

## PDF hosted at the Radboud Repository of the Radboud University Nijmegen

The following full text is a publisher's version.

For additional information about this publication click this link.

<http://hdl.handle.net/2066/23342>

Please be advised that this information was generated on 2019-09-21 and may be subject to change.

# VEROCYTOTOXINE-PRODUCERENDE *ESCHERICHIA COLI* O157 BIJ NEDERLANDSE VLEESKALVEREN EN SLACHTRUNDEREN

A. Heuvelink<sup>1</sup>, S. Schulten<sup>2</sup>, R. Hoenderken<sup>3</sup>, P. Bijker<sup>4</sup> en E. de Boer<sup>2</sup>

Tijdschr Diergeneeskd 1996; 121: 642-6

## Oorspronkelijke artikelen

### SAMENVATTING

In 1994 (augustus-september) en 1995 (juli-oktober) werden faeces van Nederlandse vleeskalveren en slachtrunderen onderzocht op de aanwezigheid van verocytotoxine-producerende *Escherichia coli* O157 (O157 VTEC). In 1994 werden uit drie (0,9%) van de 365 faecesmonsters van vleeskalveren O157 VTEC stammen geïsoleerd. Faeces van slachtrunderen werd niet verzameld. In 1995 werden uit één (0,5%) van de 183 monsters van vleeskalveren en uit 30 (11,1%) van de 270 monsters van slachtrunderen O157 VTEC stammen geïsoleerd. De isolatiemethode in 1994 was als volgt: verrijking in gemodificeerd trypton-soya-bouillon met acriflavine (mTSB+a), gevolgd door uitplaten op zowel sorbitol-MacConkey-agar (SMAC) als SMAC met telluriet en cefixime (TC-SMAC). In 1995 werden de monsters verrijkt in gemodificeerd *E. coli*-bouillon met novobiocine (mEC+n) en werd naast direct uitplaten van de verrijkingsculture een immunomagnetische concentreringsstap van *E. coli* O157 uitgevoerd alvorens uit te platen. Alle 30 stammen uit slachtrunderen werden geïsoleerd met de immunomagnetische scheidingsprocedure. Vier van de 30 monsters werden tevens positief bevonden door direct uit te platen op TC-SMAC. De faeces van het ene vleeskalf werden uitsluitend positief bevonden door direct uit te platen op TC-SMAC. Uitplaten op SMAC gaf telkens negatieve resultaten. Karakterisering van de O157 VTEC-isolaten toonde overeenkomst tussen de humane en runderisolaten. Dit aspect vereist nog aanvullende experimenten. Uit het hier beschreven onderzoek is gebleken dat ook Nederlands rundvee, met name slachtrunderen, een reservoir van O157 VTEC zijn.

### SUMMARY

#### Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 in Dutch veal calves and adult cattle sampled at slaughterhouses

In 1994 (August-September) and in 1995 (July-October) faeces of Dutch veal calves and adult cattle was examined for the presence of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 (O157 VTEC). The samples were collected at slaughterhouses. In 1994, O157 VTEC were isolated from three (0.9%) of 365 fecal samples of veal calves. Faeces of adult cattle was not collected. In 1995, O157 VTEC were isolated from one (0.5%) of 183 fecal samples of veal calves and from 30 (11.1%) of 270 fecal samples of adult

cattle. In 1994, the organisms were isolated by selective plating onto both sorbitol MacConkey agar (SMAC) and SMAC containing tellurite and cefixime (TC-SMAC) following selective enrichment in modified trypton soya broth with acriflavin (mTSB+a). In 1995, the samples were enriched in modified *E. coli* broth with novobiocin (mEC+n), and in addition to directly plating onto TC-SMAC the enriched cultures were plated after incorporation of an immunomagnetic separation step of *E. coli* O157. All 30 strains isolated from adult cattle were isolated with the immunomagnetic separation procedure. Four of the 30 samples were determined positive also by directly plating onto TC-SMAC. The sample from the veal calf was determined positive only by directly plating onto TC-SMAC. Plating onto SMAC resulted only in negative results. Characterization of the O157 VTEC isolates showed similarities between isolates of humans and cattle. Additional experiments need to be done concerning this aspect. From this study it appeared that also Dutch cattle are a reservoir of O157 VTEC.

### INLEIDING

Nadat *Escherichia coli* O157:H7 in 1982 voor het eerst werd geïdentificeerd als humaan pathogeen (16), zijn er talrijke epidemieën en individuele gevallen van *E. coli* O157:H7 infecties gerapporteerd. Een infectie met *E. coli* O157:H7 kan asymptomatisch verlopen, zich beperken tot milde diarree, bloederige diarree of hemorragische colitis (HC). Bij circa 8% van de geïnfecteerde mensen treedt als complicatie het hemolytisch uremisch syndroom (HUS) op, dat wordt gekarakteriseerd door de trias hemolytische anemie, thrombocytopenie en acute nierinsufficiëntie (12). HUS vormt de belangrijkste oorzaak van acuut nierfalen op de kinderleeftijd. De pathogenese van *E. coli* O157:H7 berust op tenminste twee virulentiefactoren: de productie van verocytotoxinen (VT) (VT1 en/of VT2) en de vorming van zogenaamde 'E. coli attaching and effacing' (*eae*) lesies in de darmmucosa, waarbij de darmvilli ernstig worden beschadigd en afgevlakt (8,15). Alhoewel tot op heden *E. coli* O157:H7 het meest frequent is geïsoleerd uit faeces van patiënten met HC of HUS wordt een groeiend aantal serotypes van verocytotoxine-producerende *E. coli* (VTEC) geassocieerd met infecties bij de mens. Met behulp van de Verocel-cytotoxiciteitstest kunnen faeces van patiënten worden onderzocht op de aanwezigheid van vrij VT en VTEC-stammen. Na isolatie van de VTEC-stammen kan het serotype worden bepaald. Anderzijds kan in het serum van patiënten de aanwezigheid van antilichamen tegen lipopolysaccharides (LPS) van bekende VTEC-serogroepen (onder andere O157, O111, O26) worden bepaald. Rundvee wordt beschouwd als voornaamste reservoir van O157 VTEC (9,17,18). Verschillende O157 VTEC-infecties zijn in verband gebracht met de consumptie van onvoldoende verhit rundvlees en rauwe melk.

Retrospectief onderzoek van sera van patiënten met HUS liet zien dat infecties met *E. coli* O157 al sinds 1974 in Nederland voorkomen (6). Tijdens een prospectieve studie van september 1989 tot en met september 1993 werden faeces en sera van HUS-patiëntjes afkomstig uit Nederland, België (Leuven en Antwerpen) en Duitsland (Keulen) verzameld. Bij 88 (78%) van de 113 patiëntjes werd een infectie met VTEC aangetoond. In 86% van de gevallen betrof het

<sup>1</sup> Afdelingen Kindergeneeskunde en Medische Microbiologie, Academisch ziekenhuis Nijmegen, Postbus 9101, 6500 HB Nijmegen.

<sup>2</sup> Inspectie Gezondheidsbescherming, Keuringsdienst van Waren te Zutphen.

<sup>3</sup> Regionale Veterinaire Inspectie te Arnhem.

<sup>4</sup> Faculteit der Diergeneeskunde, Vakgroep Voedingsmiddelen van Dierlijke Oorsprong, Universiteit Utrecht.



VTEC behorend tot serogroep O157 (86%) (13). Tot op heden is het niet gelukt te achterhalen op welke wijze de Nederlandse patiëntjes met VTEC geïnfecteerd raakten. Over mogelijke reservoirs van VTEC in Nederland is ook nog weinig bekend. Echter met behulp van een selectief ophopings- en isolatiemedium werden onlangs O157 VTEC-stammen geïsoleerd uit twee van de in totaal 2330 onderzochte vlees- en kipproducten (11). Met de 3M Petrifilm Test Kit-HEC (immunoblotmethode voor de isolatie van *E. coli* O157-stammen, gebaseerd op de detectie van O157 LPS) werden uit 22 (6%) van 360 onderzochte vlees- en kipproducten *E. coli* O157-stammen negatief voor VT-productie en behorende tot een ander H-type dan H7 geïsoleerd. In de maanden mei en juni 1993 werden 550 faecesmonsters van slachtrunderen onderzocht op de aanwezigheid van O157 VTEC met een selectief ophopings- en isolatiemedium, op dezelfde wijze als de vleesproducten. Uit geen van de faecesmonsters werd O157 VTEC geïsoleerd (3).

De hier beschreven studie legt de resultaten vast van onderzoek naar de aanwezigheid van O157 VTEC in faeces van Nederlandse vleeskalveren en slachtrunderen, die in 1994 en 1995 werden aangevoerd bij verschillende slachterijen verspreid over Nederland. Verschillende isolatiemethoden werden parallel gebruikt.

## MATERIALEN EN METHODEN

### Monsters

In 1994 werden in de periode van 29 augustus tot en met 14 september wekelijks (op maandag, dinsdag en woensdag) bij één grote kalverslachterij faeces van vleeskalveren verzameld. Het jaar daarop werden in de periode van 24 juli tot en met 30 oktober wekelijks (op maandag en dinsdag) faeces van zowel vleeskalveren als slachtrunderen verzameld bij een aantal grote slachterijen verspreid over Nederland (in de ambtsgebieden Noord, Oost, Zuid en West van de Veterinaire Inspectie) (Zie tabel 1). Monstername, transport en verwerking van de monsters werden uitgevoerd volgens een vast protocol. De faeces werden op aseptische wijze verzameld via een snede in de endeldarm van juist geslachte dieren. Identificatie van de dieren vond plaats door middel van het oornummer. De slachtrunderen werden aangevoerd via de handel en markten en waren allen oorspronkelijk afkomstig van verschillende Nederlandse melkveebedrijven. De vleeskalveren daarentegen werden als koppel, afkomstig van één kalvermesterij, aangeleverd bij de slachterij. Als steekproefgrootte voor de bemonstering van vleeskalveren werd  $\sqrt{n}$  uit de koppelgrootte aangehouden. De namen van de verschillende mestbedrijven, de koppelgroottes, alsook de huisvestingen (box-/groepshuisvesting), werden genoteerd.

Tabel 1. Overzicht faecesmonstername van vleeskalveren en slachtrunderen in 1994 en 1995.

Jaar	Groep (aantal monsters)	Ambtsgebied
1994	vleeskalveren (365)	Oost (n=365)
1995	vleeskalveren (183)	Oost (n=93)
		West (n=60)
		Zuid (n=30)
	slachtrunderen (270)	Oost (n=90)
		West (n=30)
		Noord (n=90)
		Zuid (n=60)

### Isolatiemethoden

#### Selectieve ophoping en isolatie van O157 VTEC

Circa 20 g faeces werd 1:10 verdund in gemodificeerd trypton-soya-bouillon met acriflavine (10 µg/mL) (mTSB+a). Na homogenisatie en een incubatieperiode van 20-24 uur bij 37°C onder voortdurend schudden (100 rpm), werd van de ophoping een verdunningsreeks gemaakt in pepton fysiologische zoutoplossing. Van de 10<sup>-3</sup> en 10<sup>-4</sup> verdunningen werd 0,1 mL uitgespateld op sorbitol-MacConkey-agar (SMAC) met telluriet (2,5 µg/mL) en cefixime (50 µg/mL) (TC-SMAC). Van de 10<sup>-5</sup> en 10<sup>-6</sup> verdunningen werd 0,1 mL uitgespateld op SMAC zonder toevoegingen. Na 18-20 uur incuberen bij 42°C werden kleurloze (sorbitol-negatieve) kolonies overgeënt op zowel SMAC met als toevoeging 4-methylumbelliferyl-β-D-glucuronide (0,1 mg/mL) (MUG) (SMAC+ MUG) als op eosine-methyleen-blauw-agar (EMB). Per monster werden maximaal 12 sorbitol-negatieve kolonies geselecteerd. De platen werden 18-20 uur bij 37°C geïncubeerd. Kleurloze kolonies die bij instraling van UV-licht niet fluoresceerden (MUG-negatief) en die tevens op EMB-agar de voor *E. coli* karakteristieke paars-groene metaalglans vertoonden werden getest op de aanwezigheid van het O157-antigeen met behulp van een *E. coli* O157-latex-agglutinatie-test (Oxoid). Isolaten die een positieve reactie gaven werden nader gekarakteriseerd zoals hieronder wordt beschreven. In 1995 werd als ophopingsmedium, in plaats van mTSB+a, gemodificeerd *E. coli*-bouillon met novobiocine (20 µg/mL) (mEC+n) gebruikt. Elke batch van de bereide media werd gecontroleerd op productiviteit en selectiviteit.

#### Immunomagnetische scheiding van O157 VTEC

In 1995 werd naast de conventionele isolatiemethode tevens een concentrering door middel van immunomagnetische scheiding (IMS) uitgevoerd. Na 6-8 uur verrijking in mEC+n (37°C, 100 rpm) werd circa 5 mL uit de ophoping gepipetteerd en gefiltreerd over filtreerpapier. De ophoping werd voortgezet tot een incubatieduur van 20-24 uur voor de conventionele isolatiemethode. Eén mL filtraat werd gepipetteerd in een eppendorfvaaie met 20 µL Dynabeads anti-*E. coli* O157 (magneetbolletjes gecoat met antilichamen tegen *E. coli* O157) (Dyna). Het mengsel werd 30 min. bij 23°C geïncubeerd, continu roterend in een thermomixer (Eppendorf 5437). Vervolgens werd het vaatje in het magneetblok geplaatst en na drie minuten werd het supernatant afgepipetteerd. Na drie wasstappen met telkens 1 ml Dynabeads wasbuffer werden de Dynabeads geresuspendeerd in 100 µL wasbuffer. Na goed mengen werd het concentraat afgeënt op een TC-SMAC-plaat. De platen werden 18-20 uur geïncubeerd bij 37°C. Evenals beschreven voor de conventionele isolatiemethode werden maximaal 12 kleurloze kolonies geselecteerd, overgeënt op SMAC+MUG en EMB, en na een positieve O157-agglutinatiereactie nader gekarakteriseerd.

#### Karakterisatie O157 VTEC isolaten

De isolaten die positief reageerden in de latex-test werden biochemisch bevestigd als *E. coli* met het API 20E-systeem (Bio Mérieux). Volledige serotypering van de *E. coli* isolaten werd uitgevoerd op het Rijksinstituut voor de Volksgezondheid en het Milieu te Bilthoven. Daarnaast werd het faagtype van de *E. coli* O157-isolaten bepaald door dr. B. Rowe (Laboratory of Enteric Pathogens, Central Public Health Laboratory, Londen). Met behulp van de Polymerase Chain Reaction (PCR) werd de aanwezigheid van het VT1, VT2 en *eae* gen (het *eae* gen speelt een rol bij de vorming van *eae* lesies) bepaald (10). VT-productie werd getest in een Verocel-cytotoxiciteitstest (13).