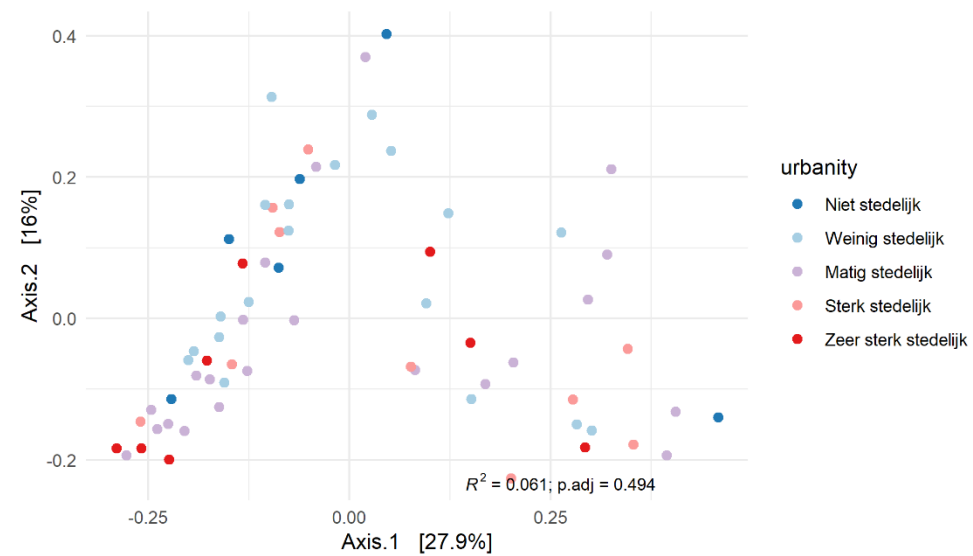
Tabel 17 Verdeling van leefomgeving van melkveehouders en controle deelnemers naar stedelijkheidsgraad (op basis van omgevingsadressendichtheid, CBS)

Stedelijkheid	Melkveehouders	Controle deelnemers
Niet stedelijk	100%	9%
Weinig stedelijk	0%	29%
Matig stedelijk	0%	34%
Sterk stedelijk	0%	15%
Zeer sterk stedelijk	0%	12%

De verschillende mate van stedelijkheid hadden echter geen significant effect op de samenstelling van het microbioom (Figuur 13), niet in het geval alle deelnemers werden bekeken ($p=0,481$) en ook niet in het geval alleen de controle deelnemers werden meegenomen in de berekening ($p=0,494$).



a.



b.

Figuur 13 Relatie tussen het microbioom en de mate van stedelijkheid van de leefomgeving met behulp van Principal Coordinate analysis, a. plot van álle deelnemers met een correctie voor het studie effect, b. plot van alleen de deelnemers uit de controlegroep

6 Discussie

6.1 *Campylobacter*

6.1.1 *Prevalentie melkvee*

In dit onderzoek werd *Campylobacter* aangetroffen op 90,6% van de onderzochte melkveebedrijven. Op monsterniveau was de prevalentie 79,3%.

Vergelijkbare hoge prevalenties van *Campylobacter* in melkveebedrijven worden in de literatuur vaker beschreven. In een recente studie op Spaanse melkveebedrijven werd een bedrijfsprevalentie van 87% gevonden en een studie in de VS vond zelfs een bedrijfsprevalentie van 98% (Englen et al., 2007; Ocejo et al., 2019). Vanwege de verschillen in monsternamestrategieën is een directe vergelijking lastig te maken, toch lijkt het duidelijk dat *Campylobacter* veel voorkomt in de mest van gezonde melkkoeien. Eerder werd in de Surveillance Landbouwhuisdieren ook bij vleesrunderen een hoge prevalentie (86%) van *Campylobacter* gevonden (Cuperus et al., 2019).

In het huidige onderzoek was *C. jejuni* de meest frequent gevonden *Campylobacter* species (94%). Dit komt overeen met de verdeling van *Campylobacter* species uit melkvee in de literatuur (Ellis-Iversen et al., 2009; Thépault et al., 2018).

Een deel van de *Campylobacter*-isolaten is onderzocht op de gevoeligheid voor een panel van antibiotica. Verminderde gevoeligheid werd voornamelijk gevonden tegen ciprofloxacine (quinolonen) en tetracycline bij zowel *C. jejuni* als *C. coli*. Bij *C. coli* werd ook resistentie tegen ertapenem (carbapenemase) aangetoond. De percentages verminderde gevoeligheid zijn goed vergelijkbaar met wat in 2017 werd gevonden in Nederlandse vleesrunderen (Cuperus et al., 2019). Echter, vergeleken met *Campylobacter*-isolaten uit pluimvee zijn de percentages van verminderde gevoeligheid relatief laag (MARAN 2022, 2022). Ook in *Campylobacter*-isolaten uit melkvee in Spanje werden hogere percentages verminderde gevoeligheid gevonden (Ocejo et al., 2019).

6.1.2 *Resultaten bij veehouders, medewerkers en gezinsleden*

In 2021 is voor het eerst de aanwezigheid van *Campylobacter* in humane monsters onderzocht met zowel kweek als een nieuw ontwikkelde real-time PCR.

Bij één humane deelnemer werd via directe real-time PCR op ontlasting *C. jejuni* aangetoond. Op het bedrijf van de deelnemer werd ook *C. jejuni* aangetroffen. Het monster van deze deelnemer was echter negatief in de analyse met bacteriekweek. In de literatuur is meermaals beschreven dat met behulp van PCR-gebaseerde methoden meer *Campylobacter* wordt aangetoond in vergelijking met kweek (Ghosh et al., 2014). Dit heeft onder andere te maken met het feit dat *Campylobacter* bij kamertemperatuur al na korte perioden niet meer kweekbaar is. De monsters van humane deelnemers worden in deze studie via de gewone post verzonden, na 1-2 dagen is het dan mogelijk

lastiger via bacteriekweek *Campylobacter* aan te tonen. De nieuw ontwikkelde real-time PCR is daarom een belangrijke toevoeging om *Campylobacter* in de monsters van humane deelnemers te bepalen.

Alhoewel *Campylobacter* meestal niet voorkomt bij mensen zonder gastro-intestinale klachten (Kaarme et al., 2016), rapporteerde de positieve deelnemer geen diarree of andere ziekteverschijnselen. De deelnemer gaf aan rauwe melk van eigen bedrijf te consumeren. De consumptie van rauwe melk is een bekende risicofactor voor *Campylobacter* infecties (Mughini-Gras et al., 2021).

6.1.3 *Risico voor de mens*

Een Nederlandse bronattributiestudie en risicofactoranalyse schat dat humane gevallen van campylobacteriose voor het grootste gedeelte (60-70%) kunnen worden toegeschreven aan pluimvee (Mughini Gras et al., 2012) Als tweede bron wordt rund genoemd (20-25%). Dit betreft de som van alle mogelijke besmettingsroutes en niet alleen de consumptie van besmet voedsel. In de risicofactoranalyse wordt beroepsmatig contact met dieren als risicofactor genoemd voor de besmetting van *Campylobacter* vanuit runderen, maar niet vanuit pluimvee. Contact met runderen is ook in studies uit andere landen beschreven als risicofactor voor humane campylobacteriose, voornamelijk in rurale gebieden (Davis et al., 2013; Levesque et al., 2013). Runderen lijken dus naast pluimvee een belangrijke bron voor humane *Campylobacter* infecties.

Uitbraken van *Campylobacter* gerelateerd aan het drinken van rauwe melk worden regelmatig beschreven (Kenyon et al., 2020; MMWR, 2013). Toch is zuivel procentueel een kleine bron van humane *Campylobacter*-infecties die via voedsel worden overgedragen (<5%, Mughini-Gras et al. (2022)).

6.2 ***Clostridioides difficile***

6.2.1 *Prevalentie melkvee*

In deze studie werd *C. difficile* in volwassen melkvee en twee leeftijden kalveren onderzocht. Bij de volwassen dieren werd *C. difficile* op 3,8% van de bedrijven aangetroffen, bij kalveren jonger dan 4 weken op 17,5% van de bedrijven en bij oudere kalveren op 4% van de bedrijven. De prevalentie van *C. difficile* in jonge kalveren is daarmee significant hoger dan in de oudere kalveren en volwassen melkvee.

De prevalentie bij volwassen melkvee is vergelijkbaar met een eerdere Nederlandse studie waar bij 1% van volwassen melkkoeien *C. difficile* werd gevonden (Koene et al., 2012). Het verschil in prevalentie tussen jonge kalveren en oudere kalveren en volwassen koeien komt overeen met eerdere studies (P. Bandelj et al., 2018; Rodriguez et al., 2017).

Meer dan de helft van de isolaten in deze studie (51%) behoorde tot ribotype 695. Dit zeldzame ribotype wordt in de literatuur vrijwel niet beschreven, bij mens of bij dieren. Ook bij het Referentielaboratorium *C. difficile* wordt dit type slechts sporadisch gevonden (persoonlijke communicatie E. Kuijper). In humane patiënten zijn de vijf meest voorkomende ribotypes 001, 002, 005, 014/020 en 078/126. Deze ribotypen werden in onze studie op 6 bedrijven gevonden.

6.2.2 *Risicofactoren jonge kalveren*

In de multivariabele analyse werden vijf significante risicofactoren geïdentificeerd voor de aanwezigheid van *C. difficile* bij kalveren jonger dan 4 weken.

Twee risicofactoren waren gerelateerd aan de voeding van de jonge kalveren, namelijk het geven van de eerste portie biest >2 uur na de geboorte (OR=3,66) en het voeren van kunstmelk of melkvervanger aan de kalveren (OR=10,29). In jonge biggen is diarree door *C. difficile* een groot probleem en is de associatie met moedermelk en biest onderzocht. Het voeren van melkvervanger aan biggen leidde tot een hogere kans op *C. difficile* infectie (Grzeškowiak et al., 2018). In een *ex vivo* studie werd vervolgens aangetoond dat varkensbiest darmcellen beschermt tegen de effecten van *C. difficile* toxines (Grzeškowiak et al., 2020). Als verklaring werden de vele antilichamen en andere bioactieve stoffen in biest en moedermelk genoemd. Bij kalveren zijn geen experimentele studies bekend naar de relatie tussen biest/moedermelk en *C. difficile* infecties. Onze risicofactoranalyse geeft echter aanleiding om te denken dat deze relatie ook bij kalveren bestaat.

Vervolgens werden twee variabelen gerelateerd aan huisvesting als risicofactoren geïdentificeerd: het niet verplaatsen van kalverhokken na ieder kalf (OR=5,12) en het niet in een vaste groep huisvesten van kalveren in strohokken (OR=3,39). Het verplaatsen van kalverhokken (iglo's) wordt aangeraden om opbouw van infectiedruk via de ondergrond waarop deze hokken staan te verminderen. *C. difficile* is een sporenvormende bacterie, deze sporen zijn zeer resistent tegen verschillende desinfectiemethoden en kunnen lang overleven in de omgeving (Edwards et al., 2016). Het is daarom goed te verklaren waarom het verplaatsen van kalverhokken naar een 'schonere' bodem leidt tot een lager risico op *C. difficile*. Wanneer kalveren niet in een vaste groep worden gehuisvest zou de introductie van nieuwe dieren een vehikel kunnen zijn voor de introductie van nieuwe pathogenen zoals *C. difficile* in de groep.

Tenslotte werd het niet nemen van maatregelen tegen worminfecties als beschermend geïdentificeerd voor de aanwezigheid van *C. difficile* bij de jonge kalveren (OR=0,24). Belangrijk om op te merken is dat deze variabele is uitgevraagd voor maatregelen tegen worminfecties op het gehele melkveebedrijf, niet specifiek bij de jonge kalveren. Bij de bemonsterde kalveren jonger dan 4 weken zijn hoogstwaarschijnlijk nog geen maatregelen tegen worminfecties genomen. Een directe verklaring voor deze risicofactor is daarom lastig te geven. Wellicht heeft de variabele 'Nemen van maatregelen tegen worminfecties' een relatie met een andere, niet uitgevraagde managementvariabele.

6.2.3 *Resultaten bij veehouders, medewerkers en gezinsleden*

In de monsters van humane deelnemers werd geen *C. difficile* aangetroffen. In tegenstelling werd in de Surveillance Landbouwhuisdieren studie uit 2013 op vleesvarkensbedrijven bij 8% van de humane deelnemers *C. difficile* aangetoond (Zomer et al., 2014).

Het verschil tussen varkenshouders en melkveehouders in het dragerschap van *C. difficile* is ook in andere studies beschreven

(Keessen et al., 2013; Redding et al., 2021). Wellicht speelt het verschil in gevonden ribotypen hierbij een rol. In studies met varkens en humane deelnemers werd voornamelijk dragerschap van ribotype 078 gevonden (Keessen et al., 2013; Zomer et al., 2014). Ribotype 078 is het op twee na meest voorkomende ribotype bij menselijke patiënten (Vendrik et al., 2021). Dit type kwam in onze studie bij melkvee veel minder vaak voor.

6.2.4 *Risico voor de mens*

De vraag in hoeverre *C. difficile* zoönotisch is, is uitgebreid onderzocht, maar een eenduidig antwoord is nog altijd niet te geven. Het is duidelijk dat er een sterke overlap is tussen *C. difficile* types en isolaten die worden gevonden bij de mens en verschillende diersoorten (o.a. varkens, koeien, honden) en met nieuwe sequencingtechnieken wordt de gelinkte verspreiding en clustering van *C. difficile* isolaten steeds duidelijker (Knetsch et al., 2014; Werner et al., 2020). De verspreidingsroutes van *C. difficile* tussen dieren en mensen zijn echter minder duidelijk. Naast de aanwezigheid in dieren wordt *C. difficile* ook op voedsel en in het milieu aangetroffen. Waarschijnlijk is er daarom sprake van verschillende verspreidingsroutes van *C. difficile*; bijvoorbeeld via voedsel, water en de omgeving (Lim et al., 2020).

De in deze studie gevonden isolaten zijn in het merendeel toxigene, ook het zeldzame ribotype 695, en kunnen dus bij de mens ziekte veroorzaken. Ook werden op enkele bedrijven ribotypes gevonden die vaak voorkomen bij humane patiënten (005, 078 en 126). Naar aanleiding van dit onderzoek wordt het ribotype 695 vanaf 2022 opgenomen in de humane surveillance van het Nationaal Referentielaboratorium *C. difficile*.

6.3 ***Cryptosporidium parvum***

6.3.1 *Prevalentie melkvee*

In deze studie is *Cryptosporidium parvum* onderzocht bij kalveren van twee leeftijden. Bij kalveren jonger dan 4 weken werd op 71,8% van de bedrijven *Cryptosporidium parvum* aangetroffen, bij kalveren tussen 4 weken en 4 maanden was dit op 14,1% van de bedrijven. In een Nederlandse studie uit 2010 werd een bedrijfsprevalentie van *C. parvum* van 57% gevonden in kalveren jonger dan 3 weken (Bartels et al., 2010). In deze studie werd gebruik gemaakt van een immunoassay. In een recente studie werd op een kleinere groep Nederlandse melkveebedrijven (n=17) op basis van PCR een *Cryptosporidium* spp. prevalentie van 85% gevonden (Pinto et al., 2021). De verschillen in prevalentie zijn waarschijnlijk te verklaren door verschillende monsternamestrategieën, analysetechnieken en het feit dat in de studie van Pinto et al. alle *Cryptosporidium* soorten werden meegenomen. De significant lagere prevalentie van *C. parvum* in oudere kalveren komt overeen met eerdere studies (Fayer et al., 2007; Silverlås et al., 2009).

De resultaten van de typering waarbij IIaA15G2R1 als meest voorkomende subtype werd gevonden komt overeen met andere studies in Nederlandse kalveren (Pinto et al., 2021; Wielinga et al., 2008). Ook in andere West-Europese landen is IIaA15G2R1 het meest voorkomende *C. parvum* subtype in koeien.

6.3.2 *Risicofactoren jonge kalveren*

In de multivariabele analyse werden drie risicofactoren geïdentificeerd voor de aanwezigheid van *C. parvum* bij kalveren jonger dan 4 weken.

Het seizoen van monstername is significant geassocieerd met de detectie van *C. parvum* bij jonge kalveren. Dit seizoenseffect waarbij meer *Cryptosporidium* infecties worden gevonden tijdens de koudere seizoenen is bekend vanuit eerdere studies uit verschillende landen (Arsenopoulos et al., 2017; Hamnes et al., 2006; Sturdee et al., 2003). Potentiële oorzaken die in deze studies worden genoemd voor het seizoenseffect zijn onder andere de hogere dierdichtheid, lagere temperatuur en hogere luchtvochtigheid zijn.

Een hoger aantal bemonsterde kalveren in het mengmestmonster (3-4 ten opzichte van <2) werd geïdentificeerd als risicofactor (OR=4,65). Bij de monstername voor deze studie werd gevraagd om van zoveel mogelijk jonge kalveren mest in het mengmonster te verwerken. Het is goed te verklaren dat wanneer het mengmonster bestaat uit mest van meerdere kalveren, de kans groter is dat één van deze dieren besmet is met *C. parvum*.

Het verplaatsen van kalverhokken (iglo's) wordt aangeraden om opbouw van infectiedruk te verminderen (Hotchkiss et al., 2015). Het is onduidelijk waarom er in deze studie voor *C. parvum* een omgekeerde relatie lijkt te bestaan (OR=0,33 bij niet verplaatsen van kalverhokken). Interessant om te noemen is dat in eerdere risicofactoranalyses over *Cryptosporidium* bij kalveren ook hygiënemaatregelen als risicofactor werden geïdentificeerd, zoals schoonmaken en desinfecteren van kalverhokken (Deksne et al., 2022; Silverlås et al., 2009). Wellicht wordt er bij bedrijven waar al sprake is van problemen met *Cryptosporidium* als reactie vaker gebruik gemaakt van verplaatsen van kalverhokken of andere hygiënemaatregelen, waardoor deze omgekeerde relatie ontstaat.

6.3.3 *Resultaten bij veehouders, medewerkers en gezinsleden*

Cryptosporidium parvum werd niet gevonden bij de deelnemende veehouders, medewerkers en gezinsleden in deze studie. Dit komt overeen met een eerdere studie onder rundveehouders uit Italië (Di Piazza et al., 2013), waarin eveneens geen *Cryptosporidium* werd gevonden bij de veehouders, terwijl de parasiet wel bij de kalveren van de bedrijven voorkwam.

6.3.4 *Risico voor de mens*

Cryptosporidium parvum is een zoönotische parasiet die met name voorkomt bij herkauwers zoals runderen. Vooral jonge dieren scheiden veel oöcysten uit na infectie. Het subtype IIaA15G2R1 is zowel bij runderen als bij humane infecties het meest voorkomende subtype. De overdracht van *C. parvum* tussen dier en mens kan zowel direct, via besmette mest, als indirect plaatsvinden, bijvoorbeeld via het zwemmen in open water. Ook uitbraken van cryptosporidose gelinkt aan voedsel, met name rauwe groenten, zijn beschreven (Cacciò & Chalmers, 2016). *C. parvum* kan ook van mens tot mens worden overgedragen.

Contact met dierlijke feces of bezoek van een boerderij werden in een Nederlandse risicofactoranalyse geïdentificeerd als risicofactoren voor het oplopen van een *C. parvum* infectie (Nic Lochlainn et al., 2019). Uit onze analyse van 88 melkveehouders, familieleden en medewerkers bleek dit risico niet, aangezien er geen humane deelnemers met *C. parvum* infecties werden gevonden.

6.4 ESBL-producerende *E. coli*

6.4.1 Prevalentie melkvee

Op basis van de jaarlijkse MARAN-monitoring fluctueert de bedrijfsprevalentie van ESBL-producerende *E. coli* in melkvee vanaf 2014 tussen de 6% en 13% (MARAN 2022, 2022). In deze studie werd op 8,2% van de bedrijven en in 4,2% van de mestmonsters van volwassen melkvee ESBL-producerende *E. coli* gevonden. Deze bedrijfsprevalentie van 8,2% is niet significant verschillend van de bedrijfsprevalentie van 10,3% uit MARAN 2021.

ESBL-producerende *E. coli* werd ook gevonden bij kalveren jonger dan 4 weken (6,6%) en kalveren tussen de 4 weken en 4 maanden (4,2%). Deze prevalenties verschilden niet significant van de prevalentie bij het volwassen melkvee. Anders dan in onze studie werd door Heuvelink et al. op Nederlandse melkveebedrijven in 2013 bij jonge kalveren een veel hogere prevalentie van ESBL-producerende *E. coli* gevonden dan bij volwassen melkvee (Heuvelink et al., 2019). De monsternamen tussen beide studies is verschillend, in de studie van Heuvelink et al. werden mestmonsters van meerdere individuele kalveren en koeien onderzocht. Toch is het verrassend dat in onze studie geen verschil in prevalentie werd gevonden, aangezien een jonge leeftijd in meerdere risicofactoranalyses als risicofactor voor dragerschap van ESBL-producerende *E. coli* werd gevonden (Adler et al., 2015; Reist et al., 2013).

De meest voorkomende ESBL-genen in deze studie waren *bla*_{CTX-M-1} en *bla*_{CTX-M-15}. Dit komt overeen met de meest gevonden genen in recente MARAN-rapportages en eerdere artikelen over ESBL-producerende bacteriën bij Nederlands melkvee (Gonggrijp et al., 2016; Heuvelink et al., 2019; MARAN 2022, 2022).

6.4.2 Resultaten bij veehouders, medewerkers en gezinsleden

Bij drie humane deelnemers van verschillende bedrijven werd ESBL-producerende *E. coli* gevonden (2,9%). Deze prevalentie wijkt niet af van de prevalentie gevonden in de algemene Nederlandse bevolking (5,0%, van den Bunt et al. (2019)).

Bij één van de drie positieve deelnemers werd er ook in het monster van de jonge kalveren ESBL-producerende *E. coli* aangetroffen. Genetisch kwam het isolaat uit het dierlijke monster zeer sterk overeen met het isolaat van de humane deelnemer, waardoor het waarschijnlijk is dat hier overdracht tussen mens en dier heeft plaatsgevonden.

6.4.3 Risico voor de mens

In een recent gepubliceerde studie zijn ESBL-producerende isolaten uit een groot aantal Nederlandse reservoirs genetisch met elkaar

vergeleken (Dorado-Garcia et al., 2018). Eén van de belangrijkste conclusies was dat de belangrijkste ESBL types uit mensen relatief minder vaak in dieren worden aangetroffen en de ESBL types uit dieren relatief weinig bij mensen worden aangetroffen. Dit suggereert dat landbouwhuisdieren niet de belangrijkste reservoirs zijn van ESBL-producerende bacteriën bij mensen. Een recente bronattributiestudie schatte dat de overdracht van ESBL-producerende *E. coli* naar mensen in de algemene bevolking voor minder dan 5% afkomstig was van landbouwhuisdieren (Mughini-Gras et al., 2019).

Een uitzondering op deze conclusie zijn veehouders. In tegenstelling tot de algemene bevolking vertonen ESBL-producerende isolaten uit deze groep wel veel overeenkomsten met die van de dieren. Direct contact met dieren is voor deze groep waarschijnlijk een belangrijke besmettingsroute (Dorado-Garcia et al., 2018). Deze conclusie is gebaseerd op studies bij pluimvee- en varkenshouders. Onder melkveehouders is slechts beperkt onderzoek gedaan naar dragerschap van ESBL-producerende *E. coli* (Dahms et al., 2015; Hordijk et al., 2019). In deze studies is slechts één geval beschreven van waarschijnlijke overdracht van ESBL-producerende *E. coli* tussen rundvee en mens. In de huidige studie vonden wij ook één zeer vergelijkbaar isolaat in zowel rund als mens. Het risico van ESBL-transmissie vanuit melkvee lijkt ook voor veehouders relatief klein.

6.5 *Listeria monocytogenes*

6.5.1 Prevalentie melkvee

In deze studie werd *L. monocytogenes* aangetroffen op 33,7% van de melkveebedrijven, de prevalentie in monsters was 17,1%.

De prevalentie in individuele monsters lijkt iets lager dan de prevalenties van 25% en 30% die in recente studies op melkveebedrijven in Noorwegen en Letland werden gerapporteerd (Idland et al., 2022; Terentjeva et al., 2021). Omdat de manier van monsternamen verschilt van onze studie, is een directe vergelijking echter lastig te maken.

Uit typering van 73 *L. monocytogenes* isolaten bleek dat er een grote variëteit aan clonal complexes op de verschillende bedrijven aanwezig was. Tijdens het onderzoek is het selectie criterium van isolaten voor WGS analyse veranderd. Hierdoor zijn in de eerste helft van het jaar méér isolaten per bedrijf met WGS geanalyseerd dan in de tweede helft van het jaar. Dit kan met name van invloed zijn geweest op de diversiteit van sequentietypen per bedrijf. De meest voorkomende serogroep was IIb (serotype 1/2b, 3b). Isolaten van deze serogroep hebben een relatief klein aandeel in het veroorzaken van humane infecties (in Nederland rond de 10%, Vlaanderen et al. (2020)). De meeste humane infecties worden veroorzaakt door het serogroep IVb (serotype 4b, 4d, 4e), die ook de hypervirulente clonal complexes CC1, CC4 en CC6 omvat (Maury et al., 2016). Deze clonal complexes zijn sterk geassocieerd met het veroorzaken van ziekteverschijnselen bij zowel mensen als runderen (encefalitis en abortus) (Papić et al., 2019). In deze studie werden op 20 bedrijven isolaten uit serogroep IVb gevonden, waarvan op 8 bedrijven isolaten uit clonal complex CC1.

6.5.2 *Risicofactoren melkvee*

In de multivariabele analyse werden zes significante risicofactoren gevonden voor de aanwezigheid van *L. monocytogenes*.

Monstername in de winter (december, januari of februari) werd geïdentificeerd als risicofactor in vergelijking met monstername in alle andere seizoenen. In een eerdere studie in de VS werd ook de hoogste prevalentie gevonden in de winter (Nightingale et al., 2005), terwijl in een studie uit Slovenië in het voorjaar de hoogste aantallen *L. monocytogenes* werden gevonden (Petra Bandelj et al., 2018). In ieder geval lijkt de uitscheiding van *L. monocytogenes* geassocieerd met de koudere maanden van het jaar. Dit zou te maken kunnen hebben met de hogere dierdichtheid wanneer de dieren op stal staan tijdens de winter of met het voeren van met *L. monocytogenes* besmet ruwvoer tijdens dit seizoen.

Lang werd het voeren van kuilvoer, en specifiek kuilvoer van slechte kwaliteit, als belangrijkste risicofactor voor *L. monocytogenes* infectie in herkauwers gezien. In meer recente studies wordt deze link minder vaak gevonden (Bagatella et al., 2022). In onze studie werd op vrijwel alle bedrijven (99%) kuilgras gevoerd, waardoor dit niet als risicofactor kon worden onderzocht. In de univariabele analyse werd het voeren van een ander type ruwvoer, namelijk hooi, als risicofactor geïdentificeerd ($p=0,007$). Deze variabele liet een correlatie zien met de variabele 'Weidegang voor het melkvee'. Daarom werden twee verschillende multivariabele modellen gemaakt: één met de variabele 'Hooi' en één met de variabele 'Weidegang'. Beide variabelen waren significant in hun eigen model, maar in een model met beide variabelen was 'Hooi' niet significant ($p=0,097$). Door de sterke correlatie is het niet mogelijk te bepalen aan welke van de twee variabelen (of beide) het effect is toe te schrijven.

In het definitieve model (Tabel 12) werd weidegang voor het melkvee als risicofactor voor het vóórkomen van *L. monocytogenes* op het bedrijf gevonden (OR=3,32). Dit is in tegenstelling tot een studie uit de VS waar weidegang juist als beschermend werd geïdentificeerd (Nightingale et al., 2005). Het is bekend dat *Listeria* isolaten jarenlang op melkveebedrijven kunnen persisteren, wellicht door fecaal-orale circulatie binnen het bedrijf (Bagatella et al., 2022). *Listeria* kan meer dan 120 dagen overleven in bemeste grond (Hutchison et al., 2005). Het is mogelijk dat weidegang bijdraagt aan de circulatie van *L. monocytogenes* onder het melkvee door verspreiding vanuit de weide naar het melkvee.

Een hoger vervangingspercentage van het melkvee ($\geq 25\%$) werd geïdentificeerd als beschermende factor (OR=0,43). Het vervangingspercentage is een belangrijk kengetal in de melkveehouderij en gerelateerd aan veel andere bedrijfskenmerken. Een hoger vervangingspercentage betekent mogelijk dat de gemiddelde leeftijd van het melkvee lager is, een laag vervangingspercentage duidt op het streven naar een hoge levensmelkproductie of op uitbreiding van het bedrijf. Uit de literatuur is in ieder geval geen invloed van leeftijd op het vóórkomen van *L. monocytogenes* bij runderen bekend (Walland et al., 2015).

Ook het gebruik van gescheiden mest als bodembedekking werd als beschermend geïdentificeerd (OR=0,20). Dit is verrassend, gezien er zorgen bestaan over het gebruik van gescheiden mest als bodembedekking vanwege de potentiële aanwezigheid van verschillende bacteriën. In een Canadese studie werd in gescheiden mest zelfs relatief vaak (30%) *L. monocytogenes* gevonden (Beauchemin et al., 2022). Het is onduidelijk waarom deze bodembedekking in onze studie als beschermend werd geïdentificeerd. Wellicht is er een relatie met een andere management variabele die in ons onderzoek niet is uitgevraagd.

Tenslotte bleek diarree bij het melkvee in de zes maanden voor monsternamen een risicofactor voor de aanwezigheid van *L. monocytogenes* (OR=4,36). De meest bekende klinische symptomen van *L. monocytogenes* bij herkauwers zijn hersenverschijnselen, abortus en septicaemia. Echter, ook enteritis met diarree wordt incidenteel beschreven bij runderen (Bagatella et al., 2022). Het is mogelijk dat deze risicofactor er op wijst dat diarree met onbekende oorzaak bij melkvee vaker wordt veroorzaakt door *Listeria*.

6.5.3 Resultaten bij veehouders, medewerkers en gezinsleden

Bij twee deelnemers werd *L. monocytogenes* in het ontlastingsmonster gevonden. Op het bedrijf van één van de deelnemers werd ook *L. monocytogenes* aangetroffen. De typering van het humane en dierlijke isolaat kwam echter niet overeen. Er is hier dus waarschijnlijk geen sprake van overdracht van *Listeria* tussen het melkvee en de humane deelnemer.

De positieve deelnemers rapporteren geen klachten geassocieerd met listeriose (koorts, spierpijn, maagklachten). Asymptomatisch dragerschap van *L. monocytogenes* komt vaker voor, alhoewel de prevalenties in de verschillende studies uiteenlopen. Een recente studie vond op basis van PCR *L. monocytogenes* in de ontlasting van 10% van een gezonde populatie in Frankrijk (Hafner et al., 2021).

6.5.4 Risico voor de mens

Humane *Listeria* infecties worden voornamelijk overgedragen via voedsel. Vele typen voedsel kunnen zijn besmet met *Listeria*, wat voortkomt uit het feit dat *Listeria* een ubiquitair voorkomende bacterie is. In een recente bronattribuïestudie blijken vele typen voedsel bronnen van humane listeriose te kunnen zijn, alhoewel zuivel met 30% de grootste bron is (Mughini-Gras et al., 2022). Binnen de zuivel zijn voornamelijk de consumptie van zachte kaas en rauwe zuivel risicofactoren voor humane listeriose (Leclercq et al., 2021). In Nederland wordt *Listeria* incidenteel op of in diverse typen kaas aangetroffen, maar vaker bij rauwmelkse kaas dan bij niet-rauwmelkse kaas (*Advies over de risico's van de zuivelketen*, 2017).

In Nederland wordt het overgrote merendeel van de melk industrieel verwerkt en daarbij gepasteuriseerd of gesteriliseerd (96%). De overige 4% wordt door zelfverwerkende boeren (deels) rauw verwerkt en verkocht. Interessant om op te merken is dat van de humane deelnemers aan deze studie 35% aangaf rauwe zuivelproducten van eigen bedrijf te consumeren, wat erop lijkt te wijzen dat melkveehouders en gezinsleden meer rauwe zuivelproducten

consumeren dan de algemene bevolking en dus wellicht meer risico lopen op een *Listeria* infectie.

6.6 MRSA

6.6.1 *Prevalentie melkvee*

In deze studie werd op 6% van de melkveebedrijven MRSA aangetroffen op basis van bemonstering van lieshuid en stalstof. Alhoewel op de meeste positieve bedrijven zowel in het stalstof als in de huidswab MRSA werd aangetroffen, werd er op drie bedrijven MRSA aangetroffen in het stalstof, terwijl de huidswabs genomen op deze bedrijven negatief waren. Bemonstering van stalstof lijkt dus gevoeliger dan alleen bemonstering op basis van huidswabs.

De hier gevonden prevalentie lijkt vergelijkbaar met de prevalentie van 3,9% die in 2011/2012 werd gevonden in huidswabs Nederlands melkvee in het slachthuis (van Duijkeren et al., 2014). Vanwege de verschillende monsternamestrategieën is een directe vergelijking echter lastig te maken.

In een aantal Europese landen is de MRSA prevalentie in recente jaren onderzocht op basis van tankmelk. Prevalenties van respectievelijk 2,8%, 9,7% en 3,8% werden gevonden in Denemarken, Duitsland en Italië (Cortimiglia et al., 2016; Hansen et al., 2019; Tenhagen et al., 2018).

De prevalentie van MRSA in melkveebedrijven is laag in vergelijking tot varkensbedrijven en kalverbedrijven (Graveland et al., 2010; *MARAN 2022*, 2022).

6.6.2 *Resultaten bij veehouders, medewerkers en gezinsleden*

Bij één deelnemer werd MRSA in de neusswab aangetroffen. Ook in het stalstof van het bijbehorende bedrijf werd MRSA aangetroffen. Beide isolaten bleken genetisch niet te zijn verwant.

Naast contact met melkvee rapporteerde deze deelnemer ook dagelijks contact met vleeskalveren. Het is bekend dat regelmatig contact met vleeskalveren een risicofactor is voor MRSA-dragerschap (Dorado-García et al., 2013; Graveland et al., 2010).

De gevonden MRSA prevalentie van 0,9% is vergelijkbaar met de prevalentie in de algemene Nederlandse bevolking (0,2%, Den Heijer et al. (2013)).

6.6.3 *Risico voor de mens*

Sinds het begin van deze eeuw is bekend dat MRSA uit landbouwhuisdieren (livestock associated of LA-MRSA) kan worden overgedragen van dieren naar mensen die veelvuldig contact met deze dieren hebben, waaronder veehouders (Wagenaar & Van de Giessen, 2009).

Ook voor melkveehouders is dit aangetoond (Juhász-Kaszanyitzky et al., 2007).

Beroepsmatig contact met landbouwhuisdieren zoals rundvee is een belangrijke risicofactor voor dragerschap van CC398 MRSA. In een recente wereldwijde meta-analyse werd een OR van 5,7 (95% BI: 2,2-14,6) gevonden voor mensen die regelmatig contact hadden met rundvee (Liu et al., 2019). MRSA dragerschap is in principe niet gevaarlijk voor gezonde dragers. Wel is bekend dat MRSA dragerschap in het algemeen een risico is voor het ontwikkelen van infecties met MRSA.

Uit studies en casusbeschrijvingen is duidelijk gebleken dat LA-MRSA (CC398), net zoals andere MRSA typen, verschillende soorten lokale, systemische en zelfs levensbedreigende infecties kan veroorzaken (Becker et al., 2017; Goerge et al., 2017). Daarnaast zijn er echter ook aanwijzingen van klinische verschillen tussen LA-MRSA en andere MRSA typen. Patiënten met LA-MRSA infecties verblijven in vergelijking tot patiënten met andere typen MRSA gemiddeld minder lang in het ziekenhuis en hoeven minder vaak behandeld te worden op de intensive care. Patiënten met LA-MRSA hebben echter ook gemiddeld een lagere leeftijd. Daarnaast worden er in LA-MRSA isolaten minder vaak exotoxines gevonden die kunnen leiden tot Toxisch Shock Syndroom (Becker et al., 2017).

LA-MRSA kan ook worden overgedragen tussen mensen, alhoewel dit minder efficiënt lijkt te zijn dan de overdracht van andere typen MRSA (Wassenberg et al., 2011). De laatste jaren wordt er in toenemende mate LA-MRSA (CC398) gevonden in mensen die geen contact hebben gehad met landbouwhuisdieren (Bosch et al., 2016). Deze mensen kunnen ook langdurig drager zijn van dit type MRSA (Meijs et al., 2020). De oorsprong en de transmissieroutes van LA-MRSA bij mensen zonder contact met landbouwhuisdieren is nog niet bekend (Lekkerkerk et al., 2015).

Tenslotte kan MRSA ook voorkomen op vlees, inclusief rundvlees en in melk. Mogelijk kan MRSA op deze manier ook worden overgedragen op mensen, maar er is nog niet veel onderzoek gedaan naar deze besmettingsroute (Bortolaia et al., 2016; Larsen et al., 2016).

6.7 Salmonella

6.7.1 Prevalentie melkvee

In dit onderzoek werd op 4 melkveebedrijven *Salmonella* aangetroffen (2,2%). Deze prevalentie is vergelijkbaar met de prevalentie op basis van antilichamen in tankmelk (<5% in 2021) welke uitgevoerd wordt in het kader van zuivelkwaliteitssystemen (GD, 2021).

De gevonden *Salmonella* serotypen waren *S. Dublin*, *S. Typhimurium* en *S. Mbandaka*. Alle drie kunnen ziekteverschijnselen bij runderen veroorzaken (Cummings et al., 2009). Het serotype *S. Dublin* is echter één van de belangrijkste pathogene *Salmonella* types bij runderen en kan leiden tot verminderde productie, longklachten, hoge koorts, diarree, abortus en sterfte (Nielsen, 2013).

6.7.2 *Resultaten bij veehouders, medewerkers en gezinsleden*
Salmonella werd niet gevonden bij de deelnemende veehouders, medewerkers en gezinsleden in deze studie.

6.7.3 *Risico voor de mens*
 Van de gevonden *Salmonella* serotypen komen zowel *S. Typhimurium* en *S. Dublin* regelmatig voor in de humane lab-surveillance in Nederland. *S. Typhimurium* staat al jarenlang in de top 3 van meest voorkomende serotypen in humane infecties. *S. Dublin* wordt per jaar zo'n 10-20 keer per jaar geïsoleerd, maar staat bekend als een serotype wat vaak invasieve infecties veroorzaakt (Mughini-Gras et al., 2020; Vlaanderen et al., 2020).

Runderen zijn voor humane *Salmonella*-infecties een minder belangrijk reservoir (<10%, Mughini-Gras et al. (2022); Mughini-Gras et al. (2014)). Voor de *Salmonella*-infecties gerelateerd aan runderen is beroepsmatig contact met dieren geïdentificeerd als risicofactor. In deze studie werd bij de humane deelnemers echter geen *Salmonella* gevonden.

6.8 STEC

6.8.1 *Prevalentie melkvee*

In de huidige studie werd op 21% van de melkveebedrijven STEC gevonden. Deze prevalentie is lager dan die in Spaanse melkveebedrijven van 31% (Oporto et al., 2019). Een directe vergelijking tussen beide studies is echter lastig vanwege verschillende monsternamestrategieën.

De hier beschreven prevalentie is gebaseerd op analyse van één gepoold mestmonster van volwassen melkvee. In STEC prevalentiestudies waarbij mest van een groot aantal individuele dieren per bedrijf wordt geanalyseerd worden regelmatig bedrijfsprevalenties van 100% gevonden (Ballem et al., 2020; Venegas-Vargas et al., 2016).

Tussen 1996-2005 werd op Nederlandse melkveebedrijven een bedrijfsprevalentie van het STEC serotype O157 van 8% gevonden (Berends et al., 2008). Hierbij werden mestmonsters specifiek gescreend op de aanwezigheid van O157. Desondanks is het opvallend dat in de huidige studie het serotype O157 helemaal niet werd gevonden.

In de huidige studie was het meest voorkomende serotype O182:H25. Ook in de studie in Nederlandse vleesrunderen uit 2017 werd O182:H25 veel gevonden (Cuperus et al., 2019). In Nederland zijn, naast O157, de 5 meest gevonden serotypes in humane infecties O26, O63, O103, O145 en O146. Van deze typen werden in de huidige studie in de dierlijke monsters alleen één keer O26 en één keer O103 gevonden.

6.8.2 *Risicofactoren melkvee*

In de multivariabele analyse werden vier significante risicofactoren voor de aanwezigheid van STEC op het melkveebedrijf gevonden.

Bij monsternamen in de zomer of herfst werd significant minder vaak STEC gevonden dan bij monsternamen in de winter. Deze bevinding wijkt af van eerdere studies, waarbij vrij consistent méér STEC (zowel O157 als non-O157) werd gevonden in de zomer en de herfst (Schouten et al., 2004; Withenshaw et al., 2022). Het is onduidelijk waardoor dit verschil wordt veroorzaakt.

Het aanvoeren van rundermest van andere bedrijven werd geïdentificeerd als risicofactor (OR=7,01). Runderen scheiden STEC uit via mest en STEC kan langere tijd in mest overleven (Fremaux et al., 2007). Aangevoerde rundermest kan daardoor een vector zijn voor het introduceren van STEC op melkveebedrijven.

Het gebruik van penicilline antibiotica werd geïdentificeerd als beschermend tegen de aanwezigheid van STEC (OR=0,16). STECs zijn meestal gevoelig voor een breed scala aan antibiotica en dragen relatief weinig antibiotica resistentie genen bij zich. Het is mogelijk dat behandeling van melkvee met penicilline antibiotica als bijeffect leidt tot het verdwijnen van STEC uit deze dieren. Interessant is dat een eerdere studie uit Ierland het gebruik van antibiotica identificeerde als risicofactor voor STEC (Stenkamp-Strahm et al., 2017). In die studie werd echter alleen gekeken naar STEC O157, welke in onze studie niet werd gevonden.

Tenslotte werd de toepassing van kunstmatige inseminatie (KI) als beschermende factor geïdentificeerd (OR=0,20). Deze variabele werd in de literatuur niet eerder in verband gebracht met STEC. Het is onduidelijk wat het verband is tussen KI en de aanwezigheid van STEC. Slechts bij een klein deel van de deelnemende melkveebedrijven werd geen KI toegepast (11 bedrijven). Wellicht is er een relatie met een andere managementfactor die in onze studie niet is uitgevraagd.

6.8.3 *Resultaten bij veehouders, medewerkers en gezinsleden*

Bij één humane deelnemer werd STEC O182:H25 gevonden. In het diermonster van het bijbehorende bedrijf werd geen STEC aangetoond. Het serotype O182:H25 is echter wel het meest gevonden serotype op de deelnemende melkveebedrijven. Alhoewel asymptomatisch dragerschap van STEC maar zelden wordt beschreven, rapporteerde de positieve deelnemer geen gezondheidsklachten (Urdahl et al., 2013).

6.8.4 *Risico voor de mens*

Rundvee is een belangrijk reservoir voor STEC. Humane STEC infecties kunnen op basis van een Nederlandse bronattributiestudie voor ongeveer 50% worden toegeschreven aan runderen (Mughini-Gras et al., 2017). Voor de door voedsel overgedragen STEC infecties is rundvlees de belangrijkste bron. Het eten van (rauw) rundvlees is meermaals beschreven als risicofactor voor STEC (O157) infectie (Kassenborg et al., 2004; McPherson et al., 2009; Mughini-Gras et al., 2017). Uitbraken van STEC infecties gerelateerd aan het drinken van rauwe melk zijn beschreven (Treacy et al., 2019). Relatief is zuivel echter minder belangrijk voor het overdragen van STEC infecties, minder dan 5% van de humane infecties worden toegeschreven aan zuivel (Benincà et al., 2021).

Naast de overdracht via voedsel kan STEC ook worden overgedragen door direct of indirect contact met runderen. De dichtheid van runderen in een gebied is geassocieerd met humane infecties. Dit verband is vastgesteld in zowel Nederland als Duitsland en Engeland (Elson et al., 2018; Frank et al., 2008; Friesema et al., 2011). Een direct verband tussen mens en dier werd bij de ene positieve deelnemer in deze studie niet vastgesteld.

6.9 Microbioom

In de afgelopen 10 jaar is uit onderzoek gebleken dat contact met dieren invloed kan hebben op de samenstelling van het microbiom van mensen (Mucci et al., 2022; Trinh et al., 2018). Zo is onder andere invloed op de diversiteit en samenstelling van het huid-, neus-, mond- en darmmicrobioom beschreven in mensen die samenleven met huisdieren of professioneel contact hebben met (voornamelijk) landbouwhuisdieren. Ook is gebleken dat delen van het microbiom vergelijkbaar kunnen zijn tussen de mens en de dieren waar contact mee is. Uit een Amerikaanse studie onder melkveehouders bleek dat de samenstelling van het nasale microbiom van melkveehouders significant verschilde van dat van controle deelnemers (Shukla et al., 2017).

In onze studie bleek de diversiteit van het microbiom van de melkveehouders significant lager in vergelijking met controle deelnemers. In een eerdere studie onder Chinese varkenshouders werd dit verschil ook gevonden (Sun et al., 2017), terwijl in een recente Nederlandse studie geen verschil in microbiom diversiteit werd gevonden tussen varkenshouders en controle deelnemers, maar wel een lagere diversiteit werd gevonden in pluimveehouders (Van Gompel et al., 2020). Een lage diversiteit van het microbiom wordt vaak geassocieerd met minder optimale gezondheid, alhoewel hiervoor een lage diversiteit wel samengaat met de toename van bepaalde groepen bacteriën zoals Proteobacteria en Bacilli (Kriss et al., 2018), wat in onze studie niet werd gevonden.

In de huidige studie werd naast een verschil in diversiteit ook een significant verschil gevonden in samenstelling van het darmmicrobioom van melkveehouders ten opzichte van controle deelnemers uit de algemene bevolking. Dit verschil werd voor een groot deel veroorzaakt door de hogere aanwezigheid van het genus *Prevotella* in melkveehouders. Uit de eerder genoemde studie met varkenshouders in China bleek ook dat de samenstelling van het darmmicrobioom significant verschilde van niet-veehouder controles (Sun et al., 2017). Interessant genoeg gebruikte een andere studie met varkenshouders rundveehouders als controlegroep en bleek ook tussen deze twee groepen veehouders een significant verschil te bestaan in samenstelling van het darmmicrobioom (Moor et al., 2021). Echter, in die studie werd juist in varkenshouders een hogere aanwezigheid van *Prevotellaceae* gevonden (Moor et al., 2021).

Prevotella is een genus van vezel-afbrekende Gram-negatieve bacteriën, verwant aan *Bacteroides*. Vaak worden darmmicrobiomen gedomineerd door óf *Prevotella* óf *Bacteroides* (Gorvitovskaia et al., 2016). Hierbij

word *Prevotella* vaker gevonden bij niet-Westerse populaties en geassocieerd met een dieet rijk aan vezels en complexe koolhydraten (Tett et al., 2021).

Omdat er over het dieet van zowel de melkveehouders als controle deelnemers geen uitgebreide informatie beschikbaar was, konden geen aanvullende analyses over eetgewoonten worden uitgevoerd. Wel bleek dat ook binnen de groep deelnemers van melkveebedrijven een associatie bestond tussen *Prevotella* aanwezigheid en de mate van contact met het melkvee. In een eerdere studie onder varkenshouders werden overeenkomsten gevonden tussen bacteriële sequenties (waaronder *Prevotella*) in monsters van varkenshouders, varkens en luchtmonsters uit de varkensstallen (Moor et al., 2021). Dit leidde tot de hypothese dat de opname van aerosolen met bacteriën afkomstig van varkens door de varkenshouders het microbiom van deze personen beïnvloed. Het is bekend dat ook bij koeien *Prevotella* veel voorkomt in het microbiom, voornamelijk in de pens (Mao et al., 2015). In onze studie hebben wij het microbiom van de koeien niet bepaald, dus was het niet mogelijk de overeenkomsten tussen de melkveehouders en koeien te bepalen. Voor studies in de toekomst zou dit een belangrijke toevoeging zijn, aangezien ook andere studies overlap van sequenties laten zien in het microbiom van mensen en dieren waarmee zij contact hebben (Tan et al., 2020).

Naast dieet heeft ook leefomgeving een belangrijke invloed op de samenstelling van het microbiom van mensen (Gupta et al., 2017). Om hiervoor te corrigeren hebben we gekeken naar de stedelijkheidsgraad van de woonplaatsen van melkveehouders en controle deelnemers. In onze studie bleek deze inderdaad zeer verschillend in beide groepen. Deze verschillen in stedelijkheidsgraad bleken echter geen invloed te hebben op de samenstelling van het microbiom. Wellicht heeft dit te maken met het feit dat Nederland een klein land is waar ook tussen stedelijke en niet-stedelijke omgevingen minder verschil is dan in studies uit andere landen.

Deze studie biedt een interessante eerste inkijk in de samenstelling van het microbiom van melkveehouders en de aannemelijke invloed van het contact met melkvee hierop. Wat deze verschillen in het microbiom betekenen voor (melk)veehouders kan met alleen de data uit deze studie niet worden geconcludeerd. Voor toekomstige studies is het met name van belang om een controlegroep binnen de eigen studie te kunnen bemonsteren. Op deze manier kan het verschil tussen de studiegroep en de controlegroep tot één onderwerp worden beperkt (diercontact) terwijl andere verschillen met potentiële invloed zo klein mogelijk worden gehouden. Daarnaast kan aan alle deelnemers de benodigde achtergrondinformatie worden gevraagd. Ten tweede zou het ook erg interessant zijn om het microbiom in dierlijke monsters te bepalen. Hiervoor is het nodig om ook de methode van verzamelen van dierlijke en humane ontlasting gelijk te trekken. Ook voor het verzamelen van een dierlijk monster zou dus gebruik moeten worden gemaakt van een DNA beschermende matrix (DNA/RNA Shield Reagent of vergelijkbaar).

7 Conclusie

In deze studie werd op het merendeel van de melkveebedrijven *Campylobacter* aangetroffen. STEC en *Listeria monocytogenes* werden op respectievelijk rond de 20% en 30% van de bedrijven aangetroffen. Deze bacteriën vormen een potentieel risico voor de consument bij consumptie van zuivel en rundvlees en voornamelijk in het geval van STEC ook voor veehouders en bezoekers door direct contact met het melkvee. Bij de humane deelnemers in deze studie werd bij één deelnemer STEC aangetroffen en bij één deelnemer *C. jejuni*. In het geval van *Campylobacter* werd deze bacterie ook gevonden bij de runderen op het bedrijf. Van de getypeerde *L. monocytogenes* isolaten uit diermonsters behoorde ongeveer een kwart tot de serogroep die sterk geassocieerd is met het veroorzaken van ziekteverschijnselen bij mensen én runderen.

ESBL-producerende *E. coli*, MRSA en *Salmonella* werden aangetoond op minder dan 10% van de bedrijven. In het geval van ESBL-producerende *E. coli* werd er op één bedrijf een overeenkomst gevonden tussen het isolaat bij dier en mens, waardoor directe transmissie tussen melkvee en veehouder aannemelijk is. Op één bedrijf werd zowel bij dier als mens MRSA aangetroffen, maar hierbij werd geen genetische overeenkomst aangetoond. De bij veehouders gevonden prevalenties van ESBL-producerende *E. coli* en MRSA wijken niet af van de prevalenties in de algemene bevolking.

Cryptosporidium parvum is alleen in monsters van kalveren geanalyseerd. Deze parasiet werd in meer dan 70% van de monsters van kalveren jonger dan 4 weken gevonden. Ook *Clostridioides difficile* werd voornamelijk aangetroffen bij de jonge kalveren, namelijk bij 17%. In humane deelnemers werd geen *C. parvum* of *C. difficile* gevonden. Het type *C. parvum* dat bij kalveren werd gevonden is hetzelfde type dat bij de meeste humane infecties gevonden wordt, namelijk IIaA15G2R1. Anderzijds werd in het geval van *C. difficile* bij de koeien voornamelijk het onbekende ribotype 695 gevonden. Dit type is tot nu toe zeer zeldzaam in de humane populatie, maar zal naar aanleiding van de bevindingen in dit onderzoek vanaf 2022 in de humane surveillance worden opgenomen.

Er zijn risicofactoranalyses uitgevoerd voor het vóórkomen van *L. monocytogenes* en STEC bij melkkoeien en *C. parvum* en *C. difficile* bij jonge kalveren. Het vinden van een associatie in een risicofactoranalyse betekent niet automatisch een oorzakelijk verband tussen de variabele en het pathogeen, maar kan wel aanleiding zijn voor een vervolgonderzoek bestaande uit bijvoorbeeld interventiestudies.

Voor *L. monocytogenes* werden in deze studie zes risicofactoren geïdentificeerd, waarvan alleen het seizoen van monsternamen in eerdere studies was beschreven. Ook de overige gevonden risicofactoren geven weinig duidelijke aanknopingspunten voor maatregelen. Voor STEC was het aanvoeren van rundermest een risicofactor die goed verklaard kan worden. De overige gevonden factoren (gebruik van penicilline

antibiotica en gebruik van KI) werden als beschermend tegen STEC geïdentificeerd, waarvoor niet direct een biologische verklaring kon worden gegeven.

Voor *Clostridioides difficile* werden in deze studie risicofactoren geïdentificeerd gerelateerd aan voeding en huisvesting van (jonge) kalveren. Voor *Cryptosporidium parvum* werd net als in eerdere studies het seizoen van monsternamen als risicofactor geïdentificeerd en zorgde ook een groter aantal bemonsterde kalveren voor een hoger risico om *C. parvum* te detecteren.

De resultaten uit deze studie zijn een aanvulling op de bestaande monitoring van *Salmonella* (GD) en ESBL-producerende bacteriën (MARAN) in de melkveehouderij. Voor beide pathogenen sloten de resultaten uit deze studie goed aan op resultaten van bestaande monitoring.

Tenslotte werd in deze studie een verschil gevonden in de samenstelling van het darmmicrobioom tussen melkveehouders en een controlegroep van niet-veehouders. Dit verschil werd voor het grootste deel veroorzaakt door de hogere aanwezigheid van *Prevotella_9* in het microbioom van de melkveehouders. Verder onderzoek is nodig om te duiden wat dit verschil zou kunnen betekenen.

Deze studie bevestigt dat er op melkveebedrijven verschillende bacteriën (*Campylobacter*, *Listeria*, STEC) en de parasiet *Cryptosporidium* voorkomen die via ongepasteuriseerde zuivel of consumptie van niet-goed verhit vlees en direct of indirect contact kunnen worden overgedragen op de mens. Ook *Salmonella* en de antibiotica-resistente bacteriën ESBL-producerende *E. coli* en MRSA zijn aangetoond, maar in de verspreiding van deze bacteriën lijkt de melkveehouderij minder van belang.

Referenties

- Adler, A., Sturlesi, N., Fallach, N., Zilberman-Barzilai, D., Hussein, O., Blum, S. E., Klement, E., Schwaber, M. J., & Carmeli, Y. (2015). Prevalence, Risk Factors, and Transmission Dynamics of Extended-Spectrum- β -Lactamase-Producing Enterobacteriaceae: a National Survey of Cattle Farms in Israel in 2013. *J Clin Microbiol*, *53*(11), 3515-3521. <https://doi.org/10.1128/jcm.01915-15>
- Advies over de risico's van de zuivelketen.* (2017).
- Alves, M., Xiao, L., Sulaiman, I., Lal, A. A., Matos, O., & Antunes, F. (2003). Subgenotype Analysis of *Cryptosporidium* Isolates from Humans, Cattle, and Zoo Ruminants in Portugal. *Journal of Clinical Microbiology*, *41*(6), 2744-2747. <https://doi.org/doi:10.1128/JCM.41.6.2744-2747.2003>
- Arsenopoulos, K., Theodoridis, A., & Papadopoulos, E. (2017). Effect of colostrum quantity and quality on neonatal calf diarrhoea due to *Cryptosporidium* spp. infection. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, *53*, 50-55. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cimid.2017.07.005>
- Bagatella, S., Tavares-Gomes, L., & Oevermann, A. (2022). *Listeria monocytogenes* at the interface between ruminants and humans: A comparative pathology and pathogenesis review. *Vet Pathol*, *59*(2), 186-210. <https://doi.org/10.1177/03009858211052659>
- Bal, A. M., Coombs, G. W., Holden, M. T. G., Lindsay, J. A., Nimmo, G. R., Tattevin, P., & Skov, R. L. (2016). Genomic insights into the emergence and spread of international clones of healthcare-, community- and livestock-associated meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*: Blurring of the traditional definitions. *J Glob Antimicrob Resist*, *6*, 95-101. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2016.04.004>
- Ballem, A., Gonçalves, S., Garcia-Meniño, I., Flament-Simon, S. C., Blanco, J. E., Fernandes, C., Saavedra, M. J., Pinto, C., Oliveira, H., Blanco, J., Almeida, G., & Almeida, C. (2020). Prevalence and serotypes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) in dairy cattle from Northern Portugal. *PLoS ONE*, *15*(12), e0244713. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0244713>
- Bandelj, P., Blagus, R., Briski, F., Frlic, O., Vergles Rataj, A., Rupnik, M., Ocepek, M., & Vengust, M. (2016). Identification of risk factors influencing *Clostridium difficile* prevalence in middle-size dairy farms. *Vet Res*, *47*, 41. <https://doi.org/10.1186/s13567-016-0326-0>
- Bandelj, P., Harmanus, C., Blagus, R., Cotman, M., Kuijper, E. J., Ocepek, M., & Vengust, M. (2018). Quantification of *Clostridioides (Clostridium) difficile* in feces of calves of different age and determination of predominant *Clostridioides difficile* ribotype 033 relatedness and transmission between family dairy farms using multilocus variable-number tandem-repeat analysis. *BMC Vet Res*, *14*(1), 298. <https://doi.org/10.1186/s12917-018-1616-8>

- Bandelj, P., Jamnikar-Ciglenecki, U., Ocepek, M., Blagus, R., & Vengust, M. (2018). Risk factors associated with fecal shedding of *Listeria monocytogenes* by dairy cows and calves. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 32(5), 1773-1779. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/jvim.15234>
- Bartels, C. J., Holzhauser, M., Jorritsma, R., Swart, W. A., & Lam, T. J. (2010). Prevalence, prediction and risk factors of enteropathogens in normal and non-normal faeces of young Dutch dairy calves. *Prev Vet Med*, 93(2-3), 162-169. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2009.09.020>
- Beauchemin, J., Fréchette, A., Thériault, W., Dufour, S., Fravallo, P., & Thibodeau, A. (2022). Comparison of microbiota of recycled manure solids and straw bedding used in dairy farms in eastern Canada. *J Dairy Sci*, 105(1), 389-408. <https://doi.org/10.3168/jds.2021-20523>
- Becker, K., Ballhausen, B., Kahl, B. C., & Kock, R. (2017). The clinical impact of livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* of the clonal complex 398 for humans. *Vet Microbiol*, 200, 33-38. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.11.013>
- Benincà, E., Lagerweij, G. R., Pijnacker, R., Friesema, I., Kretzschmar, M., Franz, E., & Mughini Gras, L. (2021). *Disease burden of food-related pathogens in the Netherlands, 2020*. <https://www.rivm.nl/bibliotheek/rapporten/2021-0161.pdf>
- Berends, I. M., Graat, E. A., Swart, W. A., Weber, M. F., van de Giessen, A. W., Lam, T. J., Heuvelink, A. E., & van Weering, H. J. (2008). Prevalence of VTEC O157 in dairy and veal herds and risk factors for veal herds. *Prev Vet Med*, 87(3-4), 301-310. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2008.05.004>
- Bortolaia, V., Espinosa-Gongora, C., & Guardabassi, L. (2016). Human health risks associated with antimicrobial-resistant enterococci and *Staphylococcus aureus* on poultry meat. *Clin Microbiol Infect*, 22(2), 130-140. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2015.12.003>
- Bosch, T., van Luit, M., Pluister, G. N., Frenzt, D., Haenen, A., Landman, F., Witteveen, S., van Marm-Wattimena, N., van der Heide, H. G., & Schouls, L. M. (2016). Changing characteristics of livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from humans - emergence of a subclade transmitted without livestock exposure, the Netherlands, 2003 to 2014. *Euro Surveill*, 21(21). <https://doi.org/10.2807/1560-7917.Es.2016.21.21.30236>
- Cacciò, S. M., & Chalmers, R. M. (2016). Human cryptosporidiosis in Europe. *Clin Microbiol Infect*, 22(6), 471-480. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2016.04.021>
- Callahan, B. J., McMurdie, P. J., Rosen, M. J., Han, A. W., Johnson, A. J. A., & Holmes, S. P. (2016). DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods*, 13(7), 581-583. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3869>
- Caporaso, J. G., Ackerman, G., Apprill, A., Bauer, M. P., Berg-Lyons, D., Betley, J., Fierer, N., Fraser, L., Fuhrman, J. A., Gilbert, J. A., Gormley, N., Humphrey, G., Huntley, J., Jansson, J. K., Knight, R., Lauber, C. L., Lozupone, C. A., McNally, S., Needham, D. M., . . . Weber, L. (2018). EMP 16S Illumina Amplicon Protocol. *protocols.io*.

- Cortimiglia, C., Luini, M., Bianchini, V., Marzagalli, L., Vezzoli, F., Avisani, D., Bertoletti, M., Ianzano, A., Franco, A., & Battisti, A. (2016). Prevalence of *Staphylococcus aureus* and of methicillin-resistant *S. aureus* clonal complexes in bulk tank milk from dairy cattle herds in Lombardy Region (Northern Italy). *Epidemiology and Infection*, *144*(14), 3046-3051.
<https://doi.org/10.1017/S0950268816001576>
- Cummings, K. J., Warnick, L. D., Alexander, K. A., Cripps, C. J., Gröhn, Y. T., McDonough, P. L., Nydam, D. V., & Reed, K. E. (2009). The incidence of salmonellosis among dairy herds in the northeastern United States. *J Dairy Sci*, *92*(8), 3766-3774.
<https://doi.org/10.3168/jds.2009-2093>
- Cuperus, T., Opsteegh, M., Wit, B., Dierikx, C., Hengeveld, P. D., Dam-Deisz, C., Uiterwijk, M., Roelfsema, J. H., Van Hoek, A. H., & Van der Giessen, J. (2019). *Surveillance zoonosen in vleesrunderen 2017* (RIVM 2019-0081).
<https://www.rivm.nl/bibliotheek/rapporten/2019-0081.pdf>
- Dahms, C., Hubner, N. O., Kossow, A., Mellmann, A., Dittmann, K., & Kramer, A. (2015). Occurrence of ESBL-Producing *Escherichia coli* in Livestock and Farm Workers in Mecklenburg-Western Pomerania, Germany. *PLoS ONE*, *10*(11), e0143326.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0143326>
- Davis, M. A., Moore, D. L., Baker, K. N., French, N. P., Patnode, M., Hensley, J., Macdonald, K., & Besser, T. E. (2013). Risk factors for campylobacteriosis in two washington state counties with high numbers of dairy farms. *J Clin Microbiol*, *51*(12), 3921-3927.
<https://doi.org/10.1128/jcm.01433-13>
- Deksne, G., Mateusa, M., Cvetkova, S., Derbakova, A., Keidāne, D., Troell, K., & Schares, G. (2022). Prevalence, risk factor and diversity of *Cryptosporidium* in cattle in Latvia. *Vet Parasitol Reg Stud Reports*, *28*, 100677.
<https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2021.100677>
- Den Heijer, C. D., van Bijnen, E. M., Paget, W. J., Pringle, M., Goossens, H., Bruggeman, C. A., Schellevis, F. G., & Stobberingh, E. E. (2013). Prevalence and resistance of commensal *Staphylococcus aureus*, including methicillin-resistant *S. aureus*, in nine European countries: a cross-sectional study. *Lancet Infect Dis*, *13*(5), 409-415. [https://doi.org/10.1016/s1473-3099\(13\)70036-7](https://doi.org/10.1016/s1473-3099(13)70036-7)
- Di Piazza, F., Di Benedetto, M. A., Maida, C. M., Glorioso, S., Adamo, G., Mazzola, T., & Firenze, A. (2013). A study on occupational exposure of Sicilian farmers to *Giardia* and *Cryptosporidium*. *J Prev Med Hyg*, *54*(4), 212-217.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4718323/pdf/1121-2233-54-212.pdf>
- Dierikx, C., van der Goot, J., Fabri, T., van Essen-Zandbergen, A., Smith, H., & Mevius, D. (2013). Extended-spectrum- β -lactamase- and AmpC- β -lactamase-producing *Escherichia coli* in Dutch broilers and broiler farmers. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *68*(1), 60-67.
<https://doi.org/10.1093/jac/dks349>

- Dohmen, W., Bonten, M. J., Bos, M. E., van Marm, S., Scharringa, J., Wagenaar, J. A., & Heederik, D. J. (2015). Carriage of extended-spectrum β -lactamases in pig farmers is associated with occurrence in pigs. *Clin Microbiol Infect*, *21*(10), 917-923. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2015.05.032>
- Dorado-García, A., Bos, M. E., Graveland, H., Van Cleef, B. A., Verstappen, K. M., Kluytmans, J. A., Wagenaar, J. A., & Heederik, D. J. (2013). Risk factors for persistence of livestock-associated MRSA and environmental exposure in veal calf farmers and their family members: an observational longitudinal study. *BMJ Open*, *3*(9), e003272. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2013-003272>
- Dorado-Garcia, A., Smid, J. H., van Pelt, W., Bonten, M. J. M., Fluit, A. C., van den Bunt, G., Wagenaar, J. A., Hordijk, J., Dierikx, C. M., Veldman, K. T., de Koeijer, A., Dohmen, W., Schmitt, H., Liakopoulos, A., Pacholewicz, E., Lam, T., Velthuis, A. G., Heuvelink, A., Gonggrijp, M. A., . . . Heederik, D. J. J. (2018). Molecular relatedness of ESBL/AmpC-producing *Escherichia coli* from humans, animals, food and the environment: a pooled analysis. *J Antimicrob Chemother*, *73*(2), 339-347. <https://doi.org/10.1093/jac/dkx397>
- Edwards, A. N., Karim, S. T., Pascual, R. A., Jowhar, L. M., Anderson, S. E., & McBride, S. M. (2016). Chemical and Stress Resistances of *Clostridium difficile* Spores and Vegetative Cells. *Front Microbiol*, *7*, 1698. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01698>
- Ellis-Iversen, J., Cook, A. J., Smith, R. P., Pritchard, G. C., & Nielsen, M. (2009). Temporal patterns and risk factors for *Escherichia coli* O157 and *Campylobacter* spp, in young cattle. *J Food Prot*, *72*(3), 490-496.
- Elson, R., Grace, K., Vivancos, R., Jenkins, C., Adak, G. K., O'Brien, S. J., & Lake, I. R. (2018). A spatial and temporal analysis of risk factors associated with sporadic Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 infection in England between 2009 and 2015. *Epidemiol Infect*, *146*(15), 1928-1939. <https://doi.org/10.1017/s095026881800256x>
- Englen, M. D., Hill, A. E., Dargatz, D. A., Ladely, S. R., & Fedorka-Cray, P. J. (2007). Prevalence and antimicrobial resistance of *Campylobacter* in US dairy cattle. *J Appl Microbiol*, *102*(6), 1570-1577. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.03189.x>
- Fayer, R., Santin, M., & Trout, J. M. (2007). Prevalence of *Cryptosporidium* species and genotypes in mature dairy cattle on farms in eastern United States compared with younger cattle from the same locations. *Vet Parasitol*, *145*(3-4), 260-266. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.12.009>
- Frank, C., Kapfhammer, S., Werber, D., Stark, K., & Held, L. (2008). Cattle density and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection in Germany: increased risk for most but not all serogroups. *Vector Borne Zoonotic Dis*, *8*(5), 635-643. <https://doi.org/10.1089/vbz.2007.0237>
- Fremaux, B., Delignette-Muller, M. L., Prigent-Combaret, C., Gleizal, A., & Vernozy-Rozand, C. (2007). Growth and survival of non-O157:H7 Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* in cow manure. *J Appl Microbiol*, *102*(1), 89-99. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.03059.x>

- Friesema, I. H., van de Kassteede, J., de Jager, C. M., Heuvelink, A. E., & van Pelt, W. (2011). Geographical association between livestock density and human Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 infections. *Epidemiol Infect*, *139*(7), 1081-1087. <https://doi.org/10.1017/s0950268810002050>
- Garcia-Alvarez, L., Holden, M. T., Lindsay, H., Webb, C. R., Brown, D. F., Curran, M. D., Walpole, E., Brooks, K., Pickard, D. J., Teale, C., Parkhill, J., Bentley, S. D., Edwards, G. F., Girvan, E. K., Kearns, A. M., Pichon, B., Hill, R. L., Larsen, A. R., Skov, R. L., . . . Holmes, M. A. (2011). Meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* with a novel mecA homologue in human and bovine populations in the UK and Denmark: a descriptive study. *Lancet Infect Dis*, *11*(8), 595-603. [https://doi.org/10.1016/s1473-3099\(11\)70126-8](https://doi.org/10.1016/s1473-3099(11)70126-8)
- GD. (2021). *Veekijker Nieuws Rundvee, 2021-4* (Veekijkernieuws, Issue). <https://www.gddiergezondheid.nl/Diergezondheid/Monitoring/Hoofdpunten-Monitoring-Rundvee>
- Ghosh, R., Uppal, B., Aggarwal, P., Chakravarti, A., Jha, A. K., & Dubey, A. P. (2014). A comparative study of conventional and molecular techniques in diagnosis of campylobacter gastroenteritis in children. *Ann Clin Lab Sci*, *44*(1), 42-48. <http://www.anclinlabsci.org/content/44/1/42.full.pdf>
- Goerge, T., Lorenz, M. B., van Alen, S., Hubner, N. O., Becker, K., & Kock, R. (2017). MRSA colonization and infection among persons with occupational livestock exposure in Europe: Prevalence, preventive options and evidence. *Vet Microbiol*, *200*, 6-12. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.10.027>
- Gonggrijp, M. A., Santman-Berends, I., Heuvelink, A. E., Buter, G. J., van Schaik, G., Hage, J. J., & Lam, T. (2016). Prevalence and risk factors for extended-spectrum beta-lactamase- and AmpC-producing *Escherichia coli* in dairy farms. *J Dairy Sci*, *99*(11), 9001-9013. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11134>
- Gorvitovskaia, A., Holmes, S. P., & Huse, S. M. (2016). Interpreting Prevotella and Bacteroides as biomarkers of diet and lifestyle. *Microbiome*, *4*, 15-15. <https://doi.org/10.1186/s40168-016-0160-7>
- Graveland, H., Wagenaar, J. A., Heesterbeek, H., Mevius, D., van Duijkeren, E., & Heederik, D. (2010). Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* ST398 in Veal Calf Farming: Human MRSA Carriage Related with Animal Antimicrobial Usage and Farm Hygiene. *PLoS ONE*, *5*(6), e10990. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010990>
- Grześkowiak, Ł., Martínez-Vallespín, B., Dadi, T. H., Radloff, J., Amasheh, S., Heinsen, F.-A., Franke, A., Reinert, K., Vahjen, W., Zentek, J., & Pieper, R. (2018). Formula Feeding Predisposes Neonatal Piglets to *Clostridium difficile* Gut Infection. *J Infect Dis*, *217*(9), 1442-1452. <https://doi.org/10.1093/infdis/jix567>
- Grześkowiak, Ł., Pieper, R., Kröger, S., Martínez-Vallespín, B., Hauser, A. E., Niesner, R., Vahjen, W., & Zentek, J. (2020). Porcine Colostrum Protects the IPEC-J2 Cells and Piglet Colon Epithelium against *Clostridioides* (syn. *Clostridium*) *difficile* Toxin-Induced Effects. *Microorganisms*, *8*(1), 142. <https://www.mdpi.com/2076-2607/8/1/142>

- Gupta, V. K., Paul, S., & Dutta, C. (2017). Geography, Ethnicity or Subsistence-Specific Variations in Human Microbiome Composition and Diversity. *Front Microbiol*, *8*, 1162-1162. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01162>
- Hafner, L., Pichon, M., Burucoa, C., Nusser, S. H. A., Moura, A., Garcia-Garcera, M., & Lecuit, M. (2021). *Listeria monocytogenes* faecal carriage is common and depends on the gut microbiota. *Nat Commun*, *12*(1), 6826. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-27069-y>
- Hamnes, I. S., Gjerde, B., & Robertson, L. (2006). Prevalence of *Giardia* and *Cryptosporidium* in dairy calves in three areas of Norway. *Vet Parasitol*, *140*(3-4), 204-216. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.03.024>
- Hansen, J. E., Ronco, T., Stegger, M., Sieber, R. N., Fertner, M. E., Martin, H. L., Farre, M., Toft, N., Larsen, A. R., & Pedersen, K. (2019). LA-MRSA CC398 in Dairy Cattle and Veal Calf Farms Indicates Spillover From Pig Production [Original Research]. *Front Microbiol*, *10*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02733>
- Hasrat, R., Kool, J., de Steenhuijsen Piters, W. A. A., Chu, M., Kuiling, S., Groot, J. A., van Logchem, E. M., Fuentes, S., Franz, E., Bogaert, D., & Bosch, T. (2021). Benchmarking laboratory processes to characterise low-biomass respiratory microbiota. *Sci Rep*, *11*(1), 17148. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-96556-5>
- Hensgens, M. P. M., Keessen, E. C., Squire, M. M., Riley, T. V., Koene, M. G. J., De Boer, E., Lipman, L. J. A., & Kuijper, E. J. (2012). *Clostridium difficile* infection in the community: A zoonotic disease? [Review]. *Clinical Microbiology and Infection*, *18*(7), 635-645. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2012.03853.x>
- Heuvelink, A. E., Gonggrijp, M. A., Buter, R. G. J., Ter Bogt-Kappert, C. C., van Schaik, G., Velthuis, A. G. J., & Lam, T. (2019). Prevalence of extended-spectrum and AmpC beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in Dutch dairy herds. *Vet Microbiol*, *232*, 58-64. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2019.04.005>
- Hordijk, J., Fischer, E. A. J., van Werven, T., Sietsma, S., Van Gompel, L., Timmerman, A. J., Spaninks, M. P., Heederik, D. J. J., Nielen, M., Wagenaar, J. A., & Stegeman, A. (2019). Dynamics of faecal shedding of ESBL- or AmpC-producing *Escherichia coli* on dairy farms. *J Antimicrob Chemother*, *74*(6), 1531-1538. <https://doi.org/10.1093/jac/dkz035>
- Hotchkiss, E., Thomson, S., Wells, B., Innes, E., & Katzer, F. (2015). Update on the role of cryptosporidiosis in calf diarrhoea. *Livestock*, *20*, 316-322. <https://doi.org/10.12968/live.2015.20.6.316>
- Hurtado, A., Ocejo, M., & Oporto, B. (2017). *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* shedding in domestic ruminants and characterization of potentially pathogenic strains. *Vet Microbiol*, *210*, 71-76. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2017.09.003>
- Hutchison, M. L., Walters, L. D., Moore, T., Thomas, D. J., & Avery, S. M. (2005). Fate of pathogens present in livestock wastes spread onto fescue plots. *Appl Environ Microbiol*, *71*(2), 691-696. <https://doi.org/10.1128/aem.71.2.691-696.2005>

- Idland, L., Granquist, E. G., Aspholm, M., & Lindbäck, T. (2022). The prevalence of *Campylobacter* spp., *Listeria monocytogenes* and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in Norwegian dairy cattle farms: A comparison between free stall and tie stall housing systems. *J Appl Microbiol*, 132(5), 3959-3972. <https://doi.org/10.1111/jam.15512>
- Jensen, A. N., Andersen, M. T., Dalsgaard, A., Baggesen, D. L., & Nielsen, E. M. (2005). Development of real-time PCR and hybridization methods for detection and identification of thermophilic *Campylobacter* spp. in pig faecal samples. *J Appl Microbiol*, 99(2), 292-300. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02616.x>
- Juhász-Kaszanyitzky, É., János, S., Somogyi, P., Dán, Á., van Bloois, L. v., van Duikeren, E., & Wagenaar, J. A. (2007). MRSA Transmission between Cows and Humans. *Emerging Infectious Disease journal*, 13(4), 630. <https://doi.org/10.3201/eid1304.060833>
- Kaarme, J., Hickman, R. A., Neveus, T., Blomberg, J., & Ohrmalm, C. (2016). Reassuringly low carriage of enteropathogens among healthy Swedish children in day care centres. *Public Health*, 140, 221-227. <https://doi.org/10.1016/j.puhe.2016.05.011>
- Kassenborg, H. D., Hedberg, C. W., Hoekstra, M., Evans, M. C., Chin, A. E., Marcus, R., Vugia, D. J., Smith, K., Ahuja, S. D., Slutsker, L., & Griffin, P. M. (2004). Farm visits and undercooked hamburgers as major risk factors for sporadic *Escherichia coli* O157:H7 infection: data from a case-control study in 5 FoodNet sites. *Clin Infect Dis*, 38 Suppl 3, S271-278. <https://doi.org/10.1086/381596>
- Keessen, E. C., Gaastra, W., & Lipman, L. J. (2011). *Clostridium difficile* infection in humans and animals, differences and similarities. *Vet Microbiol*, 153(3-4), 205-217. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.03.020>
- Keessen, E. C., Harmanus, C., Dohmen, W., Kuijper, E. J., & Lipman, L. J. (2013). *Clostridium difficile* infection associated with pig farms. *Emerg Infect Dis*, 19(6), 1032-1034. <https://doi.org/10.3201/eid1906.121645>
- Kenyon, J., Inns, T., Aird, H., Swift, C., Astbury, J., Forester, E., & Decraene, V. (2020). *Campylobacter* outbreak associated with raw drinking milk, North West England, 2016. *Epidemiol Infect*, 148, e13. <https://doi.org/10.1017/s0950268820000096>
- Knetsch, C. W., Connor, T. R., Mutreja, A., van Dorp, S. M., Sanders, I. M., Browne, H. P., Harris, D., Lipman, L., Keessen, E. C., Corver, J., Kuijper, E. J., & Lawley, T. D. (2014). Whole genome sequencing reveals potential spread of *Clostridium difficile* between humans and farm animals in the Netherlands, 2002 to 2011 [Article]. *Euro surveillance*, 19(45), 20954. <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-84928695108&partnerID=40&md5=dc07571aed482cc84d339e839bd778b6>

- Koene, M. G. J., Mevius, D., Wagenaar, J. A., Harmanus, C., Hensgens, M. P. M., Meetsma, A. M., Putirulan, F. F., van Bergen, M. A. P., & Kuijper, E. J. (2012). *Clostridium difficile* in Dutch animals: Their presence, characteristics and similarities with human isolates [Article]. *Clinical Microbiology and Infection*, 18(8), 778-784. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03651.x>
- Kriss, M., Hazleton, K. Z., Nusbacher, N. M., Martin, C. G., & Lozupone, C. A. (2018). Low diversity gut microbiota dysbiosis: drivers, functional implications and recovery. *Curr Opin Microbiol*, 44, 34-40. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2018.07.003>
- Larsen, J., Stegger, M., Andersen, P. S., Petersen, A., Larsen, A. R., Westh, H., Agerso, Y., Fetsch, A., Kraushaar, B., Kasbohrer, A., Febtaler, A. T., Schwarz, S., Cuny, C., Witte, W., Butaye, P., Denis, O., Haenni, M., Madec, J. Y., Jouy, E., . . . Skov, R. L. (2016). Evidence for Human Adaptation and Foodborne Transmission of Livestock-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin Infect Dis*, 63(10), 1349-1352. <https://doi.org/10.1093/cid/ciw532>
- Leclercq, A., Kooh, P., Augustin, J.-C., Guillier, L., Thébault, A., Cadavez, V., Gonzales-Barron, U., & Sanaa, M. (2021). Risk factors for sporadic listeriosis: A systematic review and meta-analysis. *Microbial Risk Analysis*, 17, 100128. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.mran.2020.100128>
- Lekkerkerk, W. S., van Wamel, W. J., Sniijders, S. V., Willems, R. J., van Duijkeren, E., Broens, E. M., Wagenaar, J. A., Lindsay, J. A., & Vos, M. C. (2015). What Is the Origin of Livestock-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Clonal Complex 398 Isolates from Humans without Livestock Contact? An Epidemiological and Genetic Analysis. *J Clin Microbiol*, 53(6), 1836-1841. <https://doi.org/10.1128/jcm.02702-14>
- Levesque, S., Fournier, E., Carrier, N., Frost, E., Arbeit, R. D., & Michaud, S. (2013). Campylobacteriosis in urban versus rural areas: a case-case study integrated with molecular typing to validate risk factors and to attribute sources of infection. *PLoS ONE*, 8(12), e83731. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0083731>
- Lim, S. C., Knight, D. R., & Riley, T. V. (2020). *Clostridium difficile* and One Health. *Clinical Microbiology and Infection*, 26(7), 857-863. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cmi.2019.10.023>
- Lindgren, A. K., Gustafsson, E., Petersson, A. C., & Melander, E. (2016). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with mecC: a description of 45 human cases in southern Sweden. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 35(6), 971-975. <https://doi.org/10.1007/s10096-016-2624-x>
- Liu, Y., Han, C., Chen, Z., Guo, D., & Ye, X. (2019). Relationship between livestock exposure and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carriage in humans: A systematic review and dose-response meta-analysis. *Int J Antimicrob Agents*. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2019.09.014>
- Mao, S., Zhang, M., Liu, J., & Zhu, W. (2015). Characterising the bacterial microbiota across the gastrointestinal tracts of dairy cattle: membership and potential function. *Sci Rep*, 5(1), 16116. <https://doi.org/10.1038/srep16116>

- MARAN 2022. (2022).
- Martin, J. S. H., Monaghan, T. M., & Wilcox, M. H. (2016). *Clostridium difficile* infection: Epidemiology, diagnosis and understanding transmission [Review]. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, *13*(4), 206-216.
<https://doi.org/10.1038/nrgastro.2016.25>
- Maury, M. M., Tsai, Y.-H., Charlier, C., Touchon, M., Chenal-Francisque, V., Leclercq, A., Criscuolo, A., Gaultier, C., Roussel, S., Brisabois, A., Disson, O., Rocha, E. P. C., Brisse, S., & Lecuit, M. (2016). Uncovering *Listeria monocytogenes* hypervirulence by harnessing its biodiversity. *Nature genetics*, *48*(3), 308-313.
<https://doi.org/10.1038/ng.3501>
- McMurdie, P. J., & Holmes, S. (2013). phyloseq: an R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. *PLoS ONE*, *8*(4), e61217.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061217>
- McPherson, M., Lalor, K., Combs, B., Raupach, J., Stafford, R., & Kirk, M. D. (2009). Serogroup-specific risk factors for Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection in Australia. *Clin Infect Dis*, *49*(2), 249-256. <https://doi.org/10.1086/599370>
- Meijs, A. P., Hengeveld, P. D., Dierikx, C. M., Maassen, C. B. M., de Greeff, S. C., de Haan, A., Bosch, T., & van Duijkeren, E. (2020). Prolonged carriage of (livestock-associated) MRSA in individuals without professional livestock contact. *J Antimicrob Chemother*.
<https://doi.org/10.1093/jac/dkaa045>
- Mevius, D., Heederik, D. J., Duijkeren, E., Veldman, K. T., van Essen, A., Kant, A., & Liakopoulos, A. (2018). *Rapport ESBL-Attributieanalyse (ESBLAT): Op zoek naar de bronnen van antibioticaresistentie bij de mens*. (TKI-AF 12067).
<http://library.wur.nl/WebQuery/wurpubs/fulltext/441261>
- MMWR. (2013). Recurrent outbreak of *Campylobacter jejuni* infections associated with a raw milk dairy--Pennsylvania, April-May 2013. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, *62*(34), 702.
- Moor, J., Wüthrich, T., Aebi, S., Mostacci, N., Overesch, G., Oppliger, A., & Hilty, M. (2021). Influence of pig farming on human Gut Microbiota: role of airborne microbial communities. *Gut Microbes*, *13*(1), 1-13. <https://doi.org/10.1080/19490976.2021.1927634>
- Mucci, N., Chiarelli, A., Lulli, L. G., Traversini, V., Galea, R. P., & Arcangeli, G. (2022). WORKbiota: A Systematic Review about the Effects of Occupational Exposure on Microbiota and Workers' Health. *Int J Environ Res Public Health*, *19*(3).
<https://doi.org/10.3390/ijerph19031043>
- Mughini-Gras, L., Benincà, E., McDonald, S. A., de Jong, A., Chardon, J., Evers, E., & Bonačić Marinović, A. A. (2022). A statistical modelling approach for source attribution meta-analysis of sporadic infection with foodborne pathogens. *Zoonoses and Public Health*. <https://doi.org/10.1111/zph.12937>

- Mughini-Gras, L., Dorado-Garcia, A., van Duijkeren, E., van den Bunt, G., Dierikx, C. M., Bonten, M. J. M., Bootsma, M. C. J., Schmitt, H., Hald, T., Evers, E. G., de Koeijer, A., van Pelt, W., Franz, E., Mevius, D. J., & Heederik, D. J. J. (2019). Attributable sources of community-acquired carriage of *Escherichia coli* containing beta-lactam antibiotic resistance genes: a population-based modelling study. *Lancet Planet Health*, 3(8), e357-e369.
[https://doi.org/10.1016/s2542-5196\(19\)30130-5](https://doi.org/10.1016/s2542-5196(19)30130-5)
- Mughini-Gras, L., Enserink, R., Friesema, I., Heck, M., van Duynhoven, Y., & van Pelt, W. (2014). Risk factors for human salmonellosis originating from pigs, cattle, broiler chickens and egg laying hens: a combined case-control and source attribution analysis. *PLoS ONE*, 9(2), e87933.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087933>
- Mughini-Gras, L., Pijnacker, R., Coipan, C., Mulder, A. C., Fernandes Veludo, A., de Rijk, S., van Hoek, A., Buij, R., Muskens, G., Koene, M., Veldman, K., Duim, B., van der Graaf-van Bloois, L., van der Weijden, C., Kuiling, S., Verbruggen, A., van der Giessen, J., Opsteegh, M., van der Voort, M., . . . Franz, E. (2021). Sources and transmission routes of campylobacteriosis: A combined analysis of genome and exposure data. *J Infect*, 82(2), 216-226. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2020.09.039>
- Mughini-Gras, L., Pijnacker, R., Duijster, J., Heck, M., Wit, B., Veldman, K., & Franz, E. (2020). Changing epidemiology of invasive non-typhoid *Salmonella* infection: a nationwide population-based registry study. *Clin Microbiol Infect*, 26(7), 941.e949-941.e914.
<https://doi.org/10.1016/j.cmi.2019.11.015>
- Mughini-Gras, L., van Pelt, W., van der Voort, M., Heck, M., Friesema, I., & Franz, E. (2017). Attribution of human infections with Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) to livestock sources and identification of source-specific risk factors, The Netherlands (2010-2014). *Zoonoses and Public Health*(65), e8-e22.
<https://doi.org/10.1111/zph.12403>
- Mughini-Gras, L., Smid, J. H., Wagenaar, J. A., de Boer, A. G., Havelaar, A. H., Friesema, I. H., French, N. P., Busani, L., & van Pelt, W. (2012). Risk factors for campylobacteriosis of chicken, ruminant, and environmental origin: a combined case-control and source attribution analysis. *PLoS ONE*, 7(8), e42599.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042599>
- Muyzer, G., de Waal, E. C., & Uitterlinden, A. G. (1993). Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol*, 59(3), 695-700. <https://doi.org/10.1128/aem.59.3.695-700.1993>
- Nic Lochlainn, L. M., Sane, J., Schimmer, B., Mooij, S., Roelfsema, J., van Pelt, W., & Kortbeek, T. (2019). Risk Factors for Sporadic Cryptosporidiosis in the Netherlands: Analysis of a 3-Year Population Based Case-Control Study Coupled With Genotyping, 2013-2016. *J Infect Dis*, 219(7), 1121-1129.
<https://doi.org/10.1093/infdis/jiy634>
- Nielsen, L. R. (2013). Review of pathogenesis and diagnostic methods of immediate relevance for epidemiology and control of *Salmonella* Dublin in cattle. *Vet Microbiol*, 162(1), 1-9.
<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.08.003>

- Nightingale, K. K., Fortes, E. D., Ho, A. J., Schukken, Y. H., Grohn, Y. T., & Wiedmann, M. (2005). Evaluation of farm management practices as risk factors for clinical listeriosis and fecal shedding of *Listeria monocytogenes* in ruminants. *J Am Vet Med Assoc*, 227(11), 1808-1814.
<https://doi.org/10.2460/javma.2005.227.1808>
- Ocejo, M., Oporto, B., & Hurtado, A. (2019). Occurrence of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in Cattle and Sheep in Northern Spain and Changes in Antimicrobial Resistance in Two Studies 10-years Apart. *Pathogens*, 8(3), 98.
<https://www.mdpi.com/2076-0817/8/3/98>
- Oporto, B., Ocejo, M., Alkorta, M., Marimón, J. M., Montes, M., & Hurtado, A. (2019). Zoonotic approach to Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: integrated analysis of virulence and antimicrobial resistance in ruminants and humans. *Epidemiol Infect*, 147, e164. <https://doi.org/10.1017/s0950268819000566>
- Opsteegh, M., Langelaar, M., Sprong, H., den Hartog, L., De Craeye, S., Bokken, G., Ajzenberg, D., Kijlstra, A., & van der Giessen, J. (2010). Direct detection and genotyping of *Toxoplasma gondii* in meat samples using magnetic capture and PCR. *Int J Food Microbiol*, 139(3), 193-201.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.02.027>
- Papić, B., Pate, M., Félix, B., & Kušar, D. (2019). Genetic diversity of *Listeria monocytogenes* strains in ruminant abortion and rhombencephalitis cases in comparison with the natural environment. *BMC Microbiol*, 19(1), 299.
<https://doi.org/10.1186/s12866-019-1676-3>
- Pinto, P., Ribeiro, C. A., Hoque, S., Hammouma, O., Leruste, H., Détriché, S., Canniere, E., Daandels, Y., Dellevoet, M., Roemen, J., Barbier Bourgeois, A., Kváč, M., Follet, J., & Tsaousis, A. D. (2021). Cross-Border Investigations on the Prevalence and Transmission Dynamics of *Cryptosporidium* Species in Dairy Cattle Farms in Western Mainland Europe. *Microorganisms*, 9(11). <https://doi.org/10.3390/microorganisms9112394>
- Redding, L., Huang, E., Ryave, J., Webb, T., Barnhart, D., Baker, L., Bender, J., Kristula, M., & Kelly, D. (2021). *Clostridioides difficile* on dairy farms and potential risk to dairy farm workers. *Anaerobe*, 69, 102353.
<https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2021.102353>
- Reist, M., Geser, N., Hachler, H., Scharrer, S., & Stephan, R. (2013). ESBL-producing Enterobacteriaceae: occurrence, risk factors for fecal carriage and strain traits in the Swiss slaughter cattle population younger than 2 years sampled at abattoir level. *PLoS ONE*, 8(8), e71725.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0071725>
- RIVM. (2019, 04-10-2019). *Vleeswaren waarschijnlijk bron 20 patiënten met Listeria*. Retrieved 12-12-2019 from <https://www.rivm.nl/nieuws/vleeswaren-waarschijnlijk-bron-20-patiënten-met-listeria>
- Rodriguez-Palacios, A., Staempfli, H. R., Duffield, T., & Weese, J. S. (2007). *Clostridium difficile* in retail ground meat, Canada. *Emerg Infect Dis*, 13(3), 485-487.
<https://doi.org/10.3201/eid1303.060988>

- Rodriguez, C., Hakimi, D. E., Vanleyssem, R., Taminiau, B., Van Broeck, J., Delmee, M., Korsak, N., & Daube, G. (2017). *Clostridium difficile* in beef cattle farms, farmers and their environment: Assessing the spread of the bacterium. *Vet Microbiol*, *210*, 183-187. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2017.09.010>
- Schouten, J. M., Bouwknecht, M., van de Giessen, A. W., Frankena, K., De Jong, M. C., & Graat, E. A. (2004). Prevalence estimation and risk factors for *Escherichia coli* O157 on Dutch dairy farms. *Prev Vet Med*, *64*(1), 49-61. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2004.03.004>
- SDa. (2022). *Benchmarking dierhouders*. Retrieved 20-06-2022 from <https://www.autoriteitdiergezondheidsmiddelen.nl/nl/benchmarken/benchmarking-dierhouders>
- Shore, A. C., Deasy, E. C., Slickers, P., Brennan, G., O'Connell, B., Monecke, S., Ehricht, R., & Coleman, D. C. (2011). Detection of staphylococcal cassette chromosome mec type XI carrying highly divergent mecA, mecI, mecR1, blaZ, and ccr genes in human clinical isolates of clonal complex 130 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*, *55*(8), 3765-3773. <https://doi.org/10.1128/aac.00187-11>
- Shukla, S. K., Ye, Z., Sandberg, S., Reyes, I., Fritsche, T. R., & Keifer, M. (2017). The nasal microbiota of dairy farmers is more complex than oral microbiota, reflects occupational exposure, and provides competition for staphylococci. *PLoS ONE*, *12*(8), e0183898. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183898>
- Silverlås, C., Emanuelson, U., de Verdier, K., & Björkman, C. (2009). Prevalence and associated management factors of *Cryptosporidium* shedding in 50 Swedish dairy herds. *Prev Vet Med*, *90*(3-4), 242-253. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2009.04.006>
- Stenkamp-Strahm, C., McConnel, C., Rao, S., Magnuson, R., Hyatt, D. R., & Linke, L. (2017). Climate, lactation, and treatment factors influence faecal shedding of *Escherichia coli* O157 pathotypes in dairy cows. *Epidemiology and Infection*, *145*(1), 115-125. <https://doi.org/10.1017/S0950268816001928>
- Sturdee, A. P., Bodley-Tickell, A. T., Archer, A., & Chalmers, R. M. (2003). Long-term study of *Cryptosporidium* prevalence on a lowland farm in the United Kingdom. *Vet Parasitol*, *116*(2), 97-113. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(03\)00261-9](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0304-4017(03)00261-9)
- Sun, J., Huang, T., Chen, C., Cao, T.-T., Cheng, K., Liao, X.-P., & Liu, Y.-H. (2017). Comparison of Fecal Microbial Composition and Antibiotic Resistance Genes from Swine, Farm Workers and the Surrounding Villagers. *Sci Rep*, *7*(1), 4965. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-04672-y>
- Tan, S. C., Chong, C. W., Yap, I. K. S., Thong, K. L., & Teh, C. S. J. (2020). Comparative assessment of faecal microbial composition and metatranscriptome of swine, farmers and human control. *Sci Rep*, *10*(1), 8997. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-65891-4>
- Team, R. C. (2013). R: A language and environment for statistical computing.

- Tenhagen, B.-A., Alt, K., Pfefferkorn, B., Wiehle, L., Käsbohrer, A., & Fetsch, A. (2018). Short communication: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in conventional and organic dairy herds in Germany. *J Dairy Sci*, *101*(4), 3380-3386.
<https://doi.org/https://doi.org/10.3168/jds.2017-12939>
- Terentjeva, M., Šteingolde, Ž., Meistere, I., Elferts, D., Avsejenko, J., Streikiša, M., Gradovska, S., Alksne, L., Ķibilds, J., & Bērziņš, A. (2021). Prevalence, Genetic Diversity and Factors Associated with Distribution of *Listeria monocytogenes* and Other *Listeria* spp. in Cattle Farms in Latvia. *Pathogens*, *10*(7).
<https://doi.org/10.3390/pathogens10070851>
- Tett, A., Pasolli, E., Masetti, G., Ercolini, D., & Segata, N. (2021). *Prevotella* diversity, niches and interactions with the human host. *Nature Reviews Microbiology*, *19*(9), 585-599.
<https://doi.org/10.1038/s41579-021-00559-y>
- Thépault, A., Poezevara, T., Quesne, S., Rose, V., Chemaly, M., & Rivoal, K. (2018). Prevalence of Thermophilic *Campylobacter* in Cattle Production at Slaughterhouse Level in France and Link Between *C. jejuni* Bovine Strains and Campylobacteriosis [Original Research]. *Front Microbiol*, *9*(471).
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00471>
- Treacy, J., Jenkins, C., Paranthaman, K., Jorgensen, F., Mueller-Doblies, D., Anjum, M., Kaindama, L., Hartman, H., Kirchner, M., Carson, T., & Kar-Purkayastha, I. (2019). Outbreak of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 linked to raw drinking milk resolved by rapid application of advanced pathogen characterisation methods, England, August to October 2017. *Eurosurveillance*, *24*(16), 1800191.
<https://doi.org/doi:https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2019.24.16.1800191>
- Trinh, P., Zaneveld, J. R., Safranek, S., & Rabinowitz, P. M. (2018). One Health Relationships Between Human, Animal, and Environmental Microbiomes: A Mini-Review [Mini Review]. *Frontiers in Public Health*, *6*. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2018.00235>
- Urdahl, A. M., Solheim, H. T., Vold, L., Hasseltvedt, V., & Wasteson, Y. (2013). Shiga toxin-encoding genes (stx genes) in human faecal samples. *APMIS*, *121*(3), 202-210.
<https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2012.02957.x>
- van den Bunt, G., van Pelt, W., Hidalgo, L., Scharringa, J., de Greeff, S. C., Schürch, A. C., Mughini-Gras, L., Bonten, M. J. M., & Fluit, A. C. (2019). Prevalence, risk factors and genetic characterisation of extended-spectrum beta-lactamase and carbapenemase-producing Enterobacteriaceae (ESBL-E and CPE): a community-based cross-sectional study, the Netherlands, 2014 to 2016. *Euro Surveill*, *24*(41). <https://doi.org/10.2807/1560-7917.Es.2019.24.41.1800594>
- van Dorp, S. M., Hensgens, M. P. M., Dekkers, O. M., Demeulemeester, A., Buiting, A., Bloembergen, P., de Greeff, S. C., & Kuijper, E. J. (2019). Spatial clustering and livestock exposure as risk factor for community-acquired *Clostridium difficile* infection. *Clin Microbiol Infect*, *25*(5), 607-612.
<https://doi.org/10.1016/j.cmi.2018.07.018>

- van Duijkeren, E., Hengeveld, P. D., Albers, M., Pluister, G., Jacobs, P., Heres, L., & van de Giessen, A. W. (2014). Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying mecA or mecC in dairy cattle. *Vet Microbiol*, *171*(3-4), 364-367.
<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.12.024>
- Van Gompel, L., Luiken, R. E. C., Hansen, R. B., Munk, P., Bouwknegt, M., Heres, L., Greve, G. D., Scherpenisse, P., Jongerius-Gortemaker, B. G. M., Tersteeg-Zijderveld, M. H. G., García-Cobos, S., Dohmen, W., Dorado-García, A., Wagenaar, J. A., Urlings, B. A. P., Aarestrup, F. M., Mevius, D. J., Heederik, D. J. J., Schmitt, H., . . . Smit, L. A. M. (2020). Description and determinants of the faecal resistome and microbiome of farmers and slaughterhouse workers: A metagenome-wide cross-sectional study. *Environment International*, *143*, 105939.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.105939>
- Vandendriessche, S., Vanderhaeghen, W., Soares, F. V., Hallin, M., Catry, B., Hermans, K., Butaye, P., Haesebrouck, F., Struelens, M. J., & Denis, O. (2013). Prevalence, risk factors and genetic diversity of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carried by humans and animals across livestock production sectors. *J Antimicrob Chemother*, *68*(7), 1510-1516.
<https://doi.org/10.1093/jac/dkt047>
- Vendrik, K. E. W., Baktash, A., Harmanus, C., Sanders, I. M. J. G., Berssenbrugge, E. K. L., Geelen, A. R., & Kuijper, E. J. (2021). *Fourteenth annual report of the National Reference Laboratory for Clostridioides difficile and results of the sentinel surveillance - May 2019-Jan 2021*.
<https://www.rivm.nl/sites/default/files/2021-11/Annual%20report%20C.%20difficile%20reference%20laboratory%20may%202019-jan%202021.pdf>
- Venegas-Vargas, C., Henderson, S., Khare, A., Mosci, R. E., Lehnert, J. D., Singh, P., Ouellette, L. M., Norby, B., Funk, J. A., Rust, S., Bartlett, P. C., Grooms, D., & Manning, S. D. (2016). Factors Associated with Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Shedding by Dairy and Beef Cattle. *Appl Environ Microbiol*, *82*(16), 5049-5056. <https://doi.org/10.1128/aem.00829-16>
- Vlaanderen, F., Cuperus, T., Keur, I., De Rosa, M., Rozendaal, H., Friesema, I., Van der Poel, W. H. M., Franz, E., & Maassen, C. B. (2020). *Staat van Zoönosen*
<https://www.rivm.nl/bibliotheek/rapporten/2020-0130.pdf>
- Wagenaar, J. A., & Van de Giessen, A. (2009). *Veegerelateerde MRSA: epidemiologie in dierlijke productieketen, transmissie naar de mens en karakterisatie van de kloon* (RIVM-rapport 330224001).
- Walland, J., Lauper, J., Frey, J., Imhof, R., Stephan, R., Seuberlich, T., & Oevermann, A. (2015). *Listeria monocytogenes* infection in ruminants: Is there a link to the environment, food and human health? A review. *Schweiz Arch Tierheilkd*, *157*(6), 319-328.
<https://doi.org/10.17236/sat00022>
- Wassenberg, M. W., Bootsma, M. C., Troelstra, A., Kluytmans, J. A., & Bonten, M. J. (2011). Transmissibility of livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (ST398) in Dutch hospitals. *Clin Microbiol Infect*, *17*(2), 316-319.
<https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2010.03260.x>

- Werner, A., Mölling, P., Fagerström, A., Dyrkell, F., Arnellos, D., Johansson, K., Sundqvist, M., & Norén, T. (2020). Whole genome sequencing of *Clostridioides difficile* PCR ribotype 046 suggests transmission between pigs and humans. *PLoS ONE*, *15*(12), e0244227. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0244227>
- Wielinga, P. R., de Vries, A., van der Goot, T. H., Mank, T., Mars, M. H., Kortbeek, L. M., & van der Giessen, J. W. (2008). Molecular epidemiology of *Cryptosporidium* in humans and cattle in The Netherlands. *Int J Parasitol*, *38*(7), 809-817. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2007.10.014>
- Withenshaw, S. M., Smith, R. P., Davies, R., Smith, A. E. O., 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. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/1541-4337.12929>
- Yanta, C. A., Bessonov, K., Robinson, G., Troell, K., & Guy, R. A. (2021). CryptoGenotyper: A new bioinformatics tool for rapid *Cryptosporidium* identification. *Food Waterborne Parasitol*, *23*, e00115. <https://doi.org/10.1016/j.fawpar.2021.e00115>
- Zomer, T., Wit, B., Graveland, H., Jongenburger, I., Tiggeoven, E., Hagen-Lenselink, R., Kuijper, E. J., Haenen, A., Hengeveld, P. D., Veenman, C., Nomen, R., Van Ruitenbeek, L., Nagel, K., & Maassen, C. B. (2014). *Surveillance zoonosen in de varkenshouderij in Nederland in 2013*.
- Zomer, T. D. R., M.; Stenvers, O.; Valkenburgh, S.; Roest, H.J.; Friesema, I.; Maas, M.; van der Giessen, J.; van Pelt, W.; Maassen, K. (2014). *Staat van Zoonosen 2013*.

Bijlage 1 *Listeria monocytogenes*: uitkomsten univariabele
logistische regressie van variabelen met $p < 0,1$

Meegenomen in multivariabele analyse

Variabele	Aantal	Prevalentie <i>L. monocytogenes</i>	p-waarde	OR	95% BI
Seizoen monstername			0,013		
Winter (dec, jan, feb)	12/180	75,0% (9/12)		Ref	
Lente (maart, april, mei)	61/180	32,8% (20/61)		0,16	0,03-0,61
Zomer (jun, jul, aug)	55/180	25,5% (14/55)		0,11	0,02-0,44
Herfst (sept, okt, nov)	52/180	34,6% (18/52)		0,18	0,04-0,67
Voeren van hooi aan melkvee			0,007		
Nee	99/180	25,3% (25/99)		Ref	
Ja	81/180	44,4% (36/81)		2,37	1,27-4,49
Akkerbouw (niet voor melkvee) als bedrijfstak			0,075		
Nee	168/180	32,1% (54/168)		Ref	
Ja	12/180	58,3% (7/12)		2,96	0,90-10,39
Droge koeien in ander gebouw dan melkvee gehuisvest			0,014		
Nee	136/180	39,0% (53/136)		Ref	
Ja	44/180	18,2% (8/44)		0,35	0,14-0,77
Gebruik stro als bodembedekking			0,019		
Nee	137/180	29,2% (40/137)		Ref	
Ja	43/180	48,8% (21/43)		2,31	1,15-4,69
Gebruik gescheiden mest als bodembedekking			0,058		
Nee	152/180	36,8% (56/152)		Ref	
Ja	28/180	17,9% (5/28)		0,37	0,12-0,96
Weidegang voor melkvee			0,039		
Nee	40/180	20,0% (8/40)		Ref	
Ja	140/180	3,9% (53/140)		2,44	1,09-6,04
Vervangingspercentage			0,019		
<25%	76/178	43,4% (33/76)		Ref	
≥25%	102/178	26,5% (27/102)		0,47	0,25-0,88
Diarree bij melkvee in afgelopen 6 maanden			0,033		
Nee	165/180	31,5% (52/165)		Ref	
Ja	15/180	60,0% (9/15)		3,26	1,12-10,17

Niet meegenomen in multivariabele analyse

Variabele	Aantal	Prevalentie <i>L. monocytogenes</i>	p-waarde	OR	95% BI
Verwerpen/dodgeboorte bij melkvee in afgelopen 6 maanden			0,081		
Nee	114/180	38,6% (44/114)		Ref	
Ja	66/180	25,8% (17/66)		0,55	0,28-1,06

Variabele	Aantal	Prevalentie <i>L. monocytogenes</i>	p-waarde	OR	95% BI
Quarantaine van dieren aangevoerd uit het buitenland			0,101		
Ja, apart gebouw	9/139	55,6% (5/9)		Ref	
Ja, apart hok	51/139	37,3% (19/51)		0,48	0,11-2,00
Nee	79/139	25,3% (20/79)		0,27	0,06-1,12
Nieuw aangevoerde dieren getest op paratuberculose			0,089		
Nee	21/43	28,6% (6/21)		Ref	
Ja	22/43	54,5% (12/22)		3,00	0,87-11,22
Contact van melkvee met kippen in de stal			0,065		
Nee	166/180	31,9% (53/166)		Ref	
Ja	14/180	57,1% (8/14)		2,84	0,94-9,03
Contact van melkvee met katten in de stal			0,081		
Nee	66/180	25,8% (17/66)		Ref	
Ja	114/180	38,6% (44/114)		1,81	0,94-3,60
Mestafvoer voor gebruik niet- eigen grond			0,031		
Nee	55/180	45,5% (25/55)		Ref	
Ja	125/180	28,8% (36/125)		0,49	0,25-0,94
Gebruik middelen om koeien droog te zetten			0,051		
Alleen droogzetantibiotica	24/179	16,7% (4/24)		Ref	
Alleen teatsealers	8/179	12,5% (1/8)		0,71	0,03-5,95
Combinatie van middelen	130/179	40,0% (52/130)		3,33	1,18-11,96
Geen middelen	17/179	23,5% (4/17)		1,54	0,31-7,59
Handen wassen vóór het melken			0,064		
Nee	128/180	29,7% (38/128)		Ref	
Ja	52/180	44,2% (23/52)		1,88	0,96-3,66
Handen wassen na wondverzorging			0,019		
Nee	36/180	16,7% (6/36)		Ref	
Ja	144/180	38,2% (55/144)		3,09	1,28-8,65
Gebruik handschoenen bij klauwverzorging			0,051		
Nee	68/180	25,0% (17/68)		Ref	
Ja	112/180	39,3% (44/112)		1,94	1,01-3,85
Handgereedschap delen met andere bedrijven (zonder tussendoor ontsmetten)			0,012		
Nee	133/180	28,6% (38/133)		Ref	
Ja	47/180	48,9% (23/47)		2,40	1,21-4,77
Groot gereedschap delen met andere bedrijven (zonder tussendoor ontsmetten)			0,028		
Nee	128/180	28,9% (37/128)		Ref	
Ja	52/180	46,2% (24/52)		2,11	1,08-4,12

Variabele	Aantal	Prevalentie <i>L. monocytogenes</i>	p-waarde	OR	95% BI
Groot gereedschap delen tussen bedrijfstukken (zonder tussendoor ontsmetten)			0,042		
Nee	124/180	29,0% (36/124)		Ref	
Ja	56/180	44,6% (25/56)		1,97	1,02-3,80
Geen maatregelen tegen worminfecties			0,025		
Nee	88/180	42,0% (37/88)		Ref	
Ja	92/180	26,1% (24/92)		0,49	0,26-0,91
Deelname aan GD programma Mastitis Tankmelk			0,054		
Nee	152/180	30,9% (47/152)		Ref	
Ja	28/180	50,0% (14/28)		2,23	0,98-5,10

Bijlage 2 Shiga-toxine producerende *E. coli*: uitkomsten univariabele logistische regressie van variabelen met $p < 0,1$

Meegenomen in multivariabele analyse

Variabele	Aantal	Prevalentie STEC	p-waarde	OR	95% BI
Seizoen monstername			0,051		
Winter (dec, jan, feb)	12/181	33,3% (4/12)		Ref	
Lente (maart, april, mei)	60/181	31,7% (19/60)		0,93	0,26-3,82
Zomer (jun, jul, aug)	57/181	15,8% (9/57)		0,38	0,10-1,64
Herfst (sept, okt, nov)	52/181	13,5% (7/52)		0,31	0,07-1,41
Aanvoer rundermest voor gebruik op bedrijf			0,035		
Nee	171/181	19,9% (34/171)		Ref	
Ja	10/181	50,0% (5/10)		4,03	1,07-15,26
Toepassing KI			0,060		
Nee	11/180	45,5% (5/11)		Ref	
Ja	169/180	20,1% (34/169)		0,30	0,09-1,14
Last van plaagdieren in het afgelopen jaar			0,061		
Nee	75/181	14,7% (11/75)		Ref	
Ja	106/181	26,4% (28/106)		2,09	0,99-4,68
Gebruik van penicillines bij melkvee in de afgelopen 3 maanden			0,004		
Nee	21/178	47,6% (10/21)		Ref	
Ja	157/178	18,5% (29/157)		0,25	0,10-0,65

Niet meegenomen in multivariabele analyse

Variabele	Aantal	Prevalentie STEC	p-waarde	OR	95% BI
Gebruik van sulfanomiden/trimethoprim bij melkvee in de afgelopen 3 maanden			0,056		
Nee	68/178	29,4% (20/68)		Ref	
Ja	110/178	17,3% (19/110)		0,50	0,24-1,03
Gebruik van cephalosporinen bij melkvee in de afgelopen 3 maanden			0,037		
Nee	126/178	26,2% (33/126)		Ref	
Ja	52/178	11,5% (6/52)		0,37	0,13-0,89
Aanwezig jongvee <14 dagen			<0,001		
1-4	50/178	18,0% (9/50)		Ref	
5-9	89/178	19,1% (17/89)		1,08	0,45-2,72
10 of meer	39/178	33,3% (13/39)		2,28	0,86-6,25
Bestrijding van andere plaagdieren			0,053		
Nee	71/181	14,1% (10/71)		Ref	
Ja	110/181	26,4% (29/110)		2,18	1,02-5,03

Variabele	Aantal	Prevalentie STEC	p-waarde	OR	95% BI
Handen wassen na wondverzorging			0,098		
Nee	36/181	11,1% (4/36)		Ref	
Ja	145/181	24,1% (35/145)		2,55	0,93-8,98
Gebruik van handschoenen			0,079		
Nee	15/181	40,0% (6/9)		Ref	
Ja	166/181	24,8% (33/133)		0,37	0,13-1,18
Bezoek van andere beroepsgerelateerde bezoekers			0,091		
Nee	169/181	20,1% (34/169)		Ref	
Ja	12/181	41,7% (5/12)		2,84	0,80-9,44

Bijlage 3 *Clostridioides difficile* bij jonge kalveren:
uitkomsten univariabele logistische regressie van variabelen
met $p < 0,1$

Meegenomen in multivariabele analyse

Variabele	Aantal	Prevalentie <i>C. difficile</i>	p- waarde	OR	95% BI
Seizoen monstername			0,50		
Winter (dec, jan, feb)	9/143	33,3% (3/9)		Ref	
Lente (maart, april, mei)	57/143	19,3% (11/57)		0,48	0,11-2,54
Zomer (jun, jul, aug)	31/143	16,1% (5/31)		0,38	0,07-2,28
Herfst (sept, okt, nov)	46/143	13,0% (6/46)		0,30	0,06-1,71
Aantal bemonsterde kalveren			0,32		
<2	56/143	16,1% (9/56)		Ref	
3-4	57/143	14,0% (8/57)		0,85	0,30-2,41
5 of meer	30/143	26,7% (8/30)		1,90	0,63-5,64
Jongvee in strohokken niet in vaste groep gehuisvest			0,009		
Nee	80/142	10,0% (8/80)		Ref	
Ja	62/142	27,4% (17/62)		3,40	1,39-8,94
Verplaatsing iglo of eenlingbox na ieder kalf			0,031		
Ja	48/143	8,3% (4/48)		Ref	
Nee	69/143	26,1% (18/69)		3,88	1,33-14,21
Niet van toepassing	26/143	11,5% (3/26)		1,43	0,26-7,05
Tussenkalftijd			0,058		
Continue	-	-		1,03	0,99-1,06
Eerste portie biest >2 uur na de geboorte			0,040		
Nee	88/141	12,5% (11/88)		Ref	
Ja	53/141	26,4% (14/53)		2,51	1,05-6,17
Type melk voor kalveren			0,0003		
Koemelk	68/143	7,35% (5/68)		Ref	
Kunstmelk/melkvervanger	38/143	36,8% (14/38)		7,31	2,59-24,18
Deels koemelk, deels kunstmelk	37/143	16,2% (6/37)		1,97	0,46-8,02
Frequentie schoonmaak drinkemmers kalveren			0,073		
Na elke drinkbeurt	41/142	9,76% (4/41)		Ref	
Elke dag	63/142	15,9% (10/63)		1,75	0,54-6,75
Minder vaak	38/142	28,9% (11/38)		3,77	1,15-14,78
Contact van melkvee met honden in de stal			0,042		
Nee	67/143	10,4% (7/67)		Ref	
Ja	76/143	23,7% (18/76)		2,66	1,07-7,28
Gebruik van kalk als strooisel			0,061		
Nee	121/143	14,9% (18/121)		Ref	
Ja	22/143	31,8% (7/22)		2,67	0,91-7,32

Variabele	Aantal	Prevalentie <i>C. difficile</i>	p- waarde	OR	95% BI
Aanvoer rundermest voor gebruik op bedrijf			0,040		
Nee	134/143	15,7% (21/134)		Ref	
Ja	9/143	44,4% (4/9)		4,3	1,00-17,61
Last van muizen in het afgelopen jaar			0,027		
Nee	115/143	13,9% (16/115)		Ref	
Ja	28/143	32,1% (9/28)		2,93	1,10-7,55
Geen maatregelen tegen worminfecties			0,003		
Nee	68/143	27,9% (19/68)		Ref	
Ja	75/143	8,0% (6/75)		0,22	0,08-0,57

Niet meegenomen in multivariabele analyse

Variabele	Aantal	Prevalentie <i>C. difficile</i>	p- waarde	OR	95% BI
Melkvee gehuisvest in meerdere stallen			0,0005		
Nee	128/143	13,3% (17/128)		Ref	
Ja	15/143	53,5% (8/15)		7,46	2,40-23,98
Geen ziekteverschijnselen bij melkvee in de afgelopen 6 maanden			0,090		
Nee	124/143	15,3% (19/124)		Ref	
Ja	19/143	31,6% (6/19)		2,55	0,81-7,35
Gebruik van ontwormmiddelen tegen worminfecties			0,044		
Nee	99/143	13,1% (13/99)		Ref	
Ja	44/143	27,3% (12/44)		2,48	1,02-6,04
Deelname GD programma Aanpak Worminfecties			0,008		
Nee	130/143	14,6% (19/130)		Ref	
Ja	13/143	46,2% (6/13)		5,01	1,47-16,74
Deelname GD programma <i>Salmonella</i> Onverdacht			0,054		
Nee	117/143	14,5% (17/117)		Ref	
Ja	26/143	30,8% (8/26)		2,61	0,95-6,86
Deelname GD programma Mastitis Tankmelk			0,045		
Nee	122/143	14,8% (18/122)		Ref	
Ja	21/143	33,3% (7/21)		2,89	0,98-8,01
Aantal rundveerassen op het bedrijf			0,070		
1	29/143	31,0% (9/29)		Ref	
2	74/143	16,2% (12/74)		0,43	0,16-1,19
3 of meer	40/143	10,0% (4/40)		0,25	0,06-0,86
Holstein Frisian Roodbont op het bedrijf			0,037		
Nee	33/143	30,3% (10/33)		Ref	
Ja	110/143	13,6% (15/110)		0,36	0,15-0,93

Variabele	Aantal	Prevalentie <i>C. difficile</i>	p- waarde	OR	95% BI
Contact van melkvee met schapen op de wei Nee Ja	134/143 9/143	15,7% (21/134) 44,4% (4/9)	0,04	Ref 4,30	0,10-17,61
Afwisselend melkvee en schapen op dezelfde wei Nee Ja	136/143 7/143	16,2% (22/136) 42,9% (3/7)	0,089	Ref 3,89	0,73-18,84
Mestafvoer voor gebruik niet-eigen grond Nee Ja	38/143 105/143	26,3% (10/38) 14,3% (15/105)	0,099	Ref 0,47	0,19-1,18

Bijlage 4 *Cryptosporidium parvum* bij jonge kalveren:
uitkomsten univariabele logistische regressie van variabelen
met $p < 0,1$

Meegenomen in multivariabele analyse

Variabele	Aantal	Prevalentie <i>C. parvum</i>	p- waarde	OR	95% BI
Seizoen monsternamen			0,004		
Winter (dec, jan, feb)	7/116	85,7% (6/7)		Ref	
Lente (maart, april, mei)	41/116	58,5% (24/41)		0,24	0,01-1,55
Zomer (jun, jul, aug)	31/116	61,3% (19/31)		0,26	0,01-1,82
Herfst (sept, okt, nov)	37/116	91,9% (34/37)		1,89	0,09-17,92
Aantal bemonsterde kalveren			0,033		
<2	40/116	57,5% (23/40)		Ref	
3-4	51/116	82,4% (42/51)		3,45	1,36-9,29
5 of meer	25/116	72,0% (18/25)		1,90	0,66-5,83
Verplaatsing iglo of eenlingbox na ieder kalf			<0,001		
Ja	43/116	81,4% (35/43)		Ref	
Nee	60/116	65,0% (39/60)		0,42	0,16-1,05
Niet van toepassing	13/116	69,2% (9/13)		0,51	0,13-2,27
Holstein Frisian roodbont op het bedrijf			0,0182		
Nee	31/116	54,8% (17/31)		Ref	
Ja	85/116	77,6% (66/85)		2,86	1,19-6,90
Weidegang voor melkvee			0,077		
Nee	20/116	55,0% (11/20)		Ref	
Ja	96/116	75,0% (72/96)		2,45	0,89-6,66
Ziekenboeg en afkalfstal zijn twee aparte stallen			0,113		
Nee	43/113	83,7% (36/43)		Ref	
Ja, gescheiden door hek	47/113	70,2% (33/47)		0,46	0,16-1,24
Ja, gescheiden door muur	17/113	58,8% (10/17)		0,28	0,08-0,98
Aparte gebouwen	6/113	50,0% (3/6)		0,19	0,03-1,23

Niet meegenomen in multivariabele analyse

Variabele	Aantal	Prevalentie <i>C. parvum</i>	p- waarde	OR	95% BI
Aantal rundveerassen op het bedrijf			0,066		
1	26/116	53,8% (14/26)		Ref	
2	51/116	74,5% (38/51)		2,51	0,93-6,88
3 of meer	39/116	79,5% (31/39)		3,32	1,13-10,29
Geen andere dierhouderij op het melkveebedrijf			0,079		
Nee	23/116	87,0% (20/23)		Ref	
Ja	93/116	67,7% (63/93)		0,32	0,07-1,01
Koegestuurd melken			0,057		
Nee	74/111	77,0% (57/74)		Ref	
Ja	37/111	59,5% (22/37)		0,44	0,19-1,03

Variabele	Aantal	Prevalentie <i>C. parvum</i>	p- waarde	OR	95% BI
Voeren van hooi aan melkvee Nee Ja	57/116 59/116	63,2% (36/57) 79,7% (47/59)	0,050	Ref 2,28	1,01-5,37
Gebruik van mechanische mestschuif Nee Ja	74/116 42/116	77,0% (57/74) 61,9% (26/42)	0,085	Ref 0,48	0,21-1,11
Bestrijding van knaagdieren Nee Ja	8/116 108/116	37,5% (3/8) 74,1% (80/108)	0,041	Ref 4,76	1,10-24,45
Handen wassen vóór het melken Nee Ja	81/116 35/116	65,4% (53/81) 85,7% (30/35)	0,032	Ref 3,17	1,19-10,10
Bezoek van inseminator op het bedrijf Nee Ja	72/116 44/116	77,8% (53/72) 61,4% (27/44)	0,060	Ref 0,45	0,20-1,03
Niet delen van handgereedschap met andere bedrijfstakken of bedrijven Nee Ja	69/116 47/116	78,3% (54/69) 61,7% (29/47)	0,055	Ref 0,45	0,20-1,013
Delen van handgereedschap tussen verschillende stallen (zonder tussendoor ontsmetten) Nee Ja	55/116 61/116	63,6% (35/55) 78,7% (48/61)	0,075	Ref 2,11	0,94-4,90
Delen van groot gereedschap tussen verschillende stallen (zonder tussendoor ontsmetten) Nee Ja	48/116 68/116	56,3% (27/48) 82,4% (56/68)	0,003	Ref 3,63	1,58-8,66
Melkvee plotseling dood in de afgelopen 6 maanden Nee Ja	107/116 9/116	75,7% (81/107) 22,2% (2/9)	0,004	Ref 0,09	0,013-0,41
Geen vaccinatie van runderen Nee Ja	85/116 31/116	76,5% (65/85) 58,1% (18/31)	0,055	Ref 0,43	0,18-1,03
Ondergrond van iglo of eenlingbox Beton Tegels/klinkers Anders	95/116 5/116 16/116	77,9% (74/95) 60,0% (3/5) 37,5% (6/16)	0,003	Ref 0,43 0,17	0,07-3,39 0,05-0,51
Gemiddelde droogzetperiode vaarzen <6 weken 6 weken 7 weken 8 weken of meer	8/116 66/116 30/116 12/116	75,0% (6/8) 71,2% (47/66) 83,3% (25/30) 41,7% (5/12)	0,061	Ref 0,82 1,67 0,24	0,11-3,96 0,20-10,13 0,03-1,54

RIVM

De zorg voor morgen begint vandaag