

Nieuw onderzoek naar diagnostiek van STEC en HUSEC: STEC-ID-net

A.M.D. Kooistra-Smid, R.F. de Boer, P.D. Croughs, I.H.M. Friesema, D.W. Notermans, B. Wolters, M. Petrigani, T.P. Zomer, C.H.F.M. Waegemaekers, A. Ott, J.W.A. Rossen, A.W. Friedrich

Trefwoorden

Escherichia coli, STEC, HUS, screeningsalgoritme

Shigatoxine-producerende *Escherichia coli*-stammen (STEC) kunnen bij de mens acute gastro-enteritis veroorzaken, waarbij als complicaties hemorragische colitis en het hemolytisch-uremisch syndroom (HUS) kunnen optreden. STEC's worden gekarakteriseerd door de aanwezigheid van ten minste één van de twee genen die coderen voor de Shiga toxinen Stx1 en Stx2. Deze genen komen ook voor in bacteriofagen. Door middel van 'gene-transfer' kunnen via deze weg *stx*-genen worden uitgewisseld tussen bacteriën, zoals *E. coli*.

De pathogeniciteit van STEC wordt gekarakteriseerd door de mate waarin bepaalde subtypen shigatoxinen (de *stx2*- en de *stx2c*-variant zijn sterk geassocieerd met ernstig beloop) en andere virulentiefactoren geproduceerd worden. Voorbeelden van virulentiefactoren zijn *escV* en *aggR/aat*. *EscV* bevindt zich op een virulentie-eiland dat codeert voor adhesie aan de darmwand en karakteristieke (A/E) laesies. *AggR/aat* zijn virulentiefactoren die zich bevinden op een plasmide dat verantwoordelijk is voor een karakteristiek adhesiepatroon aan de darmwand. STEC-serotypen die geassocieerd zijn met deze ernstige ziektebeelden worden enterohemorragische (EHEC) of HUS-geassocieerde *E. coli* (HUSEC) genoemd. STEC-stammen behorend tot serotypes O157, O26, O111, O145, O103, O91, O104 en O121 zijn het meest frequent geassocieerd met uitbraken en HUS.

Introductie

Mede naar aanleiding van de landelijke studie van Van Duinhoven *et al.*¹ is in 2007 de moleculaire diagnostiek (PCR) voor STEC in Nederland geïntroduceerd. De medisch-microbiologische laboratoria (MML's) in Nederland zijn naast de conventionele kweek gericht op serotype O157, ook moleculaire detectietechnieken (zoals PCR) gaan gebruiken om tevens non-O157-serotypes te kunnen aantonen. Bij inventarisatie in 2011 maakte een derde van de MML's gebruik van de PCR (*stx1/stx2*) voor de detectie van STEC en twee derde van de Sorbitol

MacConkey (SMAC)-agar waarmee alleen detectie van STEC O157 mogelijk is. Gekweekte isolaten worden naar het RIVM gestuurd voor verdere typering ten behoeve van landelijke surveillance.²

Infecties met STEC behoren tot de meldingsplichtige infectieziekten zoals in de Wet Publieke Gezondheid zijn beschreven.³ Na de invoering van de STEC-PCR is het aantal meldingen aan GGD'en sterk toegenomen: het aantal landelijke STEC-meldingen is verachtvoudigd in de periode 2007-2012 (881 gevallen in 2012). Het merendeel van de stijging betreft non-O157-stammen of PCR-positieve patiënten bij wie geen isolaat werd verkregen in de kweek en dus geen typering mogelijk was.^{2,4} De belangrijkste taak van de GGD is om eventuele clusters tijdig op te merken. Door snelle bronopsporing kan mogelijk een grote epidemie worden voorkomen.

De hypothese is dat veel STEC-PCR-positieve bevindingen geen tot weinig risico voor de volksgezondheid hebben omdat deze STEC mogelijk minder virulent zijn. Bron- en contactonderzoek bij een positieve STEC-PCR-melding is alleen zinvol in die gevallen waarbij de volksgezondheid

R.F. de Boer, afdeling Research & Development, Laboratorium voor Infectieziekten, Groningen; P.D. Croughs, afdeling Medische Microbiologie, STAR-mdc, Rotterdam; I.H.M. Friesema, D.W. Notermans, M. Petrigani, C.H.F.M. Waegemaekers, Centrum Infectieziektebestrijding (Cib), Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu (RIVM), Bilthoven; B. Wolters, afdeling Infectieziektenbestrijding, GGD Groningen, Groningen; T.P. Zomer, afdeling Infectieziektebestrijding, GGD Rotterdam-Rijnmond, Rotterdam, afdeling Maatschappelijke Gezondheidszorg, Erasmus MC, Universitair Medisch Centrum Rotterdam, Rotterdam; A. Ott, afdeling Medische Microbiologie, Laboratorium voor Infectieziekten, Groningen; J.W.A. Rossen, A.W. Friedrich, afdeling Medische Microbiologie, RUG, Universitair Medisch Centrum Groningen, Groningen.
Correspondentieadres: A.M.D. Kooistra-Smid, afdeling Medische Microbiologie, afdeling Research & Development, Laboratorium voor Infectieziekten, Groningen; afdeling Medische Microbiologie, RUG, Universitair Medisch Centrum Groningen, e-mail: m.kooistra@infectielab.nl.

mogelijk in het geding is. Met het STEC-ID-net onderzoek worden deze in kaart gebracht.

De variabiliteit in de diagnostische methodes door MML's en de wisselende respons op STEC-meldingen door verschillende GGD'en vragen om een optimalisatie van de STEC-diagnostiek en surveillance.⁵ De Duitse STEC-O104-uitbraak in 2011 heeft geïllustreerd dat diagnostiek die alleen is gericht op type O157 onvoldoende is, terwijl de huidige PCR's (gericht op alle STEC-serotypen) onvoldoende specifiek zijn voor klinische en openbare gezondheidszorg (OGZ). De afgelopen twee jaar is een initiatief opgestart om de STEC-diagnostiek te optimaliseren.⁶ Tijdens de NVMM Voorjaarsvergadering in 2012 werd een voorstel gepresenteerd voor een gefaseerde diagnostische benadering voor de detectie van STEC en HUSEC gebaseerd op Friedrich *et al.*^{7,8} Volgens dit algoritme zullen alle MML's zich richten op de detectie van *stx*-genen in het directe patiëntenmateriaal en/of na verrijking in een ophopingsmedium. Een regionaal MML zal vervolgens isolatie van de stam en detectie van het *stx1*- en/of *stx2*-gen verrichten. Naast een moleculaire genoserotypering zal getest worden op de aanwezigheid van virulentiegenen om een mogelijke EHEC, HUSEC of andere enteropathogene *E. coli* aan te kunnen tonen. Gespecialiseerde laboratoria met expertise op het gebied van STEC/HUSEC zullen zich richten op de fenotypering en moleculaire subtypering van het isolaat ten behoeve van risico-inschatting, epidemiologische studies en surveil-

lance. Deze stapsgewijze benadering voor de detectie van STEC en HUSEC is weergegeven in *tabel 1*.

Pilotfase

Ter voorbereiding op deze benadering werd op het Laboratorium voor Infectieziekten (LVI, Groningen) in 2012 een single-center pilotstudie verricht waarin prospectief fecesmonsters van ruim 5000 patiënten met een verdenking op infectieuze gastro-enteritis zijn verwerkt volgens een STEC-diagnostisch screeningsalgoritme. Na moleculaire detectie van *stx*-genen in het oorspronkelijke materiaal en na verrijking in een aankweekmedium (BRILA bouillon) werden aanvullende PCR-testen ingezet voor detectie van de meest voorkomende virulente serotypen en relevante virulentiegenen. Na moleculaire detectie van *stx*-genen werd een kweek ingezet op SMAC-agar (specifieke detectie STEC O157) en CHROMagar STEC (specifieke detectie STEC O157 en STEC non-O157) vanuit het oorspronkelijke materiaal én vanuit het aankweekmedium. Verdachte isolaten werden naar het Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu (RIVM) en het Universitair Medisch Centrum Groningen (UMCG) gestuurd voor verdere karakterisering met behulp van sero- en genotypering en DNA-microarray-analyse. De resultaten uit deze studie tonen het discriminerend vermogen en de snelheid van het diagnostisch algoritme aan: virulente STEC-stammen die waren gerelateerd aan uitbraken en HUS werden snel (< 48 uur) onderscheiden

Tabel 1. Markergenen ten behoeve van gefaseerde STEC-diagnostiek; gebaseerd op figuur uit Friedrich *et al.*⁷

Nr.	MML			Regionaal MML	Gespecialiseerde laboratoria			Voorlopig resultaat
	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>escV</i>	O-serogroepspecifieke markers (bijvoorbeeld <i>rfb</i> 0157, 026, 0111, 0145, 0103, 091, 0104, 0121)	<i>sfpA</i>	<i>bfpA</i>	EAEC-specifiek gen (bijv. <i>aggR/aat</i>)	
1	+/-	+/-	+					EHEC-verdenking
2	+/-	+/-	-					Non-0157-STEC-verdenking
3	-	+	-					Non-0157-STEC- of EHEC 0104:H4-verdenking
4	-	-	+					EPEC-verdenking
5	+/-	+	+	+				EHEC 0157 of andere EHEC-serotype (bijv. 026, 091, 0103, 0104, 0111, 0145)
6	-	+	+	+(0157)	+	-	-	EHEC 0157:HNM
7	+/-	+	+	+(0157)	-	-	-	EHEC 0157:H7
8	+/-	+/-	+	+(anders dan 0157)	-	-	-	Klassieke non-0157 EHEC
9	-	+	-	+(104)	-	-	+	EHEC 0104:H4
10	-	-	+	-	-	-	-	Atypische EPEC (aEPEC)
11	-	-	+	-	-	+	-	Typische EPEC
12	-	-	-	-	-	-	+	EAEC
13	-	-	+	+	-	-	-	EPEC 0157
14	-	-	-	+	-	-	-	<i>E. coli</i> 0157 non-STEC

van minder virulente STEC-stammen. Hierbij werd gebruikgemaakt van de seropathotype-classificatie volgens Karmali *et al.*⁹ Karmali classificeerde STEC in vijf seropathotype (SPT) -groepen (A tot en met E), waarbij groep A een hoog en groep D en E een laag OGZ-risico vormen. Daarnaast werd de *stx*-subtypering volgens Friedrich *et al.*¹⁰ verricht waarmee subtypes *stx* 1c, 1d, *stx* 2c, 2d, 2e, en 2f met PCR werden gedetecteerd.

Het algoritme omvat ook de groei van *stx*-genen bevattende bacteriën en confirmatie van het PCR-resultaat op het oorspronkelijke materiaal. De CHROMagar-STECC maakt identificatie van STEC non-O157 goed mogelijk.¹¹

Vervolgonderzoek

De resultaten uit de pilotstudie dienen als basis voor een vervolgstudie waarin zal worden onderzocht of het mogelijk is om bij een aangetoonde STEC-besmetting met aanvullende conventionele en moleculaire testen een betere risico-inschatting te maken voor de patiënt en de openbare gezondheidszorg. Het onderzoek is begin april 2013 van start gegaan onder de naam STEC-ID-net en zal ongeveer een jaar in beslag nemen. De verwachting is dat naar schatting 25.000 patiënten zullen worden geïncludeerd.

In deze prospectieve cohortstudie wordt de expertise van het Lvl, het UMCG, het STAR-mdc (Rotterdam), het RIVM en de GGD Drenthe, GGD Groningen en GGD Rotterdam-Rijnmond gebundeld in een interregionale samenwerking. Op het Lvl en het STAR-mdc wordt het diagnostisch algoritme op fecesmonsters van patiënten met verdenking op infectieuze gastro-enteritis toegepast. Na moleculaire detectie van *stx*1, *stx*2 en/of *escV* en na verrijking in BRILA-

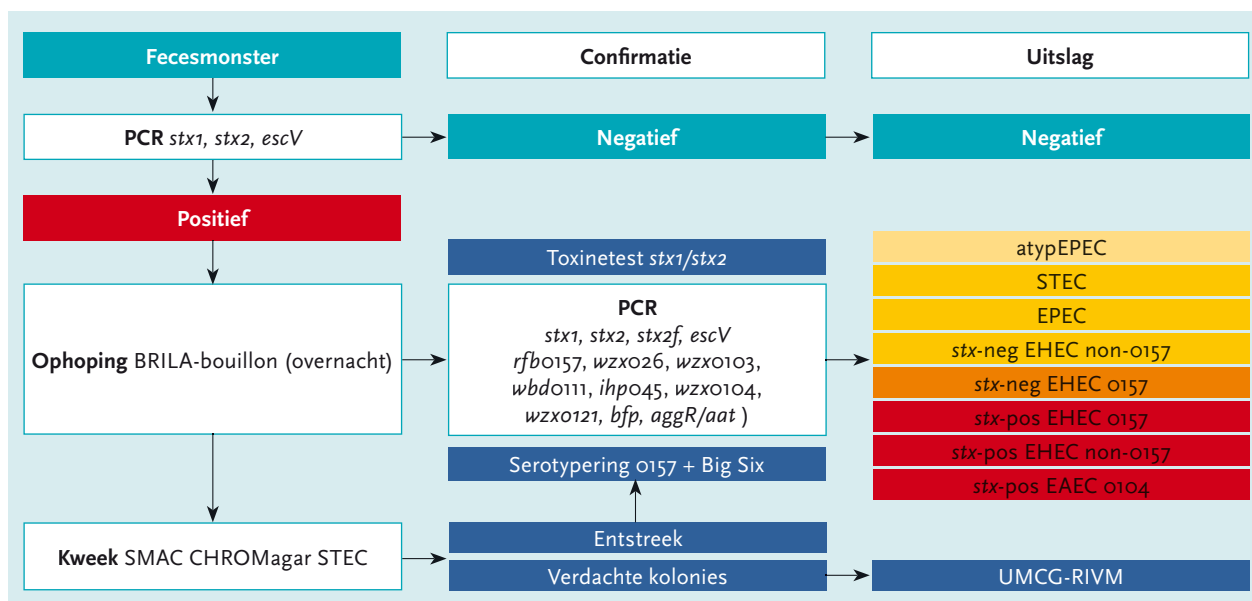
bouillon zal de moleculaire genoserotypering op serotypen rfbO157, wzxO26, wzxO103, wbdO111, ihpO145, wzxO104, wzxO121 en detectie van relevante virulentiegenen (*bfpA*, *aggR/aat*) worden verricht, gebruikmakend van de PCR (tabel 1). Ten slotte zal er bij groei op het SMAC-agar en/of CHROMagar-STECC-medium van verdachte kolonies een serotypering van *E. coli* O157 en de zogeheten Big Six serotypes worden ingezet. In het geval van *stx*-positieve monsters wordt tevens een toxinetest (immunoassay) uitgevoerd (figuur 1).

Op het UMCG vindt verificatie van het resultaat van het diagnostisch algoritme plaats van alle monsters die op het Lvl positief zijn voor *stx*1, *stx*2 en/of *escV* (circa 10% van de monsters) en 20% van de negatieve monsters. Direct na ontvangst op het UMCG zullen de monsters gedurende zes uur worden verrijkt in LB-bouillon. Na afenting op een McConkey-agar en overnachtingincubatie zal de cultuur worden getest met de PCR *stx*1, *stx*2 en *escV* (figuur 2).

Verdere moleculaire karakterisering waaronder een moleculaire subtypering van de *stx*-genen wordt verricht op alle STEC-isolaten. Met de *stx*-subtypering is het mogelijk om onafhankelijk van serotypering de virulentie van de stam vast te stellen. De Duitse STEC O104 was bijvoorbeeld tot op dat moment niet geassocieerd met uitbraken maar beschikte wel over het *stx*2-gen. Ten slotte zal worden onderzocht op welke wijze DNA-micro-arraymethoden kunnen worden ingezet voor een snelle detectie van virulentie- en resistentiegenen en O:H-serotypering en *stx*-subtypering.

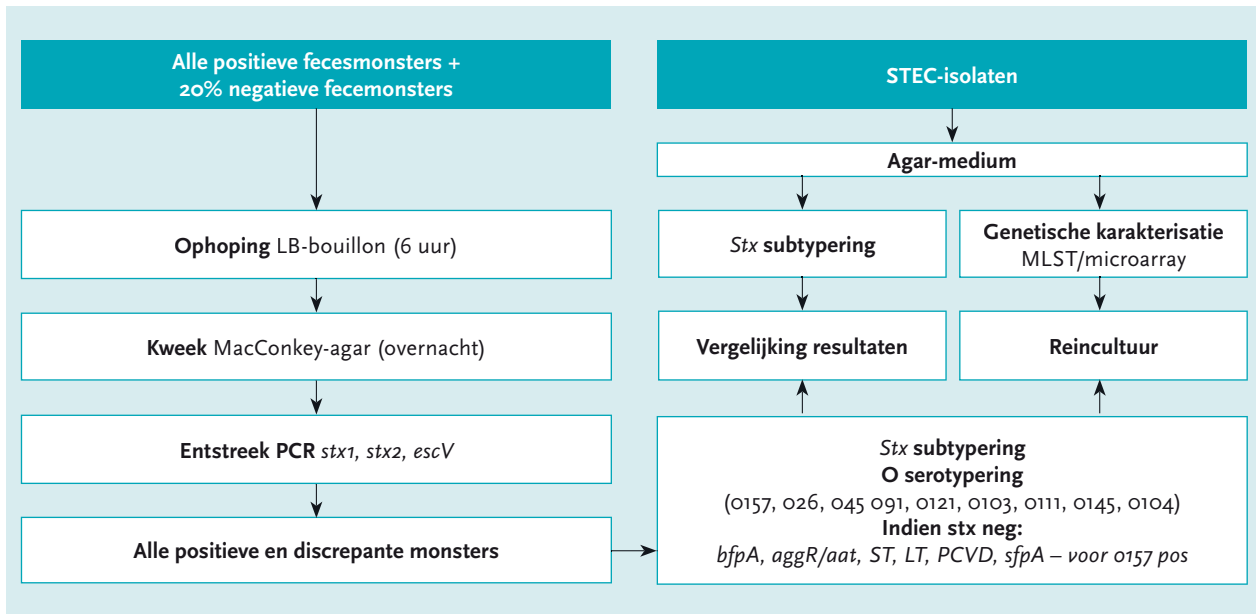
Naast het uitgebreide laboratoriumonderzoek zullen de GGD'en in de betrokken regio's vragenlijsten afnemen bij

Figuur 1. Schema diagnostisch screeningsalgoritme (Lvl en STAR-mdc)



Figuur afgeleid van Friedrich *et al.* JCM. 2004;42:4697-701.

Figuur 2. Schema verificatie diagnostisch algoritme en subtypering *stx*-genen (UMCG)



alle patiënten van wie de feces *stx*-genen bevat en bij een deel van de patiënten van wie de feces *escV* bevat (maar geen *stx*). Klinische gegevens en mogelijke risicofactoren zullen worden verzameld. Op het RIVM zal een serogentypering worden verricht op alle STEC-isolaten, zoals ook voor de landelijke surveillance gebeurt. Het studieprotocol STEC-ID-net is tijdens de NVMM Voorjaarsvergadering 2013 gepresenteerd.^{1,2}

Openbare gezondheid

Na analyse van de resultaten van de STEC-ID-net studie zullen aanbevelingen worden geformuleerd voor diagnostiek, meldingsplicht en surveillance van STEC en EHEC. Door de bundeling van expertise, het gebruiken van epidemiologische gegevens en het inzetten van zowel kweek als moleculaire laboratoriumtechnieken in deze studie, zullen de uitkomsten naar verwachting leiden tot een betere risico-inschatting en prognose van het ziekteverloop en daarnaast ondersteuning bieden bij het nemen van adequate maatregelen om het risico voor de openbare gezondheidszorg zo veel mogelijk te beperken.

Vragen en opmerkingen

Bij vragen of opmerkingen over deze studie of over STEC kunt u contact opnemen met één van de onderzoekers van de deelnemende instellingen. Informatie over deze studie kan ook verkregen worden via stec-info@rug.nl.

Naar verwachting zullen er workshops en nascholingen worden verzorgd voor verschillende doelgroepen zoals artsen-microbioloog, MMM'ers, GGD-artsen en huisartsen. Deze studie wordt gefinancierd door de deelnemende instellingen en EurSafety Health-net.

Referenties

- van Duynhoven YT, Friesema IH, Schuurman T, Roovers A, van Zwet AA, Sabbe LJ, et al. Prevalence, characterisation and clinical profiles of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in The Netherlands. *Clin Microbiol Infect.* 2008;14:437-45.
- Friesema IH, van der Zwaluw WK, Biesta-Peters EG, Kuiling S, van Pelt W. Surveillance van STEC in Nederland, 2011. *Infect Bull.* 2013;24(3):79-83.
- www.rivm.nl/Bibliotheek/Professioneel_Praktisch/Richtlijnen/Infectieziekten/LCI_richtlijnen/LCI_richtlijn_Shigatoxineproducerende_E_coli_STEC_infectie.
- de Boer RF, Ott A, Kesztyüs B, Kooistra-Smid AM. Improved detection of five major gastrointestinal pathogens by use of a molecular screening approach. *J Clin Microbiol.* 2010;48:4140-6.
- Lede IO, Kraaij-Dirkzwager MM, van den Kerkhof JHTC, Notermans DW. Namens de Werkgroep STEC meldplicht, diagnostiek en surveillance. Gebrek aan uniformiteit bij meldingen van Shigatoxineproducerende *Escherichia coli* en *Shigella* aan en door GGD-en. *Infect Bull.* 2012;23(4):116-8.
- From STEC to HUSEC – EHEC yesterday and today. Friedrich AW. *NTMM* 2012;20:S17.
- Friedrich AW, Nierhoff KV, Bielaszewska M, Mellmann A, Karch H. Phylogeny, clinical associations, and diagnostic utility of the pilin subunit gene (*sfpA*) of sorbitol-fermenting, enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H-. *J Clin Microbiol.* 2004;42:4697-701.
- Müthing J, Schweppe CH, Karch H, Friedrich AW. Shiga toxins, glycosphingolipid diversity, and endothelial cell injury. *Thromb Haemost.* Review. 2009;101:252-64.
- Karmali MA, Mascarenhas M, Shen S, Ziebell K, Johnson S, Reid-Smith R, et al. Association of genomic O island 122 of *Escherichia coli* EDL 933 with verocytotoxin-producing *Escherichia coli* seropathotypes that are linked to epidemic and/or serious disease. *J Clin Microbiol.* 2003;41:4930-40.
- Friedrich AW, Bielaszewska M, Zhang WL, Pulz M, Kuczus T, Ammon A, et al. *Escherichia coli* harboring Shiga toxin 2 gene variants: frequency and association with clinical symptoms. *J Infect Dis.* 2002;185:74-84.
- de Boer RF, A. Ott, Scheper HR, Wisselink GJ, Rossen JWA, Heck ME, et al. A diagnostic screening algorithm to assess the public health risk of STEC. Poster session presented at Scientific Spring Meeting KNVM & NVMM; 2013 Arnhem, The Netherlands.
- Kooistra-Smid AMD, de Boer RF, Rossen JWA, Ott A, Friedrich AW. STEC-ID-net. A feasibility study for a new STEC diagnostic strategy. Oral presentation at Scientific Spring Meeting KNVM & NVMM; 2013 Arnhem, The Netherlands.