



National Institute for Public Health
and the Environment
Ministry of Health, Welfare and Sport

Moleculaire risk assessment *Escherichia coli* O157 in Nederland

Letter report 330411001/2011

E. Franz | F.J. van der Wal | A.H.A.M. van Hoek |
A.E. Heuvelink



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

Moleculaire risk assessment *Escherichia coli* O157 in Nederland

RIVM Briefrapport 330411001/2011

Colofon

© RIVM 2011

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'.

Eelco Franz (Projectleider), RIVM - Centrum Infectieziektebestrijding
Fimme-Jan van der Wal, Centraal Veterinair Instituut, Wageningen Universiteit
Angela van Hoek, RIVM - Centrum Infectieziektebestrijding
Annet Heuvelink, De Nieuwe Voedsel en Waren Autoriteit (nVWA)

Contact:
Eelco Franz
RIVM / CIB / LZO
eelco.franz@rivm.nl

Dit onderzoek werd verricht in opdracht van het ministerie van Economische Zaken, Landbouw en Innovatie, in het kader van Beleidsondersteunend onderzoek 2010

Rapport in het kort

Moleculaire risk assessment *Escherichia coli* O157 in Nederland

Infecties door Shiga toxine-producerende *Escherichia coli* O157 (STEC O157) zijn een bedreiging voor de volksgezondheid gezien de ernstige klinische gevolgen bij voornamelijk jonge kinderen en de potentie voor voedselgerelateerde uitbraken. Verschillende STEC O157 isolaten kunnen erg verschillen in genetische samenstelling. In deze studie is de mate van genotypische gelijkheid tussen STEC O157 isolaten uit (gezonde) runderen (n=76) en humane ziektegevallen (n=85) onderzocht aan de hand van vier moleculaire typeringsessays. Op basis van deze set essays is duidelijk geworden dat de populatie klinische humane *E. coli* O157 isolaten anders is qua genotypen samenstelling dan de populatie runderisolaten. De genotypen die domineren onder de klinische humane isolaten vormen een minderheid in de bestudeerde verzameling runderisolaten. Het kan zijn dat deze genotypen gekenmerkt worden door een hogere virulentie en/of door een verhoogde transmissie naar de mens, of dat er een andere bron is. Isolaten van kinderboerderijen, kampeerboerderijen en herkauwers anders dan runderen lijken risicovoller. Moleculaire screening op virulentiegenen en andere genetische (fylogenetische) markers die geassocieerd zijn met klinische humane isolaten maakt "risk-based" onderzoek naar hoog-risico isolaten mogelijk. Vervolgonderzoek zou zich moeten richten naar de verdeling van genotypen onder voedselisolaten, fenotypische verschillen (stressresistentie en virulentie) tussen verschillende genotypen en uitbreiding van het moleculaire risk assessment system naar non-O157 STEC.

Trefwoorden:

STEC, VTEC, typering, risk assessment, virulentie

Abstract

Moleculaire risk assessment *Escherichia coli* O157 in Nederland

Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 (STEC O157) infections are a serious public health threat given the severe clinical symptoms and food related outbreak potential. Different STEC O157 isolates can differ considerably in genetic composition. In this study the degree of genetic similarity between STEC O157 isolates from cattle (n=76) and human clinical cases (n=85) were assessed using four different molecular typing assays. These assays revealed a different genotype composition between the bovine STEC O157 population and the human clinical STEC O157 population. The genotypes representing the human clinical isolates only occur in low frequency among the bovine isolates. These genotypes are possibly characterized by higher pathogenicity and/or increased transmission capabilities. Isolates from petting zoos, farm-based camp sites and ruminants other than cattle seem to harbor a higher frequency of genotypes dominating the human clinical STEC O157 population. Molecular screening of virulence and phylogenetic markers occurring at high frequency among human clinical isolates facilitates risk-based monitoring and molecular risk assessment. Continuation of this research should focus on the frequency distribution of STEC O157 genotypes among food isolates, phenotypic differences (stress resistance and virulence) between different genotypes and extension of the molecular risk assessment system to non-O157 STEC.

Keywords:

STEC, VTEC, typing, risk assessment, virulence

Inhoud

1	Beleidscontext—6
2	Methoden—7
3	Resultaten—8
4	Conclusie—13
5	Vervolgonderzoek—14
6	Referenties—15

1 Beleidscontext

Infecties door Shiga toxine-producerende *Escherichia coli* (STEC), a.k.a. Vero toxine-producerende *E. coli* (VTEC), zijn een bedreiging voor de volksgezondheid gezien de ernstige klinische gevolgen bij voornamelijk jonge kinderen. De perceptie van het risico door de consument is dan ook aanzienlijk, zoals bij vele voedselgerelateerde bedreigingen. De uitbraak potentie vormt een additioneel punt van zorg. STEC is nagenoeg endemisch in de rundveehouderij en interventiestrategieën voor het bestrijden/eradiceren van STEC in de primaire keten zijn op dit moment niet voorhanden. Beleidsgericht ingrijpen op transmissieroutes lijkt daarom een meer zinvolle benadering. Echter, daarvoor is kennis noodzakelijk betreffende de populatiebiologie van STEC.

STEC is een grote gevarieerde groep *E. coli*'s, waarvan gedacht wordt dat slechts een deel ervan bij de mens terecht komt en/of ziekte veroorzaakt. Onze hypothese is dat een kleine subpopulatie van de STEC stammen die aanwezig zijn in het rund reservoir gekenmerkt wordt door hogere virulentie en/of verhoogde kans op transmissie naar de mens. Het is van belang om te achterhalen welk deel dit is, waardoor deze groep wordt gekenmerkt en wat de meest significante transmissieroute is.

De virulentie van STEC wordt niet zozeer bepaald door het O-type (klassieke serotypering) maar door de aanwezigheid van bepaalde virulentiefactoren (zoals toxinen en adhesins). Moleculaire screening op virulentiegenen en andere genetische (fylogenetische) markers die geassocieerd zijn met klinische humane isolaten maakt "risk-based" onderzoek naar hoog-risico isolaten (ongeacht serotype) mogelijk. Het belang van "moleculaire risk assessment" (MRA) wordt ook onderschreven door de WHO en de EFSA. Recentelijk zijn er een aantal moleculaire typerings assays ontwikkeld waaruit bleek dat in de USA de gebruikte markers non-random verdeeld zijn over humane en dierlijke *E. coli* O157 isolaten. Deze markers kunnen dus gebruikt worden om in het dierreservoir, milieu en voedsel specifiek te zoeken naar hoog-risico stammen. Bovendien levert een beeld over de mate van gelijkenis in genetische populatiestructuur van *E. coli* O157 in verschillende reservoirs, bronnen en klinische humane gevallen informatie over de mogelijke herkomst van infecties.

De kennisvraag is: wat is de mate van genotypische gelijkenis tussen *E. coli* O157 isolaten uit het dierreservoir, klinische humane isolaten en voedselisolaten. In de literatuur beschreven PCR assays voor genetische markers zullen worden getest op de geschiktheid om te gebruiken voor "risk-based" monitoring en een grove bronattributie.

2 Methoden

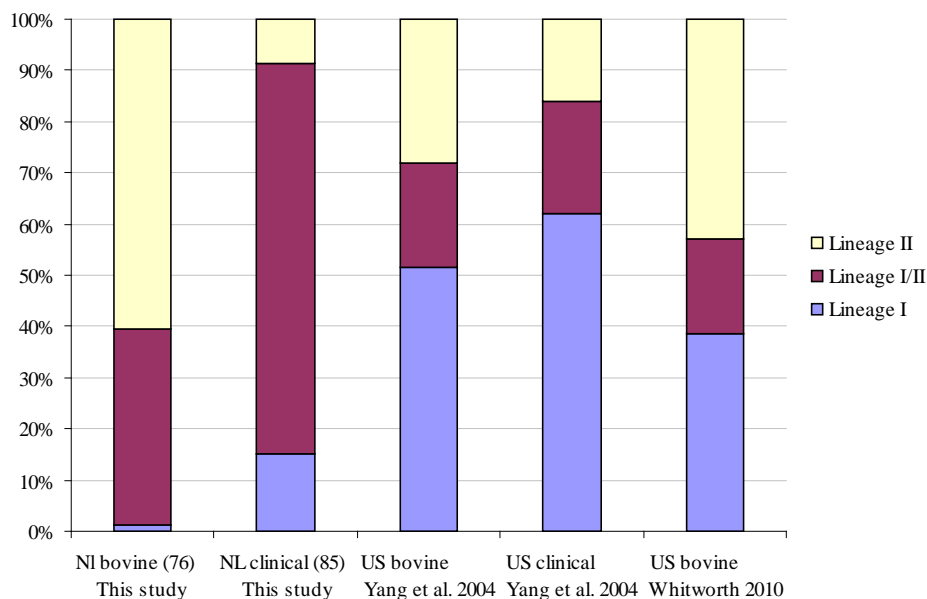
Een set van 76 dierlijke (73 rund, 2 geit, 1 hert; in de rest van dit rapport aangeduid als runderisolaten) en 85 klinische humane *E. coli* O157 isolaten is samengesteld uit de stammenbank van de Voedsel en Waren Autoriteit (Zutphen) en het RIVM (LIS). Alle stammen zijn in het bezit van genen coderende voor de belangrijkste virulentiefactoren (*stx2*: Shiga toxine 2, *eae*: intimine en *hly*: hemolysine). Van al deze stammen werd DNA geïsoleerd, wat vervolgens werd gebruikt voor vier verschillende PCR assays.

1. **Lineage specific polymorphism assay (LSPA-6) (Yang et al., 2004)**. Dit is een multiplex PCR assay waarmee door middel van genetische markers *E. coli* O157 isolaten worden onderverdeeld in 3 genotypen: L1, L1/2 en L2. De markers zijn polymorfismen die vóórkomen in niet-coderend DNA of in voor het fenotype niet-essentiële genen. Deze markers moeten dus vooral gezien worden als fylogenetische markers.
2. **Shiga toxin-encoding bacteriophage insertion site assay (SBI) (Shaikh and Tarr, 2003; Besser et al., 2007)**. Deze assay bestaat uit 6 PCR reacties die het DNA coderende voor de *stx* genen en de daarom heen liggende insertie sequenties amplificeren. Ook deze markers hebben niet direct een functionele betekenis, maar moeten als evolutionaire / fylogenetische markers worden gezien. Op basis van de aan- of afwezigheid van deze markers wordt een genotype nummer toegekend aan elke stam.
3. **Q-*stx2* assay (LeJeune et al., 2004)**. Deze PCR richt zich op een polymorfisme in het anti-terminator allel Q. Dit gen bevindt zich stroomopwaarts van het *stx2* gen en bepaalt de mate waarin deze wordt afgelezen (en dus de mate van toxine productie). Allel Q933 is geassocieerd met hoge anti-terminator activiteit en dus hoge toxine productie, terwijl allel Q21 geassocieerd is met lage anti-terminator activiteit en dus lage toxine productie. Dit gen heeft dus een directe relatie met virulentie.
4. **Tir polymorphism assay (Bono et al., 2007)**. Deze PCR richt zich op een polymorfisme in het *Tir* gen, welke codeert voor de receptor voor intimine en beschouwd kan worden als een virulentiefactor.

De frequenties van het vóórkomen van de verschillende *E. coli* O157 genotypen onder runder- en klinische humane isolaten zijn bepaald op basis van bovenstaande genetische markers, en vergeleken met de verdelingen zoals die in de VS (waar de incidentie van *E. coli* O157 infecties bijna 5 x hoger is als in NL) zijn gevonden.

3 Resultaten

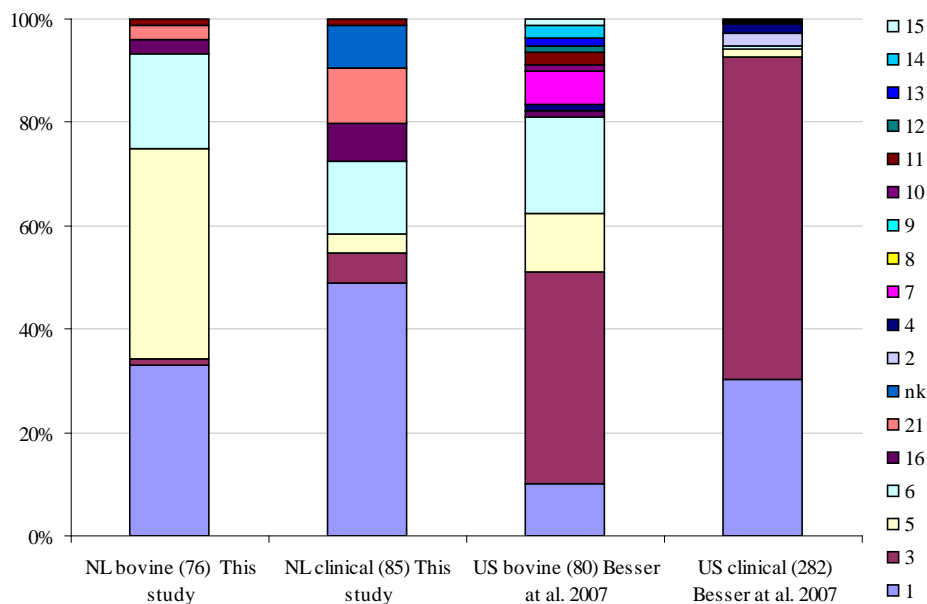
De resultaten van de 4 PCR assays zijn samengevat in Figuur 1 t/m 4. Hierin zijn tevens de corresponderende data van de VS opgenomen. De resultaten van de LSPA-6 assay (assay nr. 1) laten zien dat in NL lineage II domineert in het rund reservoir (61%), gevolgd door lineage I/II (38%) (Figuur 1). Lineage I komt maar zeer zelden voor in het rund reservoir (1%). De verdeling van genotypen onder klinische humane isolaten laat een heel andere verdeling zien, met een sterke afname in de frequentie van lineage II (9%) en een toename in frequentie van lineage I (15%) en lineage I/II (76%). De verdeling van genotypen in de VS laat nog weer een heel ander beeld zien, met een dominantie van lineage I in zowel het rund reservoir als onder de klinische humane isolaten. In Nederland, stijgt de frequentie van lineage I + I/II samen van 39% in het rund reservoir naar 91% onder klinische humane isolaten. De grote gelijkenis betreffende de genotypen verhouding onder dierlijke en humane isolaten suggereert dat in de VS het subpopulatie concept minder opgaat dan voor NL; er is geen genotype dat veel vaker voorkomt onder humane dan onder dierlijke isolaten. In Nederland is er meer sprake van een subpopulatie van STEC O157 in het reservoir (de LI/II stammen) die gekarakteriseerd wordt door een verhoogde transmissiekans naar de mens of een verhoogde virulentie heeft. Een andere optie is dat er in NL sprake is van blootstelling vanuit een ander reservoir dan het rund reservoir (bv. wild of andere landbouwhuisdieren).



Figuur 1. Distributie van *E. coli* O157 genotypen volgens de LSPA-6 assay.

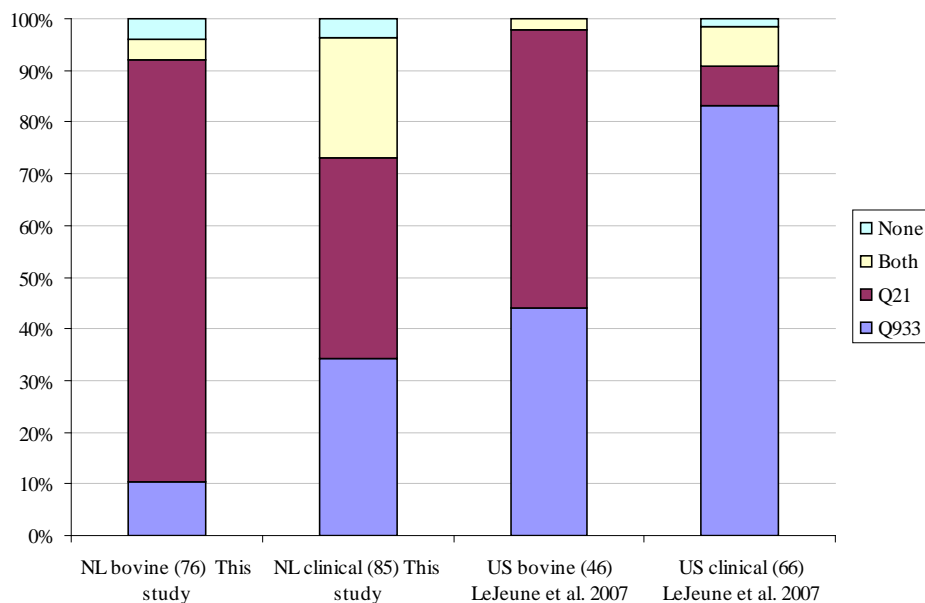
Het eerste wat opvalt aan de resultaten van de SBI assay (assay nr. 2) is dat de diversiteit in SBI genotypen een stuk groter is onder klinische

humane isolaten dan onder runderisolaten in NL, terwijl dit in de VS juist andersom is (Figuur 2). In NL domineren SBI genotypen 5 (41%) en 1 (33%) in het rund reservoir. Onder de NL klinische humane isolaten domineert genotype 1 (48%) en vormt de overige 52% een samenstelling van een verscheidenheid aan genotypen. Van alle genotypen die in het rund reservoir zijn aangetoond vertonen genotypen 5 en 6 een lagere frequentie onder de klinische humane isolaten dan onder de rund isolaten. De andere STEC O157 genotypen nemen toe in frequentie (3, 16, 21 en 11). Opvallend is dat enkele klinische humane isolaten gekarakteriseerd worden door een ontypeerbaar SBI genotype, terwijl alle runderisolaten typeerbaar zijn. Wellicht zijn deze isolaten afkomstig uit een andere bron.



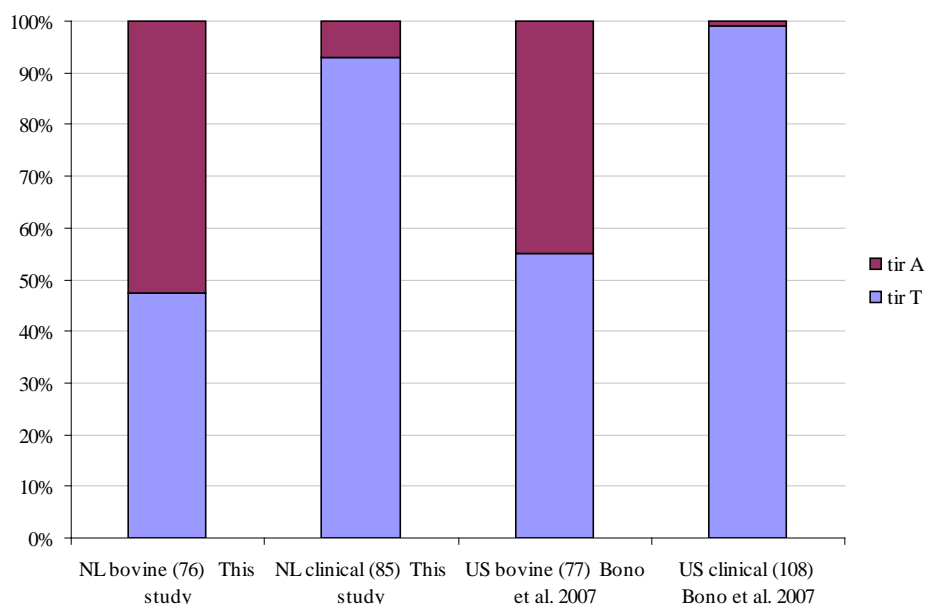
Figuur 2. Distributie van *E. coli* O157 genotypen volgens de SBI assay.

De Q-stx2 assay (assay nr. 3) laat zien dat de *E. coli* O157 runderisolaten in NL gedomineerd worden door de aanwezigheid van het Q21 allel (lage Shiga toxine productie) (82%) en slechts 14% het hoog producerende allel Q933 bevat (Figuur 3). Ongeveer 58% van de klinische humane isolaten bevat Q933. Dit is een stijging in frequentie met een factor 4. In tegenstelling tot in NL bevat 91% van de Amerikaanse klinische humane isolaten het Q933 allel. Echter, omdat 46% van de Amerikaanse runderisolaten het Q933 allel bevat, is dit slechts een factor 2 hoger. In dat opzicht fungeert de aanwezigheid van Q933 in NL beter als indicator voor humaan pathogene STEC O157.



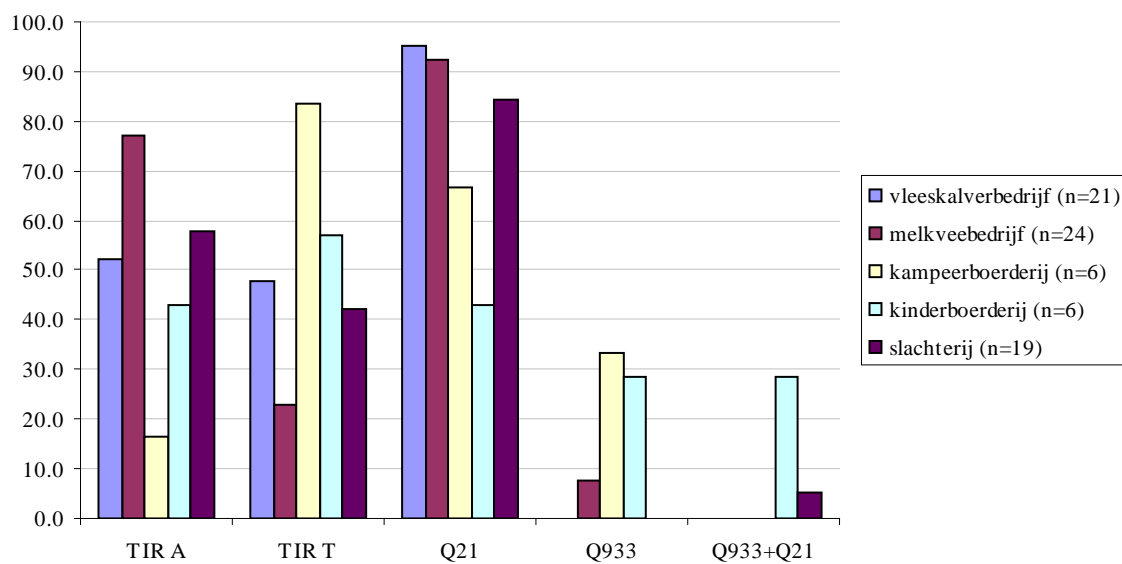
Figuur 3. Distributie van de Q-stx2 allelen Q933 en Q21 volgens het Q-stx2 assay.

De verdeling betreffende het Tir-A en Tir-T allel (assay nr. 4) onder rund en klinische humane *E. coli* O157 isolaten in NL vertoont sterke gelijkenis met die in de VS (Figuur 4). In het rund reservoir is de verdeling in beide geografische regio's ongeveer gelijk (50%-50%), terwijl het Tir-T allel veruit dominant is onder de klinische humane isolaten (93% en 99% in respectievelijk NL en de VS). Hoewel de functionele relatie met humaan infectiesucces niet duidelijk is, kan het Tir-T allel beschouwd worden als een zeer goede marker voor (potentieel) humaan pathogene isolaten.



Figuur 4. Distributie van de Tir allelen A en T volgens het Tir assay.

Opvallend resultaat is dat van de runderisolaten afkomstig van melkveebedrijven slechts 23% het Tir-T allel had en slechts 7% het Q933 allel (beide allelen oververtegenwoordigd onder humane isolaten) (Figuur 5). Daarentegen was 57% van de isolaten afkomstig van kinderboerderijen positief voor Tir-T en 29% positief voor Q933. Een soortgelijk beeld zien we bij isolaten van kampeerboerderijen (83% Tir-T en 33% Q933). De drie isolaten van geit en hert waren allen positief voor Tir-T en Q933. Aangezien Tir-T en Q933 echte virulentiefactoren zijn en een duidelijke marker voor klinische humane isolaten duidt dit op de mogelijkheid dat er op melkveebedrijven minder virulente stammen circuleren dan op kinder- en kampeerboerderijen. Er moet worden opgemerkt dat het aantal isolaten van melkveebedrijven wel groter was dan van kinder- en kampeerboerderijen. In een vervolgonderzoek zouden meer kinder- en kampeerboerderijisolaten moeten worden bekeken.



Figuur 5. Verdeling van het aantal isolaten positief bevonden voor de markers Tir-A, Tir-T, Q933 en Q21.

4 Conclusie


Op basis van een set eenvoudige PCR marker assays is duidelijk geworden dat de populatie klinische humane *E. coli* O157 isolaten anders is qua genotypen samenstelling dan de populatie runderisolaten. De genotypen die domineren onder de klinische humane isolaten vormen een minderheid in de bestudeerde verzameling runderisolaten (Figuur 6). Het kan zijn dat deze genotypen gekenmerkt worden door een hogere virulentie en/of door een verhoogde transmissie naar de mens, of dat er een andere bron is. Isolaten van kinderboerderijen, kampeerboerderijen en herkauwers anders dan runderen lijken risicovoller. Moleculaire screening op virulentiegenen en andere genetische (fylogenetische) markers die geassocieerd zijn met klinische humane isolaten maakt "risk-based" onderzoek naar hoog-risico isolaten (ongeacht serotype) mogelijk.

5 Vervolgonderzoek

- a. De data verkregen in de hier beschreven studie kunnen worden samengevoegd m.b.v. bioinformatica software. Hiermee kan een dendogram gemaakt worden op basis de verkregen genetische marker informatie. Dit dendogram kan worden vergeleken met een dendogram gebaseerd op PFGE patronen (zelfde clustering?).
- b. Het is momenteel niet duidelijk hoe *E. coli* O157 isolaten uit voedsel zich verhouden qua genotype samenstelling t.o.v. runder- en klinische humane isolaten.
- c. Het is momenteel niet duidelijk of de genotypen die oververtegenwoordigd zijn onder klinische humane isolaten een verhoogde virulentie hebben, een verhoogde transmissiekans of beide. Dit kan onderzocht worden door o.a. de productie van Shiga toxine en de mate van hechting aan darmepitheelcellen te meten.
- d. Er zal meer inzicht moeten worden verkregen in de verschillende genotypen van de dierlijke isolaten in relatie tot de herkomst van de isolaten (melkveebedrijven, kinderboerderijen, kampeerboerderijen, slachterijen, vleeskalverbedrijven).
- e. Ten slotte, *E. coli* O157 is niet de enige Shiga toxine-producerende *E. coli* die ziekte veroorzaakt bij de mens. De non-O157 STEC's lijken een significante bijdrage te leveren aan het aantal STEC infecties in Nederland (3.5 keer het aantal infecties veroorzaakt door O157) (Friesema, 2010). Er zal een start moeten worden gemaakt met het valideren van virulentie markers voor non-O157 STEC. Dit moet uiteindelijk een systeem opleveren waarmee hoog- en laag-risico STEC's kunnen worden geïdentificeerd, inclusief hun transmissieroute(s).

6 Referenties

- Besser, T.E., Shaikh, N., Holt, N.J., Tarr, P.I., Konkel, M.E., Malik-Kale, P. et al. (2007) Greater diversity of shiga toxin-encoding bacteriophage insertion sites among *Escherichia coli* O157:H7 isolates from cattle than in those from humans. *Applied and Environmental Microbiology* **73**: 671-679.
- Bono, J.L., Keen, J.E., Clawson, M.L., Durso, L.M., Heaton, M.P., and Laegreid, W.W. (2007) Association of *Escherichia coli* O157:H7 tir polymorphisms with human infection. *BMC Infectious Diseases* **7**.
- Friesema, I.H.M., de Jager, C.M., Heuvelink, A.E., van der Zaluw, A.E., Kuiling, S. and van Pelt, W. (2010) Intensieve surveillance van Shiga-toxineproducerende *Escherichia coli* (STEC) in Nederland, 2008. *Infectieziektebulletin* **21**: 12-18.
- LeJeune, J.T., Abedon, S.T., Takemura, K., Christie, N.P., and Sreevatsan, S. (2004) Human *Escherichia coli* O157:H7 genetic marker in isolates of bovine origin. *Emerging Infectious Diseases* **10**: 1482-1485.
- Shaikh, N., and Tarr, P.I. (2003) *Escherichia coli* O157:H7 Shiga toxin-encoding bacteriophages: Integrations, excisions, truncations, and evolutionary implications. *Journal of Bacteriology* **185**: 3596-3605.
- Yang, Z., Kovar, J., Kim, J., Nietfeldt, J., Smith, D.R., Moxley, R.A. et al. (2004) Identification of common subpopulations of non-sorbitol-fermenting, β -glucuronidase-negative *Escherichia coli* O157:H7 from bovine production environments and human clinical samples. *Applied and Environmental Microbiology* **70**: 6846-6854.



Published by:

**National Institute for Public Health
and the Environment**

P.O. Box 1 | 3720 BA Bilthoven
The Netherlands
www.rivm.com