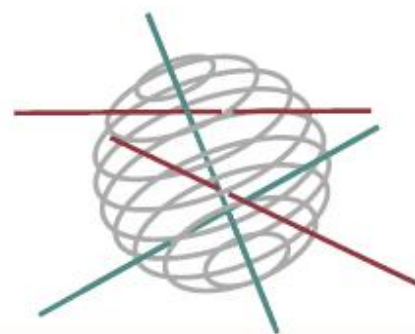


SSD

SCIENCE FOR A SUSTAINABLE DEVELOPMENT



**VALIDATIE VAN DETECTIEMETHODEN VOOR NIEUW
OPDUIKENDE ZIEKTEVERWEKKENDE
ESCHERICHIA COLI
«STECTRACK»**

L. DE ZUTTER, K. DE REU, K. VERSTRAETE, J. ROBYN, L. HERMAN,
M. HEYNDRIKX, J. DEL-FAVERO, D. PIÉRARD, G. DAUBE.



ENERGY



TRANSPORT AND MOBILITY



AGRO-FOOD



HEALTH AND ENVIRONMENT



CLIMATE



BIODIVERSITY

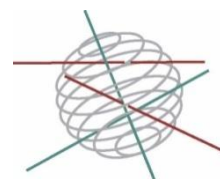


ATMOSPHERE AND TERRESTRIAL AND MARINE ECOSYSTEMS



TRANSVERSAL ACTIONS





Agro-voeding

EINDVERSLAG Samenvatting

**VALIDATIE VAN DETECTIEMETHODEN VOOR NIEUW
OPDUIKENDE ZIEKTEVERWEKKENDE
ESCHERICHIA COLI
«STECTRACK»**

SD/AF/06

Promotoren

L. DE ZUTTER,

GHENT UNIVERSITY, FACULTY OF VETERINARY MEDICINE

K. DE REU, K. VERSTRAETE, J. ROBYN, L. HERMAN, M. HEYNDRIKX,
INSTITUTE FOR AGRICULTURAL AND FISHERIES RESEARCH (ILVO),
TECHNOLOGY AND FOOD SCIENCES

J. DEL-FAVERO,

UNIVERSITY OF ANTWERP, APPLIED MOLECULAR GENOMICS GROUP,
VIB DEPARTMENT OF MOLECULAR GENETICS

D. PIÉRARD,

UNIVERSITAIR ZIEKENHUIS BRUSSEL, LAB OF MICROBIOLOGY

G. DAUBE

UNIVERSITY OF LIÈGE, FACULTY OF VETERINARY MEDICINE

Auteurs

K. VERSTRAETE, K. DE REU, J. ROBYN, L. HERMAN,
M. HEYNDRIKX, J. DEL-FAVERO, D. PIÉRARD,
G. DAUBE, L. DE ZUTTER.





Avenue Louise 231
Louizalaan 231
B-1050 Brussels
Belgium
Tel: + 32 (0)2 238 34 11 – Fax: + 32 (0)2 230 59 12
<http://www.belspo.be>

Contact person: Christine Mathieu
+ 32 (0)2 238 34 93

Neither the Belgian Science Policy nor any person acting on behalf of the Belgian Science Policy is responsible for the use which might be made of the following information. The authors are responsible for the content.

No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without indicating the reference :

K. Verstraete, K. De Reu, J. Robyn, L. Herman, M. Heyndrickx, J. Del-Favero, D. Piérard, G. Daube, L. De Zutter. **“Validation of methods for the detection of new emerging pathogenic *Escherichia coli* – STECTRACK”**. Eindverslag Samenvatting. Brussel : Federaal Wetenschapsbeleid 2009 Samenvatting –7p. (Onderzoeksprogramma Wetenschap voor een Duurzame Ontwikkeling)

Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) zijn shigatoxine producerende *E. coli* (STEC) die tot ernstige ziektes bij mensen kunnen leiden. Deze pathogenen komen in de voedselketen voor en zijn de op vier na meest voorkomende zoönose in België. Mensen zijn er erg beducht voor omdat de klinische symptomen uitermate ernstig zijn. Ze kunnen een resem ziektebeelden veroorzaken: van asymptomatisch dragerschap over verschillende vormen van diarree tot het levensbedreigende HUS (haemolytisch uraemisch syndroom). Ze komen het vaakst voor bij runderen. Mensen raken besmet door contact met uitwerpselen en door het eten van besmet voedsel of het drinken van besmet water. Heel wat serotypes kunnen infecties bij mensen veroorzaken, maar het grootste gevaar gaat uit van de serotypes O26, O103, O111, O145 en O157. De WGO omschrijft deze stammen als nieuw opduikende pathogenen. De groep van sorbitol-negatieve (s-) O157:H7-stammen worden het vaakst onderzocht omdat er een ISO-methode beschikbaar is. Voor sorbitol-positieve (s+) O157-stammen en niet-O157 STEC-stammen werd onlangs in het kader van een Belspo-project een nieuwe detectiemethode ontwikkeld (Possé et al. 2008a). Dat project had als doel om de vermelde detectie- en isolatiemethode voor STEC in verschillende matrices te verbeteren en te valideren. Eerst werd de immunomagnetische scheiding (IMS) geëvalueerd om de STEC-isolatiemethode voor runderfeces te optimaliseren (UGent). Vervolgens werd een moleculaire bepaling van de STEC-stammen uitgevoerd. Hiervoor werden als alternatieve tools een nieuw ontwikkeld 33-mPCR (Universiteit Antwerpen, VIB) en de pulsed field gel elektroforese techniek (PFGE) (Instituut voor landbouw- en visserijonderzoek, ILVO) toegepast. Er werd nog een beperkter afgeleid multiplex PCR (9-mPCR) ontwikkeld (VIB) en geoptimaliseerd om stalen te screenen (ILVO). De derde doelstelling was de evaluatie van de verschillende methodes voor het isoleren van STEC in menselijke fecesstalen (Universitair Ziekenhuis Brussel, UZ). Tot slot werd de STEC-detectie- en isolatiemethode gevalideerd via een interne studie en een interlaboratoriumstudie op basis van de ISO 16140-richtlijn voor de validatie van alternatieve methodes (Université de Liège, Ugent, ILVO). Om het STEC-isolatieprotocol voor runderfeces en de evaluatie van de impact van IMS te optimaliseren, werden fecesstalen van runderen kunstmatig besmet met verschillende hoeveelheden STEC (10-100 en 100-1000 cfu/25 g feces). Vervolgens werden ze na een aanrijksperiode van 6 of 24 uur geïsoleerd en op selectieve agarplaatjes geplaatst nadat ze al dan niet immunomagnetisch waren gescheiden. Er werden twee soorten IMS-beads (dynabeads en captive beads) getest. Uit de resultaten bleek dat IMS (ongeacht het type beads) een heel positief effect had op de isolatie van de serotypes O157 (s- en s+). Bij niet-O157 serotypes was het effect heel klein of zelfs negatief. Dit werd grotendeels bevestigd door de resultaten met 'pure broth' suspensies van STEC, waarbij hoge percentages werden aangetroffen op de IMS-beads in suspensies met serotypes O157 (s- en s+), O26 en O103 en lage

percentages met O111 en O145. Niet-O157 STEC waren vaak al doeltreffend van de feces geïsoleerd door alleen gebruik te maken van de plaatjestechniek. Dit was echter niet het geval voor O157 (s- en s+) STEC. Wat de aanrijkingstijd betreft, leverde 24 uur betere isolatieresultaten op dan 6 uur. Voor de serotypes O157 (s- en s+), O26 en O103 werden betrouwbare detectieresultaten geboekt bij 10-100 cfu/25 g, terwijl bij de serotypes O111 en O145 alleen hoeveelheden van 100-1000 cfu/25 g betrouwbare detectieresultaten opleverden. Om de tweede taak van het project tot een goed einde te brengen, ontwikkelde de Applied Molecular Genomics Group van het VIB Department of Molecular Genetics (UA-VIB) een gepatenteerde 33-amplicon multiplex PCR-test (mPCR) in combinatie met capillaire elektroforese.

Deze mPCR-test omvat de detectie van 5 STEC-serotypes (O26, O103, O111, O145 en O157), de belangrijkste virulentiegenen *VT1* met varianten (*VT1ab*, *VT1c* en *VT1d*), *VT2* met zes varianten (*VT2b,c,d,e,f,g*) en consensus, *eae* met vijf varianten (*eae α 1*, *eae β 1*, *eae γ 1*; *eae γ 2*; *eae ϵ* en *eae ζ*), *ehx*, *tir*, *katP*, *saa*, *espP* en *FliC* H2, H7, H8, H11 en H28. De test werd geoptimaliseerd en gevalideerd met een reeks teststammen die representatief waren voor de prioritaire amplicons. Deze moleculaire techniek werd vervolgens gevalideerd met een verzameling van 334 humane klinische stammen en dierlijke stammen van het Belgische STEC-referentiecentrum (UZ). Deze verzameling menselijke en dierlijke stammen werd ook bepaald door het PulseNet Europe-protocol voor pulsed field gel elektroforese (PFGE) toe te passen. Deze techniek maakt een vingerafdruk van een stam via een restrictie-enzym dat DNA knipt, en door gel elektroforese. Onderzoek van de bandenpatronen laat toe om gelijkaardige of verwante stammen te clusteren. Vervolgens werden de resultaten van 33-mPCR en PFGE-genotypering gecombineerd om eventuele correlaties tussen PFGE-genotypes en virulentiepatronen aan het licht te brengen. Bij de analyse werd ook gebruik gemaakt van achtergrondinformatie over de stammen (isolatiedatum, humane of dierlijke oorsprong, klinische manifestatie, informatie over de uitbraak). Door mPCR en PFGE-genotyperingsresultaten te combineren, werden correlaties aangetoond. In een eerste fase werden STEC-stammen ingedeeld volgens serotype. Vervolgens vond een correlatie plaats tussen het virulentieprofiel en de PFGE-clusters voor *VT*-genen en andere genen. Vooral STEC O157-stammen hadden heel uiteenlopende *VT*-profielen. Stammen met hetzelfde *VT*-profiel werden in één cluster ondergebracht. Wat de klinische manifestatie betreft, waren er meer asymptome gevallen voor niet-O157 dan voor O157 STEC, maar verder bleek er geen correlatie te zijn tussen de PFGE-clusters en de klinische manifestatie, of tussen het *VT*-profiel en de klinische manifestatie. Op basis van de PFGE-dendogrammen konden tot slot verschillende casusstudies worden vastgelegd. Doorgaans bevatten de casussen klonen die verschillende jaren standhielden, die vergelijkbare virulentieprofielen hadden en die zowel mensen als dieren besmetten. Als

onderdeel van de tweede taak ontwikkelde de UA-VIB nog een afgeleide 9-amplicon multiplex PCR (9-mPCR) om stalen snel te screenen. Met deze 9-mPCR worden in één stap een combinatie van serotypes (O26, O103, O111, O145, O157) en virulentiegenen (*VT1*, *VT2*, *eae* en *ehx*) gedetecteerd die met conventionele gel elektroforese kunnen worden gevisualiseerd. Zodra de 9-mPCR was ontwikkeld en op zuivere stammen was getest, werd een evaluatie op stalen uitgevoerd. Het ILVO (Instituut voor landbouw- en visserijonderzoek) testte hiervoor verschillende methodes om DNA uit kunstmatig besmette stalen te halen. De methodes werden vergeleken op hun vermogen om moleculen te verwijderen die PCR-reacties tegengaan en op hun vermogen om DNA uit STEC-cellen te isoleren en te zuiveren. Van de vier geteste methodes waren er slechts twee geschikt om stalen te prepareren zonder staaldeeltjes te verwijderen. De methode die gebruik maakt van celdisruptie door bead-beating (grondig schudden met beads) zoals beschreven door Yu en Morrison (2004), was minstens 10 keer gevoeliger dan de methode die de Qiagen Stool Mini Kit gebruikte volgens de aanwijzingen van de fabrikant, en kreeg dan ook de voorkeur. De methode op basis van celdisruptie door bead-beating neemt echter veel meer tijd in beslag dan de Qiagen-methode en vereist het gebruik van een ribolyser. Omdat het ILVO de methode met de ribolyser in alle volgende experimenten gebruikte, werd deze methode toegepast op stalen die kunstmatig waren besmet om de detectielimieten te achterhalen. De test kon alle virulentiemerkerogenen en het serotypegen van stam MB3901 (serotype O157) detecteren in aangerijkt gehakt en rauwmelkse kaas die kunstmatig waren besmet met 2 cfu/25 g staal. Op runderfecesstalen was de screeningstest 10 keer minder gevoelig: hij kon 21 cfu/25 g feces detecteren. Tot slot werd de invloed van de hoeveelheid gebruikt lysaat in de mPCR-reactiemix onderzocht. Er werd een mPCR-reactie met 1 en 2 µl DNA-lysaat uitgevoerd, maar er was geen verschil in detectie merkbaar. Tests met verschillende klinische isolaten van niet-O157 STEC op de nieuw ontwikkelde selectieve agarplaatjes toonden aan dat de groeikenmerken doorgaans de verwachtingen benaderden.

Bij de preparatie van het medium is echter meer standaardisatie nodig om reproduceerbare resultaten te bekomen. Sommige O103-isolaten groeiden niet op de media die in het UZ waren geprepareerd, en het was vaak moeilijk om een onderscheid te maken tussen de kleur van O111- en O26-kolonies. Bij het gebruik van kunstmatig besmette fecesstalen was de gevoeligheid van het STEC-isolatieprotocol dat in een eerdere SPSD II-project van Belspo was ontwikkeld, vergelijkbaar met de gevoeligheid van het protocol dat het UZ gewoonlijk gebruikt (103 en 104 cfu/5 g). De gevoeligheid lag ongeveer 10 keer hoger bij IMS-gebruik. De methode leverde goede resultaten op met bevroren positieve STEC-stalen, maar kon slechts op 14 stalen worden getest: 11 met O157, 2 met O111 en 1 met O26. Het STEC-isolatieprotocol werd intern gevalideerd om na te gaan of het protocol op verschillende soorten voedselmatrices kon worden toegepast. Alle stalen die voor de validatie werden

gebruikt, waren kunstmatig besmet. Tien stalen van gehakt, rauwmelkse kaas en zaadscheuten werden kunstmatig besmet met verschillende hoeveelheden (10-2000 cfu/25 g) niet-gestresseerde en gestresseerde stammen van de serotypes O157 (s-) en (s+), O26, O103, O111 en O145. Gekweekte STEC-stammen werden bij lage en vriestemperaturen gestresseerd door ze minstens 5 dagen bij respectievelijk 2 en -18 °C te bewaren. Besmette stalen werden vooraf gedurende 6 uur in een zwak selectief medium aangerijkt en vervolgens gedurende 18 uur verder aangerijkt in een sterker selectief medium. Na elke aanrijningsfase werden ze onmiddellijk op selectieve plaatjes geplaatst. Als derde variant werd na 24 uur aanrijking en voor het aanbrengen op plaatjes een IMS (dynabeads of captive beads) uitgevoerd. Dubieuze kolonies op het selectieve medium werden gezuiverd en proefondervindelijk bevestigd op een zuiveringsmedium, gevolgd door een bevestiging met een serotype PCR. Naast de klassieke isolatiemethode werd het aanrijksmedium (na 24 uur aanrijking) aan de 9-mPCR-screeningstest onderworpen. Uit de resultaten blijkt dat zowel het isolatieprotocol als de mPCR-screening niet-gestresseerde en door koude gestresseerde O26, O103, O157 (s+) en O145 goed detecteren in rauwmelkse kaas en gehakt. De detectie van andere niet-gestresseerde en door koude gestresseerde serotypes (O111 en O157 (s+)) in rauwmelkse kaas en gehakt en van alle door vrieskou gestresseerde serotypes in gehakt was beperkt of nagenoeg nul. De detectie van om het even welk serotype in zaadscheuten was vrijwel onmogelijk, zelfs bij hoge besmettingsaantallen van 2000 cfu/25 g. Dit is wellicht te wijten aan de grote hoeveelheid achtergrondflora. Tot slot werden de geoptimaliseerde STEC-detectie- en -isolatiemethodes gevalideerd in een interlaboratoriumstudie of ringonderzoek waaraan in totaal 12 binnen- en buitenlandse laboratoria deelnamen. Voorafgaand werd eerst een experiment doorgevoerd om de deelnemende laboratoria vertrouwd te maken met de isolatiemethode. Vervolgens vond het eigenlijke ringonderzoek plaats. De nodige producten om de kweekmedia te prepareren (in-house-prepared: IHP), en gebruiksklare selectieve agarplaatjes (ready-to-use: RTU) werden naar de deelnemende laboratoria verstuurd, samen met een vragenlijst en een formulier om verslag uit te brengen van de resultaten. Voor elk deelnemend laboratorium werden 20 stalen van 25 g gehakt geprepareerd: 1 staal om de temperatuur bij ontvangst van de stalen te meten, 1 voor de integrale telling, Enterobacteriaceae en *E. coli*, 2 blanco stalen en 16 stalen besmet met enkele stammen van 4 serotypes met telkens 2 exemplaren in 2 verschillende besmettingsgraden (30 cfu/g en 300 cfu/g). Alle stammen waren door koude gestresseerd. De stalen werden op de verzendingsdag zelf geprepareerd en moesten op een vooraf vastgelegde datum worden geanalyseerd. De Universiteit de Liège evalueerde alle resultaten op basis van de aanbevelingen van ISO 16140. Uit de resultaten bleek er geen verschil te bestaan tussen RTU- en IHP-media. De arabinosetest was moeilijk leesbaar; om serotypes O103 en O111 te bevestigen, gaat daarom nu de voorkeur uit naar de dulcitoltest.

Tijdens het besmetten van de stalen werden enkele fouten gemaakt: 4 stalen werden bijvoorbeeld fout besmet en 1 staal was helemaal niet besmet. Als we deze vergissingen buiten beschouwing laten, werden de vier serotypes allemaal met een hoge gevoeligheid gedetecteerd. Algemeen kunnen we besluiten dat het laboratoriumonderzoek heel goed is verlopen.