

RIVM rapport 149106 005

**Karakterisering van de zuurgevoeligheid van
Salmonella typhimurium faagtype DT104**

R. de Jonge, F.M. van Leusden, J.B. Dufrenne,
W.S. Ritmeester, E.H.M. Delfgou-van Asch en W.
van Pelt

maart 1999

Dit onderzoek werd verricht in opdracht en ten laste van de Inspectie Waren en Veterinaire Zaken, in het kader van project 149106, Kwantitatieve veiligheidsaspecten van pathogene kiemen in voedsel.

Abstract

In the UK, reports on human isolates of *Salmonella typhimurium* increased from 87 in 1989 to over 3600 in 1996. These isolates all showed to be resistant to at least 5 antibiotics. In the Netherlands the number of cases with acute gastro-intestinal disease caused by *S. typhimurium* DT104 increased from 10 in 1985 to 163 in 1997.

S. typhimurium DT104 is present in all types of production animals. It causes severe disease in cattle and pigs. Human infections with this foodborne type of salmonella seem to be more severe than infections with other types of *S. typhimurium*.

Following oral infection, passing the stomach, *S. typhimurium* invades epithelial cells of the small intestine. *S. typhimurium* DT104, however, does not show to be more invasive than other salmonellas. The more severe symptoms associated with an infection with *S. typhimurium* DT104 might be dose related. If *S. typhimurium* DT104 shows to be more acid resistant, the number of cells surviving the stomach is higher. The results presented in this report clearly show that some isolates of *Salmonella typhimurium* phage type DT104 are resistant to low-pH environments.

Inhoud

SAMENVATTING	4
INLEIDING	5
MATERIAAL EN METHODEN	7
STAMMEN	7
METHODEN EN MATERIALEN	8
<i>Acid Tolerance Response (ATR) in de logaritmische fase.</i>	8
<i>Acid Resistance (AR) in de stationaire fase.</i>	8
RESULTATEN	9
ACID TOLERANCE RESPONSE	9
ACID RESISTANCE (AR).	10
DISCUSSIE	13
CONCLUSIES	15
LITERATUUR	16
BIJLAGE 1 VERZENDLIJST	18

Samenvatting

Het aantal gevallen van salmonellosis in Nederland veroorzaakt door *Salmonella typhimurium* faagtype DT104 is toegenomen van 10 in 1985 tot 163 in 1997 (10% van alle gevallen van salmonellosis). De stam lijkt zijn oorsprong te hebben in het Verenigd Koninkrijk. Daar wordt inmiddels 20% van alle gevallen van salmonellosis veroorzaakt door deze stam.

S. typhimurium DT104 is multiresistent en komt voor in veel productiedieren. Het veroorzaakt ernstige ziekteverschijnselen bij koeien en varkens. Humane infecties met dit faagtype lijken ernstigere gevolgen te hebben dan infecties met non-DT104 stammen. De resultaten van een case-control studie in Engeland lieten zien dat een ongewoon hoog percentage van geïnfecteerden moest worden opgenomen in een ziekenhuis.

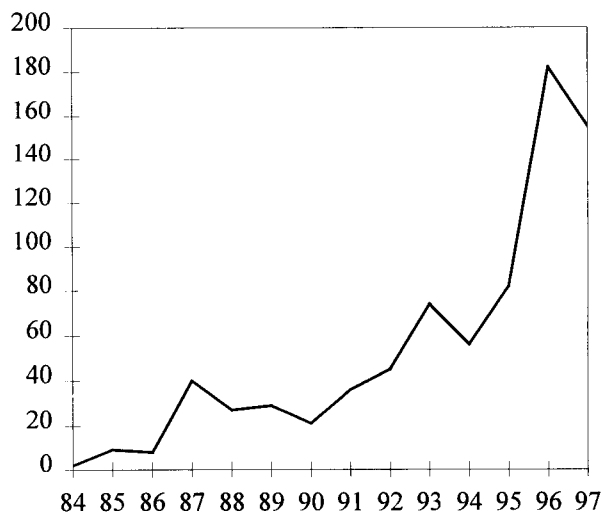
Met *S. typhimurium* DT104 besmet voedsel komt via de mond en maag terecht in de dunne darm. Hier vindt invasie plaats van epitheelcellen. Faagtype DT104 is echter niet invasiever dan andere *S. typhimurium*. De ernstigere gevolgen van een infectie met deze stam zijn mogelijk het resultaat van een verhoogde resistentie tegen het zure milieu in de maag, waardoor de dosis die uiteindelijk in de dunne darm terecht komt, hoger is, en/of zijn het resultaat van een verhoogde virulentie, als gevolg van een verblijf in de maag.

De resultaten in dit rapport laten zien dat isolaten van *S. typhimurium* DT104 ongevoeliger zijn voor milieus met een lage pH dan andere salmonella's.

1. INLEIDING

Salmonella enterica serovar Typhimurium faagtype DT104, hierna te noemen *S. typhimurium* DT104, is een multiresistent pathogeen micro-organisme dat ernstige ziekte-verschijnselen teweegbrengt. Uit een case control studie (Wall *et al*, 1994) bleken 34 van de 295 met *S. typhimurium* DT104 besmette personen te moeten worden opgenomen in het ziekenhuis, en bleek de mortaliteit 3% (normaal: 0,1-0,3%). Uit grootschaliger onderzoek (Wall *et al*, 1997) bleek de mortaliteit echter niet af te wijken van outbreaks met andere *S. typhimurium* stammen. De morbiditeit bleef op gelijk niveau: 51 van de 357 met *S. typhimurium* DT104 besmette patiënten moest worden opgenomen in een ziekenhuis.

In Nederland is het aantal salmonella-infecties bij de mens met *S. typhimurium* type DT104 sinds 1995 sterk toegenomen (zie figuur 1).



Figuur 1. Incidentie (per 1.000.000 inwoners) van *S. typhimurium* DT104 in Nederland, vanaf 1984 (Van Pelt *et al*, 1998).

In 1990 was 38,6% van de DT104 isolaten multiresistent. Dit percentage is sterk toegenomen (1995: 97,1%), terwijl ook het resistentie patroon verschuift. Aanvankelijk bestond resistentie tegen ACSSuT (ampicilline, chlooramphenicol, streptomycine, sulphonamide en tetracycline), van recentere datum zijn er isolaten die tevens resistent zijn tegen trimethoprim en/of ciprofloxacin. Er is gesuggereerd dat de resistentie tegen trimethoprim het gevolg is van het gebruik van dit antibioticum bij rundvee (Threlfall *et al*, 1996).

Infectie met *S. typhimurium* DT104 treedt op na direct contact met (zieke) landbouwhuisdieren en na consumptie van met dit organisme besmet voedsel zoals worstjes van kippen-, varkens- of rundvlees (Wall *et al*, 1994). Het percentage *S. typhimurium* DT104 infecties in Nederland bij de mens volgt de trend in toename bij varkens en koeien (Van Leeuwen *et al*, 1997).

Een ander 'new emerging' pathogeen organisme dat wordt aangetroffen bij runderen is *Escherichia coli* O157:H7. Dit organisme is zuurresistent. Het voorkomen van zuurresistente organismen bij runderen correleert sterk met het type dieet (Diez-Gonzalez *et al*, 1998). Het gebruik van krachtvoer, met als resultaat een lagere pH in het maag/darmstelsel van runderen, zou de selectie van de zuurresistente *E. coli* O157:H7 in de hand werken. Dat *S. typhimurium* DT104 in toenemende mate wordt waargenomen bij runderen (Van Leeuwen *et al*, 1997), houdt mogelijk ook verband met een verminderde mate van zuurgevoeligheid.

Bij verzuring van de omgeving, daalt de intracellulaire pH van een bacterie, hetgeen uiteindelijk gepaard gaat met denaturatie van eiwit en DNA en heeft dus sterfte tot gevolg. Voor het meten van de mate van zuurgevoeligheid zijn door diverse laboratoria verschillende methoden ontwikkeld (Bearson *et al*, 1997). De groep van Foster (voor een review, zie Foster, 1995) heeft de respons op een extreem lage pH (Acid Tolerance Response, ATR) gemeten in bacteriën uit verschillende groeifasen. Zij hebben het percentage overlevenden bepaald na een verblijf van 2 uur in minimaal medium bij pH 3,3. Regulatie van de ATR vindt plaats op verschillende niveaus (Foster, 1995; Bearson *et al*, 1997). Een verandering in de regulatie van de ATR in *S. typhimurium* DT104 zou kunnen zorgen voor een toegenomen mate van zuurtolerantie.

Gorden en Small (1993) hebben de mate van zuurresistentie (Acid Resistance, AR) gemeten van bacteriën uit de stationaire groeifase in rijk medium. De AR geeft het percentage cellen dat gedurende 2 uur overleeft bij pH 2,5. Tot de *Enterobacteriaceae* waarin AR is aangetoond behoren *Escherichia coli* en *Shigella flexneri* (Gorden and Small, 1993). In geen van de onderzochte *S. typhimurium* stammen is AR aangetoond (Gorden and Small, 1993; Lin *et al*, 1995).

Een verblijf in de maag is mogelijk van invloed op de expressie van virulentie-genen, want de pH behoort tot de omgevingsfactoren die de mate van virulentie in *S. typhimurium* beïnvloeden (Miller, 1991; Mekalanos, 1992). Een verhoogde mate van zuurresistentie, waardoor de zuurbarriere in de maag makkelijker genomen kan worden, en een verhoogde mate van virulentie bij een lage pH, zijn twee factoren die mogelijk van groot belang zijn voor de pathogeniciteit van *S. typhimurium* DT104, en dus voor de volksgezondheid. Deze studie is uitgevoerd om inzicht te krijgen in de mate van zuurgevoeligheid van *S. typhimurium* DT104.

2. MATERIAAL EN METHODEN

2.1 Stammen

De in deze studie gebruikte stammen staan weergegeven in tabel 1.

Waar geen referentie staat vermeld, betreft het door het Laboratorium voor Infectieziektendiagnostiek en Screening (LIS; W.J. van Leeuwen) van het RIVM verstrekte stammen.

Tabel 1. Overzicht van de gebruikte stammen.

organisme	stam	faagtype	oorsprong	referentie	
<i>S. typhimurium</i>	Lis1	1	humaan		
	Lis505	505	humaan		
	Lis655	655	onbekend		
	321	2	onbekend		
	328	ORS ¹	humaan		
	329	80	onbekend		
	421	130	onbekend		
	432	60	onbekend		
	456	296	humaan		
	1395	401	humaan		
	986	DT104 ²	humaan		
	1000	DT104	humaan		
	1018	DT104	humaan		
	1039	DT104	humaan		
	1050	DT104	humaan		
	7945	DT104	varken		
	7959	DT104	rund		
	7971	DT104	rund		
	7980	DT104	rund		
	8004	DT104	paard		
		UK1	2	laboratoriumstam	Curtiss <i>et al</i> , 1981
		LT2	onbekend	laboratoriumstam; $\Delta rpoS$	Foster, 1995
	<i>Shigella flexneri</i>	3136		laboratoriumstam	Gorden and Small, 1993

¹: ORS: ontypeerbaar reagerende stam

²: DT104 is Nederlands faagtype 506.

Stammen worden bewaard in 50% glycerol/BHI (Brain Heart Infusion-broth) mengsels, bij -70°C.

2.2 Methoden en materialen

2.2.1 Acid Tolerance Response (ATR) in de logaritmische fase.

Vanuit de -70°C worden de cellen ter revitalisering gedurende 17 ± 2 uur gekweekt in 10 ml BHI-broth bij 35°C in reageerbuizen zonder te schudden. Vervolgens wordt zodanig doorgeënt op ca. 75 ml minimaal medium ($1 \text{ g l}^{-1} (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $2 \text{ g l}^{-1} \text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $10,5 \text{ g l}^{-1} \text{K}_2\text{HPO}_4$, $4,5 \text{ g l}^{-1} \text{KH}_2\text{PO}_4$, 10 g l^{-1} glucose, 38 mg l^{-1} EDTA, 15 mg l^{-1} thiamine en $2,3 \text{ mg l}^{-1} \text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; pH 7,7, gebufferd met 100 mM Mops (4-Morpholine-propanesulfonic acid)) in infuusflesjes, dat de OD_{600} 0,005 bedraagt. Zodra de OD_{600} na incubatie bij 35°C een waarde heeft bereikt van 0,05 wordt de pH met 6N HCl verlaagd tot 4,3 ($t=0$). Na 1 uur wordt de pH vervolgens verder verlaagd met 6N HCl naar 3,3 ($t=1$). Op $t = 1, 3, 5$ en 7 uur wordt vervolgens het kiemgetal bepaald op Trypton Soja Agar (TSA)-platen, na verdunning in pepton fysiologische zoutoplossing (pfz). Platen worden geteld na 18 uur incubatie bij 37°C . Het kiemgetal vlak voor de pH verlaging van 4,3 naar 3,3, geldt als 100%.

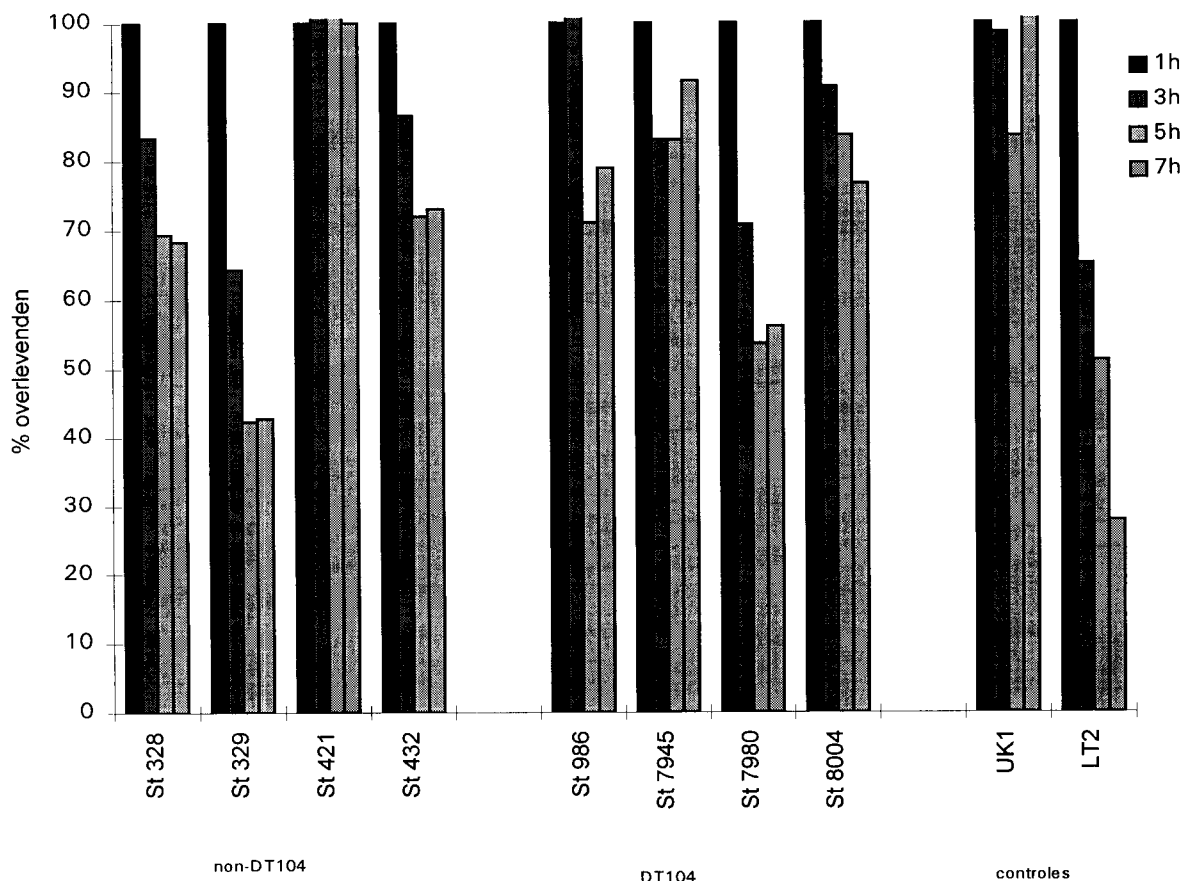
2.2.2 Acid Resistance (AR) in de stationaire fase.

Ter revitalisering worden stammen vanuit de -70°C 's morgens geënt in 10 ml BHI en zonder schudden weggezet bij 35°C . Na 6 uur worden cellen (ca. 50 μl) overgeënt op 30 ml Luria Bertani-broth, gebufferd met 2-Morpholino-ethansulphonic acid (LB-Mes) pH 5,0 ($21,3 \text{ g l}^{-1}$ Mes, 10 g l^{-1} trypton, 10 g l^{-1} NaCl; 5 g l^{-1} gist extract) in 35 ml infuusflesjes. Na 17 ± 2 uur kweken bij 35°C wordt het kiemgetal (kgt) bepaald ($t=0$; =100%) en wordt vervolgens de pH verlaagd naar 2,5 met 6N HCl en wordt hiervan 5 ml overgebracht op vers LB-Mes pH 2,5. Na 1 en 2 uur incubatie bij 35°C wordt wederom het kgt bepaald (zie ATR). Als op $t = 2$ uur nog 10% van het oorspronkelijke aantal cellen aanwezig is, wordt de stam als Acid Resistant beschouwd (Gorden and Small, 1993).

3. RESULTATEN

3.1 Acid Tolerance Response

De gevoeligheid voor een extreem lage pH van *S. typhimurium* DT104 is vergeleken met de zuurgevoeligheid van niet-DT104 stammen. Hiertoe zijn verschillende non-DT104 en DT104 stammen gekweekt op minimaal medium (MM) en in de logaritmische groeifase blootgesteld aan pH 3,3 na 1 uur adaptatie bij pH 4,3 (zie figuur 2). De test is tweemaal in duplo uitgevoerd.



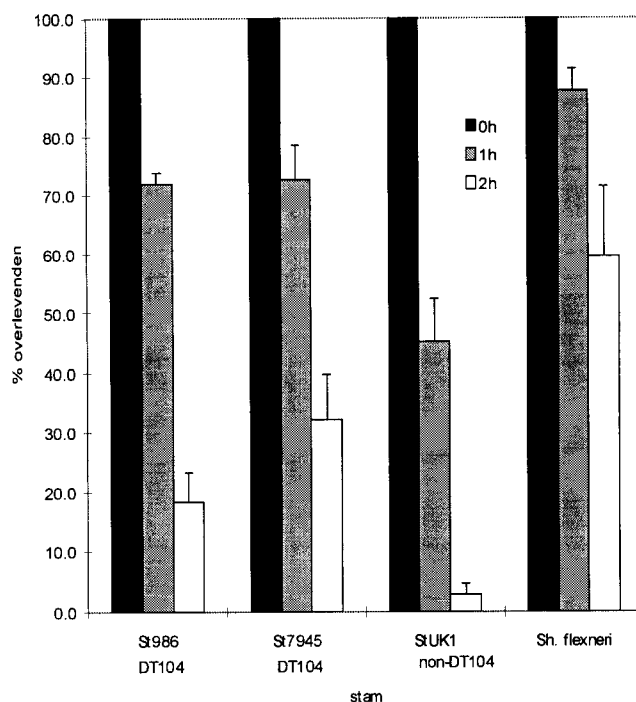
Figuur 2. De AT-respons van diverse *S. typhimurium* stammen.

Cellen zijn gekweekt op minimaal medium pH 7,7 en in de vroeg logaritmische groeifase gedurende 1 uur geadapteerd aan pH 4,3. Na 1 uur ($t=1$) is de pH verder verlaagd naar 3,3 en is het aantal overlevende cellen (% survival) op vaste tijdstippen (3, 5, en 7 uur) bepaald (zie M&M). UK1 is een positieve controle, LT2 een negatieve. Resultaten van 1 experiment zijn getoond.

Het percentage overlevende na 7 uur lag bij DT104 stammen tussen de 50 (*S. typhimurium* 7980) en 90% (*S. typhimurium* 7945); bij non-DT104 stammen varieerde het percentage overlevende tussen de 40 (*S. typhimurium* 329) en de 100% (*S. typhimurium* 421).

3.2 Acid Resistance (AR).

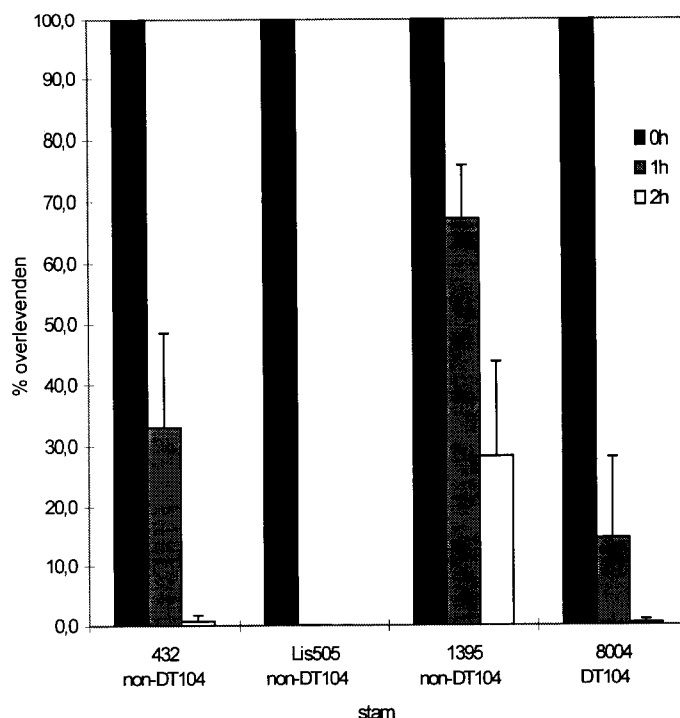
S. typhimurium DT104 was nog nooit onderworpen aan een AR-test. De resultaten zoals vermeld in figuur 3a laten zien dat de geteste DT104 isolaten 'Acid Resistant' zijn. Van het oorspronkelijk aantal kolonie vormende eenheden bleek 18 (*S. typhimurium* 986) of 32% (*S. typhimurium* 7945) in staat een periode van 2 uur bij pH 2,5 in rijk medium te overleven.



Figuur 3a. De Acid Resistance in *S. typhimurium*.

Cellen zijn gekweekt op LB-Mes pH 5,0 gedurende 18 uur. De cellen bevinden zich dan in de stationaire fase. Voor verlaging van de pH naar 2,5 is het kiemgetal bepaald ($t=0$) en dit is gesteld op 100%. Vervolgens zijn de cellen overgebracht op vers LB-Mes pH 2,5. Hierin is het aantal overlevende cellen op $t=1$ en 2 uur bepaald (zie M&M). Gebruikt zijn de DT104 isolaten 986 (St986) en 7945 (St7945). UK1 is een negatieve, *Shigella flexneri* een positieve controle. De resultaten zijn het gemiddelde van twee experimenten, elk in duplo uitgevoerd.

Vervolgens zijn nog vier, drie non-DT104 en 1 DT104, isolaten onderworpen aan een AR-test. De resultaten wezen uit dat niet alle DT104 isolaten AR waren (*S. typhimurium* 8004; minder dan 1% overlevende na 2 uur), maar ook dat er AR-positieve non-DT104 stammen bestaan: van het oorspronkelijke aantal *S. typhimurium* 1395 kiemen bleek na 2 uur nog 28% kweekbaar (zie figuur 3b). Het aantal kolonie vormende eenheden (kve) van *S. typhimurium* Lis505 (non-DT104) is na 1 uur bij pH 2,5 gedaald van 7×10^7 tot $3,3 \times 10^4$ ml^{-1} . Na 2 uur is het aantal afgenomen tot $<100/\text{ml}$. Van de non-DT104 isolaat *S. typhimurium* 432 ($t=0$: $7,3 \times 10^7$ kve) zijn na 1 uur nog $2,5 \times 10^7$ en na 2 uur $1,2 \times 10^6$ kve/ml (1,6%) aantoonbaar.



Figuur 3b. De Acid Resistance in *S. typhimurium*.

Cellen zijn gekweekt op LB-Mes pH 5,0 gedurende 18 uur. De cellen bevinden zich dan in de stationaire fase. Voor verlaging van de pH naar 2,5 is het kiemgetal bepaald ($t=0$) en dit is gesteld op 100%. Vervolgens zijn de cellen overgebracht op vers LB-Mes pH 2,5. Hierin is het aantal overlevende cellen op $t=1$ en 2 uur bepaald (zie M&M). Gebruikt zijn de DT104 isolaat 8004 (St8004) en de non-DT104 isolaten Lis505, St432 en St1395. De resultaten zijn het gemiddelde van twee experimenten, elk in duplo uitgevoerd.

Hierna zijn nog zeven andere DT104 stammen getest (*S. typhimurium* 1000, 1018, 1039, 1050, 7959, 7971 en 7980), als ook zeven non-DT104 stammen (*S. typhimurium* Lis1, Lis655, St321, 328, 421 en 456). Van deze stammen is bepaald of na 2 uur bij pH 2,5 nog minimaal 10% van het oorspronkelijke aantal over was (zie tabel 2).

Tabel 2. Resultaten van AR-metingen in verschillende *S. typhimurium*.

non-DT104			DT104	
stam	faagtype	AR	stam	AR
Lis1	1	positief	1000	negatief
Lis655	655	+/-	1018	+/-
321	2	positief	1039	negatief
328	ORS	positief	1050	negatief
329	80	negatief	7959	positief
421	130	+/-	7971	negatief
456	296	+/-	7980	negatief

De bepaling is uitgevoerd zoals beschreven in M&M. Het kiemgetal is bepaald op $t = 0$ en $t = 2$ uur. Positief: op $t = 2$ uur is het kgt minimaal 10% van het kgt $t = 0$ uur; negatief: op $t = 2$ uur is het kgt minder dan 10% van het kgt op $t = 0$ uur; +/-: het kgt op $t = 2$ uur ligt rond de 10% van het kgt op $t = 0$ uur.

De resultaten uit tabel 2 en figuur 3a en 3b laten zien dat zuurresistentie niet gekoppeld is aan faagtype DT104. Zuurresistentie komt ook voor bij non-DT104 stammen. Van de geteste DT104 isolaten zijn er 3 duidelijk zuurresistent, en 6 niet zuurresistent. Van de geteste non-DT104 stammen zijn er 4 duidelijk zuurresistent, en 3 negatief.

4. DISCUSSIE

Aanpassing van micro-organismen aan veranderende milieu's vindt, in de tijd, plaats op drie nivo's. Allereerst zal er op metabool niveau een aanpassing plaatsvinden, in geval van verzuring: secretie van protonen. Dit wordt gevolgd door aanpassingen op DNA nivo: expressie van DNA- en eiwitherstel-enzymen. Ook op nog grotere tijdschaal kunnen aanpassingen plaatsvinden. Mutaties, overdracht van DNA van de ene stam op de andere, en 'interspecies gene transfer', zijn processen die kunnen zorgen voor de aanpassing en daarmee ontwikkeling van stammen/soorten met nieuwe vormen van resistentie. Het evolutionair succes van organismen met nieuwe eigenschappen zal afhangen van de aanwezigheid van een selectie-barrière.

Uit resultaten van een recent gepubliceerd onderzoek (Diez-Gonzalez *et al*, 1998) bleek dat wanneer in het dieet van runderen hooi werd vervangen door mais (hetgeen een verschuiving van een relatief energie-arm naar een energie-rijk dieet betekent), het aantal anaerobe bacteriën en het aantal *E. coli* in het colon toenam. De vervanging van hooi door mais resulteerde eveneens in een verlaging van de pH van het colon (van 7,2 naar 5,9), zeer waarschijnlijk het gevolg van een verhoogde bacteriële activiteit. Bovendien was er een toename van de zuurresistentie van *E. coli*. Bij pH 7,2 bedroeg het percentage *E. coli* dat gedurende 1 uur bij een pH van 2 overleefde minder dan 0,05%; bij pH 5,9 was dit percentage opgelopen tot 3%. Dus, een verlaging van de pH van de darminhoud, mogelijk als gevolg van een verhoogde microbiële activiteit, lijkt gepaard te gaan met de selectie van organismen met een verhoogde zuurresistentie (Diez-Gonzalez *et al*, 1998). Zuurresistentie kan overigens ook geïnduceerd worden door 'short-chain fatty acids' (SCFA's), zoals melkzuur en acetaat, bij neutrale pH (Kwon and Rieke, 1998).

De Acid Tolerance Response, één van de in de literatuur beschreven fenomenen betrokken bij het weerstand bieden aan extreem lage pH's, van verschillende *S. typhimurium* DT104 isolaten verschilt niet van die van andere *S. typhimurium* stammen.

Volgens de literatuur is *S. typhimurium* niet zuurresistent. Het organisme zou in de stationaire fase niet in staat zijn om gedurende 2 uur te overleven op rijk medium bij pH 2,5, na voorkweek op rijk medium met pH 5,0. Maar de resultaten van deze studie laten zien dat meerdere door ons onderzochte stammen wel beschikken over een mechanisme om hieraan weerstand te bieden ofwel zuurresistent zijn. De stammen zijn o.a. geïsoleerd uit landbouwhuisdieren, of hebben een humane oorsprong.

De aanwezigheid van zuurresistente stammen in landbouwproductiedieren duidt op de aanwezigheid van een selectiedruk voor zuurresistentie in de vleesproductieketen. De gesuggereerde selectiedruk zou kunnen zijn opgelegd door het gebruik van koolhydraatrijke krachtvoerders bij runderen, analoog aan het verhaal zoals beschreven door Diez-Gonzalez *et al* (1998), maar ook het gebruik van goedkopere, aangezuurde/gefermenteerde brijvoerders, i.p.v. bijv. gedroogde voeders in de varkenssector zou een bijdrage kunnen leveren. De afwezigheid van zuurresistentie bij de uit een paard geïsoleerde *S. typhimurium* DT104 (St 8004) bevestigt deze suggestie. Het aantal geteste stammen is echter te beperkt om ondubbelzinnig een relatie te kunnen vaststellen tussen de mate van zuurresistentie en bijv. herkomst (humaan, varken, rund), maar het verdient aanbeveling na te gaan of de mate van

zuurresistentie van bijv. in faeces van varkens voorkomende stammen correleert met het gebruik van aangezuurde / gefermenteerde brijvoerders, een onderzoek dat te combineren is met het monitoringsonderzoek dat plaatsvindt in het kader van project 285859.

Daarnaast verdient het de aanbeveling om het effect van de pH en/of aanwezigheid van organische zuren op de fysiologie en op de mate van virulentie van pathogenen eerst nader te onderzoeken, alvorens over te gaan op conserveringstechnieken die gebruik maken van sublethale concentraties (organisch) zuur. Dit ter voorkoming van de (verdere) ontwikkeling van zuurresistente pathogenen die beter in staat zijn de zuurbarrière van de maag te overleven, pathogenen die mogelijk virulenter zijn, en dus van grotere invloed zijn op de volksgezondheid.

5. CONCLUSIES

De Acid Tolerance Response, één van de in de literatuur beschreven fenomenen betrokken bij het weerstand bieden in minimale milieus aan extreem lage pH's, van verschillende *S. typhimurium* DT104 isolaten verschilt niet van die van andere *S. typhimurium* stammen.

Volgens de literatuur is *Salmonella* in de stationaire fase niet in staat om gedurende 2 uur te overleven op rijk medium bij pH 2,5, na te zijn voorgekweekt op rijk medium met pH 5,0. De resultaten van deze studie laten echter zien dat meerdere door ons onderzochte stammen wel beschikken over een mechanisme om hieraan weerstand te bieden ofwel zuurresistent zijn.

Het in dit rapport beschreven onderzoek laat zien dat sommige St DT104 isolaten zuurresistent zijn, maar het zuurresistente karakter is niet strikt gebonden aan dit faagtype. Ook ander faagtypen zijn Acid Resistant. De resultaten tonen ook dat er DT104 isolaten zijn (o.a. *S. typhimurium* 8004), die niet zuurresistent zijn, m.a.w. zuurresistentie is niet gecorreleerd aan het faagtype, en binnen een faagtype kan de mate van zuurresistentie variëren.

Literatuur

Bearson, S., B. Bearson and J.W. Foster (1997). Acid stress responses in enterobacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 147: 173-180.

Curtiss, R., III, S.B. Porter, M. Munson, S.A. Tinge, J.O. Hassan, C. Gentry-Weeks and S.M. Kelly (1981). Nonrecombinant and recombinant avirulent *Salmonella* vaccines for poultry. In: (Blankenship, L.C., J.H.S. Bailey, N.A. Cox, N.J. Stern and R.J. Meinersmann, eds) *Colonization control of human bacterial enteropathogens in poultry*. Academic Press, New York.

Diez-Gonzalez, F., T.R. Callaway, M.G. Kizoulis and J.B. Russell (1998). Grain feeding and the dissemination of acid-resistant *Escherichia coli* from cattle. *Science* 218: 1666-1668.

Foster, J.W. (1995). Low pH adaptation and the acid tolerance response of *Salmonella typhimurium*. *Crit. Rev. Microbiol.* 21: 215-237.

Gorden, J. and P.L.C. Small (1993). Acid resistance in enteric bacteria. *Infect. Immun.* 61: 364-367.

Kwon, Y.M. and S.C. Ricke (1998). Induction of acid resistance of *Salmonella typhimurium* by exposure to short-chain fatty acids. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 3458-3463.

Lin, J., I.S. Lee, J. Frey, J.L. Slonczewski and J.W. Foster (1995). Comparative analysis of extreme acid survival in *Salmonella typhimurium*, *Shigella flexneri*, and *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 177: 4097-4704.

Mekalanos, J. J. (1992). Environmental signals controlling expression of virulence determinants in bacteria. *J. Bacteriol.* 174: 1-7.

Miller, S.I. (1991). PhoP/PhoQ: macrophage-specific modulators of *Salmonella* virulence? *Mol. Microbiol.* 5: 2073-2078.

Threlfall, E.J., J.A. Frost, L.R. Ward and B. Rowe (1996). Increasing spectrum of resistance in multiresistant *Salmonella typhimurium*. *Lancet* 347: 1053-1-54.

Van Leeuwen, W.J., M.E.O.C. Heck, S.E. Notermans and W. van Pelt (1997). *Salmonella typhimurium* DT104, ook in Nederland? *Infectieziekten Bulletin* 6: 122-124.

Van Pelt, W., W.J. van Leeuwen and Y.T.P.H. van Duynhoven (1998). Een opzet voor early warning van *Salmonella* infecties. *Infectieziekten Bulletin* 4: 94-97.

Wall, P.G., D. Morgan, K. Lambden, M. Ryan, M. Griffin, E.J. Threlfall, L.R. Ward and B. Rowe (1994). A case control study of infection with an epidemic strain of multi-resistant *Salmonella typhimurium* DT104 in England and Wales. CDR 4: R130-R135

Wall, P.G., D. Ross, P. van Someren, L.R. Ward, J. Threlfall and B. Rowe (1997). Features of the epidemiology of multidrug resistant *Salmonella typhimurium* DT104 in England and Wales. Proceedings 'Salmonella and Salmonellosis,' Ploufragan, France.

Bijlage 1 Verzendlijst

- A. Algemeen Hoofdinspecteur van de Inspectie Gezondheidsbescherming, Waren en Veterinaire zaken (IWV), F.Schuring
- B. Voorzitter van de Gezondheidsraad, Prof. J.J. Sixma Postbus 1236, 2280 CE Rijswijk.
- C. Hoofd Accountsectie Food, IWV, M.W.J. Wolfs
Hoofd Accountsectie Veterinair, IWV, H.Verburg
Directeur-Generaal van de Volksgezondheid, H.J.Schneider
Drs. J.T. Jansen, IWV
Ir. J. van Kooy, IWV
Dr. J.H.M.Nieuwenhuijs, IWV
Ir. E. de Boer, IWV, Regionale Dienst Oost
Dr. R. Beumer, LUW
Prof. Dr. Ir. F.M. Rombouts, LUW
Prof. Dr. F. van Knapen, UU, VVDO
- D. Depot Nederlandse Publikaties en Nederlandse Bibliografie, [Antwoordnummer 13018, 2501 VC Den Haag
- E. Directie RIVM
- F. Prof. Dr. Ir. D.Kromhout, SB2
Dr. Ir. A.M. Henken, MGB
Dr. Ir. A.W. van der Giessen, MGB
Drs. W.J. van Leeuwen, LIS
Dr. Y. van Duynhoven, CIE
- G. Auteur(s)
- H. SBD/Voorlichting & Public Relations Bureau Rapportenregistratie
- I. Bibliotheek RIVM
- J. Bureau Rapportenbeheer
- K. Bureau Rapportenregistratie
- L. Reserve exemplaren