

VACCINATIE VAN RUNDEREN TEGEN SHIGATOXIGENE ESCHERICHIA COLI

Aantal woorden: 10 971

Anneleen Mertens

Studentennummer: 01306296

Promotor: Prof. Dr. Eric Cox

Begeleider: Engelen Frederik

Onderdeel van de Masterproef voorgelegd voor het behalen van de graad master in de diergeneeskunde

Academiejaar: 2018 – 2019

Universiteit Gent, haar werknemers of studenten bieden geen enkele garantie met betrekking tot de juistheid of volledigheid van de gegevens vervat in deze masterproef, noch dat de inhoud van deze masterproef geen inbreuk uitmaakt op of aanleiding kan geven tot inbreuken op de rechten van derden.

Universiteit Gent, haar werknemers of studenten aanvaarden geen aansprakelijkheid of verantwoordelijkheid voor enig gebruik dat door iemand anders wordt gemaakt van de inhoud van de masterproef, noch voor enig vertrouwen dat wordt gesteld in een advies of informatie vervat in de masterproef.

Voorwoord

Het onderzoeksgedeelte van mijn masterproef heb ik uitgevoerd in het laboratorium Immunologie van de Universiteit Gent campus Diergeneeskunde in Merelbeke. Hiervoor wil ik graag mijn promotor Prof. Dr. Eric Cox bedanken die zijn labo open stelde voor mij waardoor ik kennis kon maken met de discipline onderzoek. Ik wil hem ook bedanken voor de begeleiding en de snelle respons op mijn e-mails.

Naast het leren van onderzoekstechnieken, zal mij vooral bijblijven dat onderzoek niet altijd loopt zoals gepland. Het vergt geduld en doorzetting. Mijn grootste dank gaat dan ook uit naar mijn begeleider Engelen Frederik. Dank u wel om, steeds met een lach, mijn fouten te helpen recht zetten, mijn vragen te beantwoorden en mijn masterproef te verbeteren. Ik wens je nog veel succes met je doctoraat!

Verder wil ik nog de volledige vakgroep Immunologie bedanken omdat iedereen bereid was mij te helpen mijn weg te vinden in het labo.

Inhoudsopgave

Lijst met afkortingen	5
Samenvatting	6
1 Literatuurstudie	7
1.1 Inleiding	7
1.2 Virulentiefactoren	9
1.2.1 A/E mechanisme	9
1.2.2 Shigatoxines	10
1.3 EHEC bij de mens	11
1.4 EHEC bij het rund	13
1.5 Transmissie	15
1.6 Vaccins	16
1.6.1 Inleiding	16
1.6.2 Type drie secretiesysteem (T3SS) vaccins	17
1.6.3 “Siderophore receptor and porin protein” (SRP) vaccins	18
2 Probleemstelling	19
3 Doelstellingen	19
4 Materiaal en methoden	20
4.1 Isolatie van O26 stammen op Vlaamse rundveebedrijven	20
4.2 Bekomen van O26 stammen negatief voor het <i>stx1</i> - en <i>stx2</i> -gen	26
4.2.1 Spontaan verlies van <i>stx</i> -gen door herhaaldelijk overplaten op PCA-platen	26
4.2.2 Spontaan verlies van <i>stx</i> -gen door verdunningen op SMAC-platen	26
5 Resultaten	27
5.1 Spontaan verlies van <i>stx</i> -gen door herhaaldelijk overplaten op PCA-platen	27
5.2 Spontaan verlies van <i>stx</i> -gen door verdunningen op SMAC-platen	29
6 Discussie	33
6.1 Antibiotica resistentie	33
6.2 vaccinatieschema’s	34
7 Literatuurlijst	36

Lijst met afkortingen

AEEC	Attaching and Effacing <i>E. coli</i>
Brila broth	Brillant green bile lactose broth
CT-SMAC agar	Cefixime en Tellurite – Sorbitol MacConkey Agar
DAEC	Diffuus-Adhererende <i>E. coli</i>
EAEC/EAggEC	Enteroaggregatieve <i>E. coli</i>
EAF	EPEC Adherence Factor
EHEC	Enterohemorragische <i>E. coli</i>
EIEC	Enteroinvasieve <i>E. coli</i>
EPEC	Enteropathogene <i>E. coli</i>
EspA, B, D	<i>E. coli</i> secreted protein A, B, D
EspFu	<i>E. coli</i> secreted protein F-like from profage U
Gb3/CD77	Glycosfingolipide globotriaosylceramide
HUS	Hemolytisch-Uremisch Syndroom
IRSp53	Insuline Receptor tyrosine kinase Substraat p53
LEE	Locus of Enterocyte Effacement
LPS	Lipopolysaccharide
MRD	Maximum Recovery Diluent
N-WASP	Neural-Wiskott Aldrich Syndrome Protein
PCA	Plate Count Agar
PBS	Phosphate Buffered Saline
SMAC-agar	Sorbitol MacConkey agar
SRP	Siderophore Receptor and Porin protein
STEC/VTEC	Shigatoxine/Verotoxine producerende <i>E. coli</i>
Stx/VT	Shigatoxine/Verotoxines/Verocytotoxines
TAE	Tris-Acetaat Ethyleendiaminetetra-azijnzuur
Tccp	Tir cytoskeleton coupling protein
Tir	Translocated intimin receptor
TMA	Thrombotische Microangiopathie
TSB	Tryptone Soya Broth
T3SS	Type 3 Secretiesysteem
UP	Ultra-Puur water

Samenvatting

Escherichia coli zijn micro-organismen die deel uitmaken van de gezonde darmflora van de meeste warmbloedige dieren, inclusief de mens. *E. coli* zijn echter niet altijd onschadelijk, zo worden de diarree-verwekkende *E. coli*'s ingedeeld in 6 pathotypes, waaronder de shigatoxine-producerende *E. coli* (STEC). Een belangrijke subgroep van STEC, zijn de enterohemorragische *E. coli* (EHEC). Zij bezitten niet alleen de genen die coderen voor shigatoxines, maar ook de genen die zorgen voor het "attaching and effacing" mechanisme. EHEC worden verder opgedeeld in 2 groepen, het O157:H7 serotype en de non-O157 serotypes. Een EHEC infectie bij volwassen runderen verloopt meestal asymptomatisch, maar bepaalde non-O157 serotypes kunnen wel diarree veroorzaken bij jonge kalveren. Runderen kunnen lange tijd drager zijn van EHEC en vormen zo de grootste bron van infectie bij de mens. De overdracht ontstaat meestal ten gevolge van fecale contaminatie van karkassen tijdens het slachten of versnijden, gevolgd door consumptie van onvoldoende verhit vlees. Tevens het drinken van gecontamineerd water of het consumeren van rauwe groenten die in contact kwamen met dit water zijn voorbeelden van hoe de kiem van rund naar mens kan overgaan. Bij de mens is het voornamelijk serotype O157:H7 dat in staat is om hemorragische colitis met eventueel het hemolytisch-uremisch syndroom (HUS) te veroorzaken.

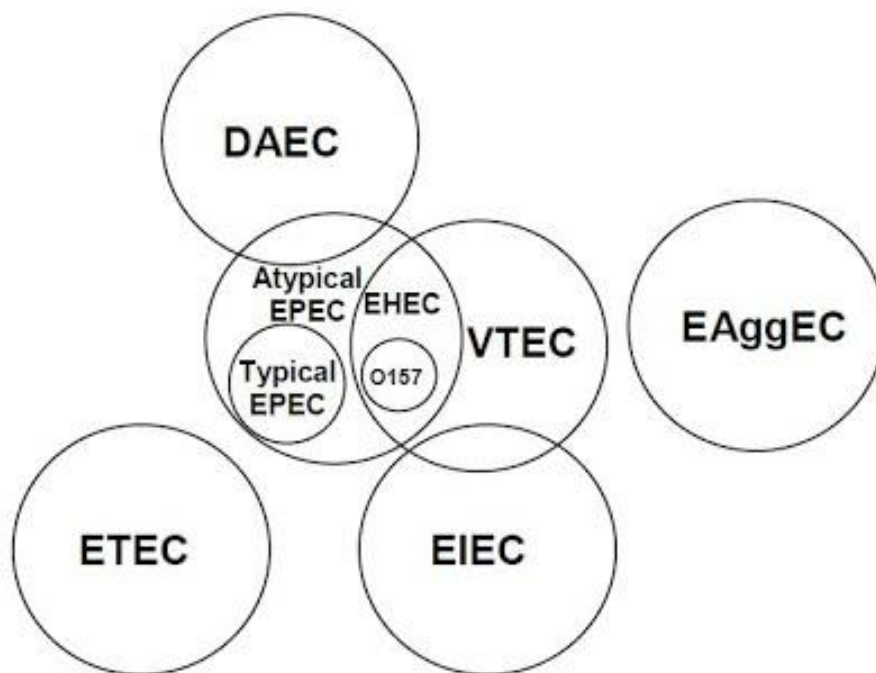
De behandeling van een EHEC infectie bij de mens is tot op de dag van vandaag enkel symptomatisch. Men heeft getracht om op verschillende aspecten van de pathogenese in te grijpen maar voorlopig zijn er weinig effectieve geneesmiddelen op de markt. Daarom wordt er nu gezocht naar manieren om de aanwezigheid van EHEC bij runderen te verminderen. Vaccinatie is een veelbelovende strategie om dit te realiseren. In het verleden is namelijk gebleken dat O157-vaccinatie bij runderen effectief kan zijn.

In deze masterproef werd een deel van het voorbereidend werk gedaan van een vaccinatiestudie in kalveren. In de vaccinatiestudie zal worden nagegaan of O157-vaccins ook de prevalentie en excretie van non-O157 *E.coli*'s significant kunnen doen dalen. Indien er sprake is van kruisbescherming tegen non-O157 serotypes zou dit een extra stimulans zijn voor de veeteelt industrie en de overheid om op grotere schaal dieren te vaccineren, om zo de voedselveiligheid te verhogen. De focus van de vaccinatiestudie zal liggen op O26 daar dit de tweede meest voorkomende EHEC zijn. In deze voorstudie werd getracht om EHEC O26 stammen te isoleren, die negatief zijn voor het *stx1*- en *stx2*-gen. Uiteindelijk zullen, in de vaccinatiestudie, kalveren chronisch worden geïnfecteerd met deze stam waarna de werking van 2 bestaande O157-vaccins tegenover O26 zal worden nagegaan.

1 Literatuurstudie

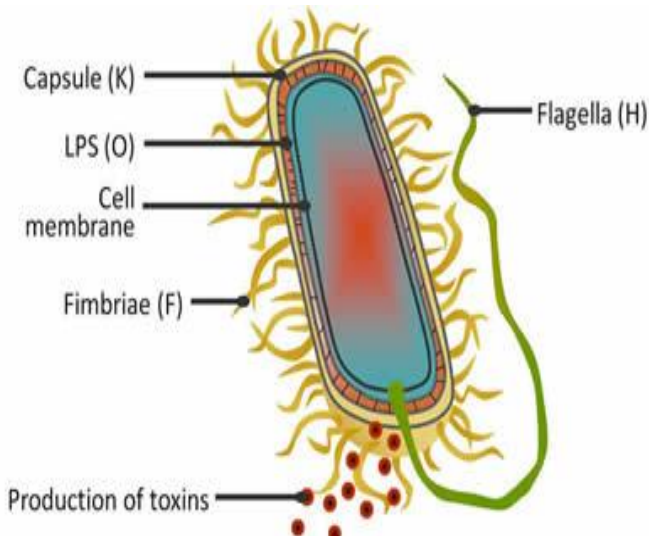
1.1 Inleiding

Escherichia coli (*E. coli*) zijn staafvormige, gram-negatieve, facultatief aërobe bacteriën, behorend tot de familie van de Enterobacteriaceae. Ze zijn obligaat symbiotisch, facultatief pathogeen en kunnen terug gevonden worden in het gastro-intestinaal stelsel van gezonde warmbloedige dieren, inclusief de mens (Lim et al., 2010; Wasteson, 2002). De aanwezigheid van niet-pathogene *E. coli* in de darm is gunstig omdat *E. coli* onder meer vitamine B12 en K2 kunnen produceren die vervolgens door de gastheer kunnen worden opgenomen (Conly et al., 1994; Fang et al., 2017). Tevens gaan ze in competitie voor nutriënten waardoor ze de kolonisatie van schadelijke bacteriën helpen verhinderen (Conway en Cohen, 2015). *E. coli* stellen ook enterobactine vrij, dit is een siderofoor-receptor waarmee zowel de bacteriën als de gastheercellen ijzer kunnen opnemen (Qi en Han, 2018). *E. coli* zijn echter niet altijd onschadelijk, zo worden de diarree-verwekkende *E. coli*'s ingedeeld in 6 pathotypes op basis van hun virulentiefactoren en het klinische beeld die zij veroorzaken (zie figuur 1): enteropathogene *E. coli* (EPEC), enteroinvasieve *E. coli* (EIEC), enterotoxigene *E. coli* (ETEC), enteroaggregatieve *E. coli* (EAEC of EAggEC), diffuus-adhererende *E. coli* (DAEC) en verotoxine of shigatoxine producerende *E. coli* (VTEC of STEC) (Franz, 2009).



Figuur 1: Relaties tussen de verschillende diarree-verwekkende *E. coli*'s. (Uit: Donnenberg, 2002)

Verder worden ze geclassificeerd in serotypes volgens hun belangrijkste externe antigenen: het somatische (O), het kapsel (K), het fimbriae (F) en het flagellair (H) antigen. Het O-antigen is een onderdeel van de lipopolysaccharide (LPS) laag die de buitenste membraan vormt van de bacterie. Het H-antigen maakt deel uit van de flagel waarmee de bacterie zich voort beweegt (zie figuur 2)¹.



Figuur 2: Classificatie in serotypes op basis van externe antigenen (Uit: The Reference Laboratory for *Escherichia coli*.)

Shigatoxine-producerende *E. coli* (STEC) produceren exotoxines (Stx) die gelijk zijn op het toxine geproduceerd door *Shigella dysenteriae*. Een andere benaming voor deze toxines is verotoxines of verocytotoxines (VT) daar ze toxisch zijn voor verocellen, epitheelcellen uit de nieren van de Afrikaanse groene aap (Franz, 2009).

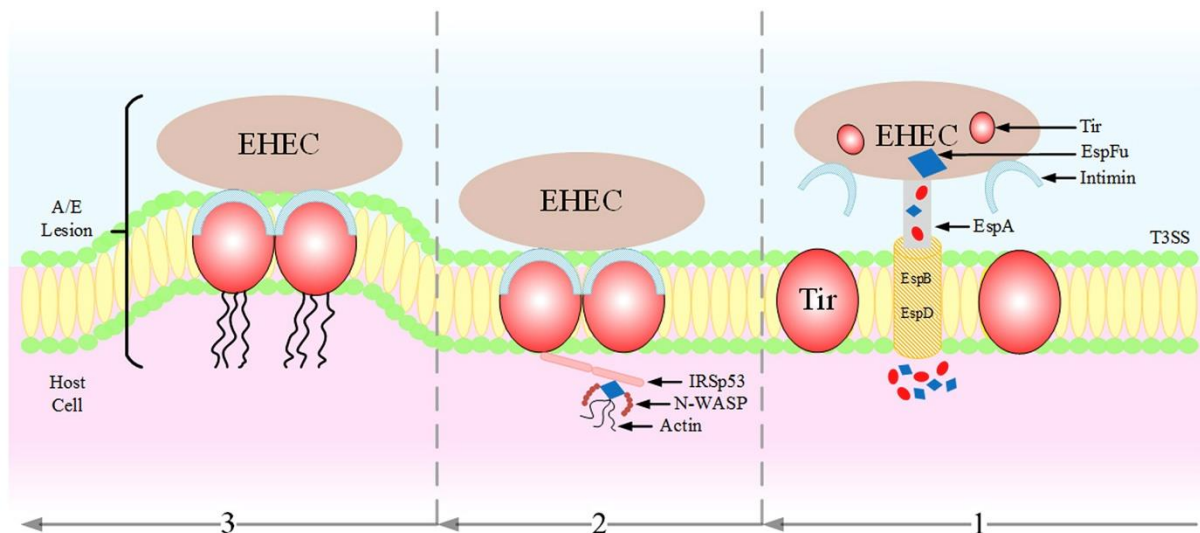
Een belangrijke subgroep van STEC zijn de enterohemorragische *E. coli* (EHEC). Zij bezitten niet alleen de genen die coderen voor Stx, maar ook de genen die zorgen voor het “attaching and effacing” mechanisme. Naast EHEC behoren ook enteropathogene *E. coli* (EPEC) tot de “attaching and effacing” *E. coli* (AEEC), met als verschil dat EPEC niet in staat zijn om exotoxines te produceren (Moxley en Smith, 2010). De vijf voornaamste EHEC serogroepen zijn O26, O103, O111, O145 en O157 en worden aangeduid als de “gang of five” (Bardiau et al., 2010). Voor EHEC O157 bestaat er een universeel gebruikte detectiemethode, terwijl dit niet het geval is voor non-O157 EHEC (Van Damme et al., 2015). Meestal zijn het EHEC O157:H7 die een hemorragische colitis met eventueel het hemolytisch-uremisch syndroom (HUS) kunnen veroorzaken bij de mens. Runderen vormen het belangrijkste reservoir voor EHEC O157:H7 infecties bij de mens, voornamelijk via consumptie van fecaal besmette levensmiddelen. Bij runderen zelf verloopt een infectie met EHEC O157:H7 meestal asymptomatisch. De non-O157 *E. coli*'s (oa. O5, O26, O111, O118 en O145) kunnen wel een mucoïdebloederige diarree veroorzaken bij kalveren van gemiddeld 1-5 weken oud (Moxley en Smith, 2010).

¹ The Reference Laboratory for *Escherichia coli* (2004). <http://www.ecl-lab.com/en/ecoli/index.asp> (laatst geconsulteerd op 17 mei 2019)

1.2 Virulentiefactoren

1.2.1 A/E mechanisme

Na de initiële vasthechting van EHEC aan de enterocyten met behulp van flagellen zal de expressie van de flagellen afnemen en deze van het type drie secretiesysteem (T3SS) toenemen. Het type drie secretiesysteem is een virulentiemechanisme dat vele gram-negatieve bacteriën bezitten. Het stelt de bacteriën in staat om effector proteïnes in de gastheercel te injecteren en zodoende het extracellulaire milieu te vermijden. De geïnjecteerde effector proteïnes bootsen vervolgens liganden en receptoren na van de gastheercel die zorgen voor een herschikking van het cytoskelet van de enterocyt. EHEC zal hiervoor eerst met het filamenteus eiwit EspA (“*E. coli* secreted protein”) de gastheercel penetreren, waarna EspB en EspD worden geïnjecteerd. Deze transmembranaire eiwitten vormen vervolgens poriën waarlangs de overige eiwitten, zoals de “translocated intimin receptor” (Tir), het cytoplasma van de cel kunnen bereiken (M. A. Joris et al., 2013a). Tir incorporeert zich in de celmembraan van de gastheercel en zal vervolgens dienst doen als receptor voor intimine, dat een adhesine is van de bacterie. Zo ontstaat er een intens contact tussen de bacterie en de gastheercel waarbij lokaal de microvilli verdwijnen (“effacing”). De microvilli verdwijnen doordat de interactie Tir-intimine zorgt voor het rekruteren van IRSp53 (“insuline receptor tyrosine kinase substraat p53”), dat op zijn beurt EspFu (“*E. coli* secreted protein F-like from profage U”), ook wel Tccp (“Tir cytoskeleton coupling protein”) genoemd, rekruteert. Deze zal dan N-WASP (“Neural Wiskott Aldrich syndrome protein”) activeren waardoor actine gaat polymeriseren. Hierdoor wordt uiteindelijk de celmembraan naar buiten geduwd en ontstaat er een voetstuk of pedestal waarop de bacterie vast zit. Het is dit geheel die men het “attaching and effacing” mechanisme noemt (zie figuur 3). De genen die coderen voor het type 3 secretiesysteem, de effector proteïnes (Esp’s), het intimine en Tir zijn gelokaliseerd op een pathogeniciteitseiland dat de “locus of enterocyte effacement” (LEE) wordt genoemd (Saeedi et al., 2017).

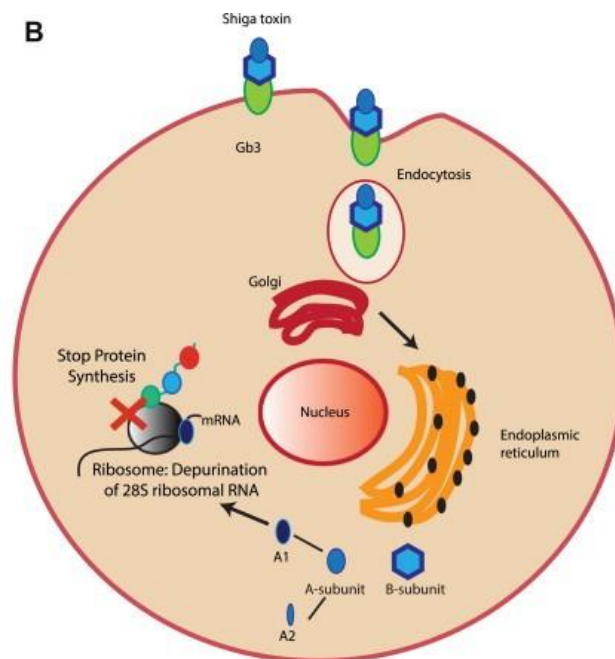


Figuur 3: Het “attaching and effacing” mechanisme (Uit: Saeedi et al., 2017).

1.2.2 Shigatoxines

Na de vasthechting aan de enterocyten produceren EHEC shigatoxines. De shigatoxines worden onderverdeeld in twee groepen, namelijk Stx1 en Stx2. Voor Stx1 bestaan er drie subtypes (Stx1a, Stx1c en Stx1d) en voor Stx2 zijn er zeven subtypes (Stx2a, Stx2b, Stx2c, Stx2d, Stx2e, Stx2f, Stx2g)(Scheutz et al., 2012). De EHEC stammen die diarree veroorzaken bij het kalf produceren bijna altijd Stx1 terwijl de stammen die ziekte veroorzaken bij de mens vaker Stx2 produceren (Alperi en Figueras, 2010; Bunger et al., 2015).

Het shigatoxine bestaat uit één A-subeenheid en vijf B-subeenheden. De A-subeenheid is opgebouwd uit een A1- en een A2-fragment die met elkaar verbonden zijn via een enkelvoudige disulfidebrug. De vijf B-subeenheden vormen een pentameer onder de vorm van een ring die op zijn beurt niet-covalent gebonden is met de A-subeenheid. Het is via de B-subeenheden dat Stx bindt aan zijn receptor Gb3 (glycosfingolipide globotriaosylceramide, CD77) van de gastheer cel (Orth et al., 2009). Na binding wordt de A-subeenheid opgenomen in de cel via clathrine-afhankelijke endocytose. In het endoplasmatisch reticulum wordt dan door furine, dat een membraan verankerd protease is, de A-subeenheid gesplitst waardoor het A1-fragment geactiveerd wordt. Het geactiveerde A1-fragment is een N-glycosidase dat het 28S rRNA depurineert door bepaalde adenines af te knippen. Hierdoor wordt de eiwitsynthese verstoord en volgt er een ribotoxische stressreactie die leidt tot het vrijstellen van cytokines waardoor er finaal apoptose van de gastheer cel plaatsvindt (zie figuur 4)² (Saeedi et al., 2017). De genen die coderen voor de shigatoxines zijn gelegen in het DNA van een bacteriofaag dat geïntegreerd zit in het bacteriële genoom. Bacteriofagen zijn mobiele elementen die door andere bacteriën kunnen worden opgenomen (Franz, 2009).



Figuur 4: Werking van het shigatoxine in de cel (Uit: Oncohemakey, 2017).

² Oncohemakey Fastest Oncology & Hematology Insight Engine (2017). Shiga Toxin Associated Hemolytic Uremic Syndrome. <https://oncohemakey.com/shiga-toxin-associated-hemolytic-uremic-syndrome-2/> (laatst geconsulteerd op 12 maart 2019)

1.3 EHEC bij de mens

1.3.1 Pathogenese

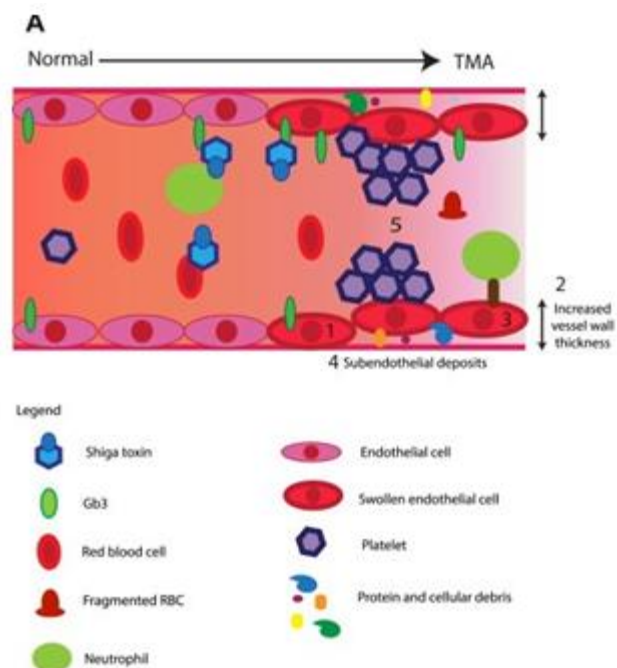
Hemorrhagische colitis

Na orale opname koloniseren EHEC het colon (Miyamoto et al., 2006). Hiervoor moeten zij eerst de maag passeren die bij de mens een pH van 1.35-3.5 heeft. Bergholz en Whittam (2007) toonden aan dat EHEC O157:H7 superieur is in het overleven bij een pH die overeenkomt met de zure pH in de maag. Dit zou een reden kunnen zijn waarom EHEC O157:H7 een lage infectiedosis kent (<100 Cfu). In het algemeen kan men dus stellen dat EHEC zuurresistent zijn en passage doorheen de maag weinig problemen vormt. Na passage doorheen de maag hechten EHEC zich vast aan het epitheel van de darmen via hun A/E mechanisme en produceren ze shigatoxines waardoor de epitheelcellen in apoptose gaan. De shigatoxines binden vervolgens aan de Gb3 receptoren van de endotheelcellen van de intestinale bloedvaten. De endotheelcellen beginnen te zwellen en komen los van de basaalmembraan met als gevolg dat er hemorrhagische colitis (bloederige diarree) ontstaat. In zeldzame gevallen komen de shigatoxines uiteindelijk in de systemische circulatie terecht waardoor ze aanleiding kunnen geven tot HUS. Bij de mens zouden granulocyten een rol spelen in het transporteren van Stx in de bloedbaan (Menge et al., 2006).

Hemolytisch-uremisch syndroom (HUS)

HUS is een acute, thrombotische microangiopathie (TMA) die leidt tot acute intravasculaire hemolyse, thrombocytopenie en beschadiging van organen met eindcirculatie (zie figuur 5)(Kremer Hovinga et al., 2018).

Shigatoxines zijn in staat een prothrombotische toestand op te wekken door de expressie van tissue factor (thromboplastine) op epitheelcellen en/of door bloedplaatjes te activeren. Vermits Stx ook schade veroorzaakt aan het endotheel zal uiteindelijk de stollingscascade in gang gezet worden en treedt vorming van microthrombi op die de bloedvaten zullen vernauwen. Erythrocyten fragmenteren bij passage doorheen deze vernauwde bloedvaten waardoor intravasculaire hemolyse en dus hemolytische anemie op treedt. De aanwezigheid van schistocyten, dit zijn fragmenten van erythrocyten, op een bloeduitstrijkje zijn een indicatie voor microangiopathische hemolyse. De thrombocytopenie ontstaat doordat de thrombocyten verbruikt worden bij de vorming van de microthrombi (zie afbeelding 5)² (Kremer Hovinga et al., 2018).



Figuur 5: Thrombotische microangiopathie (TMA) veroorzaakt door shigatoxine (Naar: OncoHEMA key, 2017)

De doelwitcellen van Stx zijn cellen die Gb3 tot expressie brengen. Gb3 is een ganglioside en een niet-eiwit receptor op epitheelcellen. Gb3 wordt met hoge concentratie tot expressie gebracht door de intestinale bloedvaten, de hersenen en de nieren, met voornamelijk de endotheelcellen van de glomeruli en de epitheelcellen van de proximale tubuli (Kremer Hovinga et al., 2018).

De hersenen, de nieren en het hart zijn bij de mens tevens voorzien van eindcirculatie waardoor thrombosen aanleiding geven tot ischemie van deze organen. EHEC infectie kan dus leiden tot hersenthrombose, acuut nierfalen en hartinfarct.

1.3.2 Symptomen

EHEC infectie heeft een incubatieperiode tussen de 3 en 8 dagen waarna diarree ontstaat die bloederig kan zijn. Dit kan gepaard gaan met buikpijn en overgeven. HUS symptomen kunnen zichtbaar worden 5 tot 13 dagen later. Deze kunnen vaag zijn en zich beperken tot bleekheid, lethargie (slaperigheid), oligurie (minder urineren), zwelling en het sneller ontwikkelen van blauwe plekken. Daarnaast kunnen ook acuut nierfalen, zenuwstoornissen of een hartinfarct optreden ten gevolge van HUS (Rafat et al., 2017). De meerderheid van de patiënten herstellen volledig van HUS. Toch ziet men dat ongeveer 30 % van de HUS patiënten ook op lange termijn nog renale en neurologische problemen ondervinden. Het sterftecijfer in de acute fase ligt tussen de 1 tot 4 % bij kinderen (Zoja et al., 2019).



Figuur 6: EHEC symptomen bij de mens

1.3.3 Het voorkomen van EHEC bij de mens

EHEC is een belangrijke oorzaak van acuut nierfalen bij jonge kinderen (Amirlak L. en Amirlak B., 2006). Bij volwassenen is het eerder zeldzaam. Meestal gaat het om individuele gevallen. Uitzonderlijk vinden grotere uitbraken plaats zoals het geval was in 1996 in Japan. Hierbij werden 6000 scholieren ziek door een EHEC O157 epidemie. Uiteindelijk werden 678 patiënten opgenomen in het ziekenhuis, drie van hen overleden (Piérard et al., 2008). In 2011 was er in Duitsland een uitbraak veroorzaakt door EHEC O104:H4 die circa 4.000 mensen trof. Van hen ontwikkelden er 22 % HUS, waarvan de meerderheid toch volwassenen waren. De meesten onder hen vertoonden zenuwstoornissen en een vijftigtal mensen stierven. De O104:H4 stam is geen zuivere EHEC. Er worden zowel EHEC- als EAggEC-genen tot expressie gebracht. Het blijkt dus dat *E. coli* pathotypes in staat zijn om te kruisen (Kremer Hovinga et al., 2018). In 2017 werden in de EU 6.073 bevestigde STEC gevallen gerapporteerd bij de mens. Dit komt overeen met 1.66 gevallen per 100.000 mensen. Bij 4 014 gevallen was de uitkomst van de infectie gekend. Hieruit bleek dat er 20 mensen waren overleden wat overeenkomt met 0.5% (EFSA en ECDC, 2018)³.

³ European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control (EFSA and ECDC) (2018). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2017. <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/j.efsa.2018.5500> (laatst geconsulteerd op 17 mei 2019)

EHEC is veelal zelflimiterend. Toch zal 10 tot 15 % van de mensen geïnfecteerd met EHEC O157:H7 te kampen krijgen met HUS. Het risico op HUS is onder meer afhankelijk van het Stx genotype zoals hogerop beschreven, maar ook het serotype speelt een rol. Zo ziet men dat in de westerse wereld *E. coli* O157:H7 verantwoordelijk is voor ongeveer 70 % van de gevallen. Verder zijn ook O118:H2, O111:H- en O104:H4 regelmatig betrokken in HUS. Daarnaast zijn ook gastheerfactoren van belang zoals de leeftijd en immuunsysteem (Kremer Hovinga et al., 2018).

1.4 EHEC bij het rund

1.4.1 EHEC diarree

Naast de enterotoxigene *E. coli* (ETEC), die een waterige diarree kunnen veroorzaken bij kalveren in de eerste drie levensdagen, zijn ook de “attaching and effacing *E. coli*”(AEEC) belangrijke pathotypes bij het rund. Er zijn veel verschillende serogroepen van AEEC in staat zijn een mucozuze tot mucohemorragische diarree te veroorzaken bij kalveren van 1 tot 5 weken oud en dit meestal met een lage mortaliteit (Moxley en Smith, 2010). De serogroepen die het vaakst aangetroffen worden bij klinische gevallen zijn O5, O26, O111, O118 en O145. Het klinische beeld wordt vaak verergerd door simultane aanwezigheid van andere enterische pathogenen zoals cryptosporidium, coccidiose, rota en corona virus (Moxley en Smith, 2010).

EHEC koloniseren bij runderen, na orale opname, het caecum, colon en rectum met als predilectie het epitheel ter hoogte van het mucosa-geassocieerd lymfoïd weefsel van het terminaal rectum. Blease et al (2009) toonden aan dat er bij runderen ter hoogte van het terminaal rectum een hoge expressie plaatsvindt van intelectines. Deze lectines zijn receptoren van lactoferrine, een antimicrobieel glycoproteïne dat sterk kan binden aan EHEC. Lactoferrine dat gebonden is aan het epitheel van het terminaal rectum zou de reden kunnen zijn waarom deze plaats gepredisponeerd is voor EHEC kolonisatie.

E. coli O157:H7 werd vroeger bij het rund beschouwd als een commensaal daar infectie veelal asymptomatisch verloopt. Maar *E. coli* O157:H7 kan wel degelijk als een pathogeen voor runderen beschouwd worden aangezien na infectie een inflammatoire reactie optreedt, het aangeboren immuunsysteem in gang schiet, en er zowel systemische als mucosale antistoffen aangemaakt worden (Moxley en Smith, 2010; Walle et al., 2013). Daarenboven heeft men gezien dat *E. coli* O157:H7 in staat is A/E laesies met diarree te veroorzaken in experimenteel besmette neonatale kalveren. Zowel in kalveren die colostrum hadden gekregen, als in colostrum gedepriveerde kalveren werden laesies terug gevonden. In kalveren van 3 tot 4 maanden oud werden ook A/E laesies terug gevonden maar deze kalveren hadden geen diarree. De virulentie van *E. coli* O157:H7 hangt dus onder meer af van de ouderdom van het kalf. Dit geldt zelfs voor de neonatale periode. Kalveren geïnfecteerd binnen de 12 uur na de geboorte bezitten grotere A/E laesies dan 30-36 uur oude kalveren. Dit verband tussen de leeftijd van het kalf en het ontwikkelen van diarree wordt niet enkel gezien bij *E. coli* O157:H7, maar ook bij de andere serogroepen. Zo bestaat er een significant verband tussen de leeftijd van het kalf met diarree en de kans op het terug vinden van O26 en O111. We kunnen concluderen dat neonatale kalveren vaker symptomen gaan vertonen bij infectie met deze pathogenen dan oudere kalveren (Moxley en Smith, 2010).

1.4.2 De rol van Stx bij het rund

Meer dan 85 % van de EHEC isolaten afkomstig van runderen zijn positief voor enkel het *stx1*-gen. Zoals hogerop vermeld zijn de EHEC stammen die diarree veroorzaken bij het kalf bijna altijd deze die *Stx1* produceren. Bij de mens wordt ziekte voornamelijk veroorzaakt door stammen die *Stx2* produceren. In tegenstelling tot mensen hebben runderen geen *Stx* receptoren op hun endotheelcellen en granulocyten. Dit zou verklaren waarom bij het rund zelden sprake is van ernstige hemorrhagische colitis en waarom er nog nooit HUS werd vastgesteld bij een rund (Menge et al., 2006; Moxley en Smith, 2010). *Stx* kan bij het rund wel zorgen voor immunosuppressie door te interfereren met de cellulaire immuniteit. *Stx1* verstoort de werking van mucosale macrofagen en intraepitheliale lymfocyten. Daarnaast is de opbouw van een cellulaire immuunrespons tegenover STEC antigenen sterk vertraagd bij kalveren geïnfecteerd met *Stx2* producerende *E. coli* O157:H7. De fecale uitscheiding van *Stx2* positieve *E. coli* O157:H7 is daardoor beduidend groter dan de uitscheiding van *Stx2* negatieve *E. coli* O157:H7. Door de immunosuppressie kunnen runderen moeilijk een volledig beschermende immuniteit opbouwen en dus ook moeilijk de infectie opruimen (Moxley en Smith, 2010).

1.4.3 Het voorkomen van EHEC bij rundvee

In 2005 werd een onderzoek gedaan op een beperkt aantal Belgische vleesveebedrijven die EHEC O157 positief waren. Hieruit bleek dat het percentage uitscheidende runderen, met een leeftijd tussen de 18 en 24 maanden, schommelde tussen de 0 en 85 %. De meeste runderen scheidde EHEC in lage hoeveelheden uit (<10² Cfug feces). Slechts enkele runderen scheidde hoge hoeveelheden uit (tot 10⁶ Cfug feces) (Piérard et al., 2008).

In de zomer van 2007 werd een prevalentie onderzoek naar EHEC O157 gedaan op 180 Belgische rundveebedrijven. Op 37.8 % van de bedrijven werd EHEC O157 terug gevonden. Meer specifiek waren 61.2 % van de melkveebedrijven positief, 44.4 % van de vleesveebedrijven, 22.7 % van de gemengde bedrijven en 9.1 % van de mestkalverbedrijven (Piérard et al., 2008). In dat zelfde jaar schatte men het percentage positieve rundveebedrijven voor serogroep O157 in de gehele Europese Unie slechts op 6.3 % (Franz, 2009).

Het vergelijken van prevalentie data is niet vanzelfsprekend voor non-O157 EHEC. Er bestaat immers geen universeel gebruikte detectiemethode zoals beschreven voor EHEC O157 in de ISO standaard 16654:2001⁴ (Tutenel et al., 2003). De meeste EHEC O157 kunnen namelijk geen sorbitol fermenteren waardoor CT-SMAC agars (MacConkey Agar met Sorbitol, Cefixime en Tellurite) gebruiksvriendelijke, selectieve media zijn voor de detectie van EHEC O157. Non-O157 EHEC kunnen wel sorbitol fermenteren en er bestaan momenteel geen selectieve agars die de serogroepen kunnen differentiëren van elkaar.

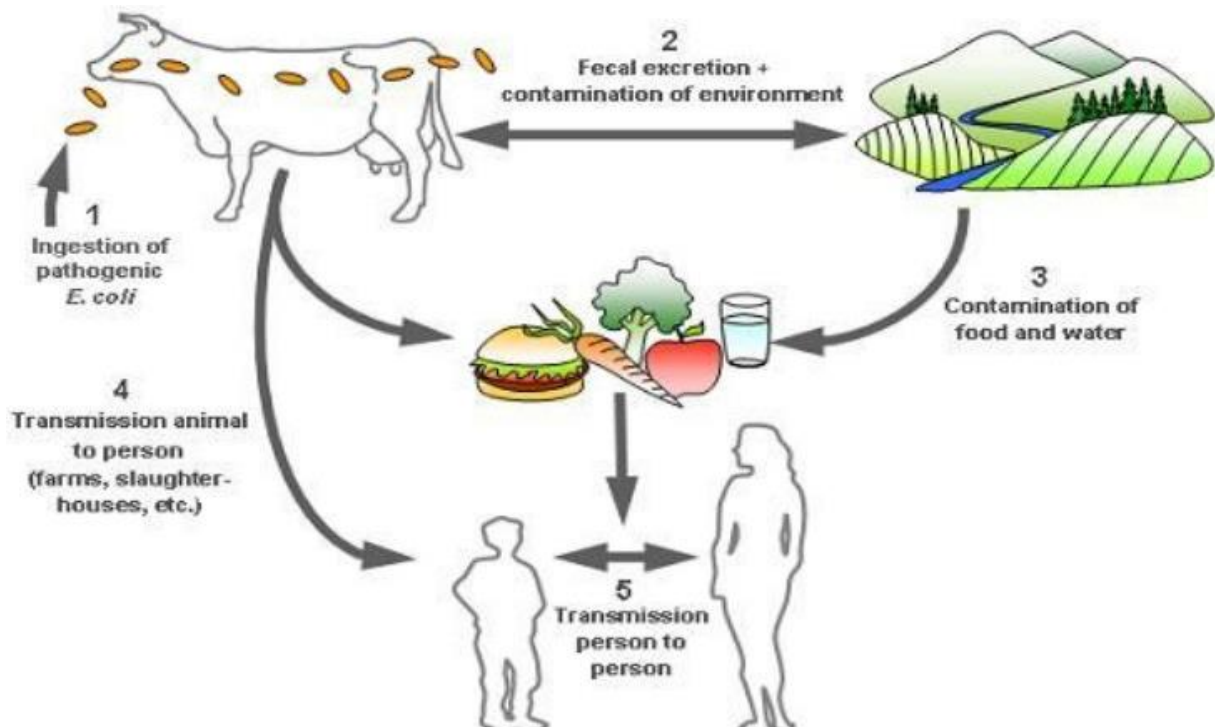
Daarnaast wordt het vergelijken van prevalentie data ook bemoeilijkt doordat de uitscheiding van EHEC door runderen door tal van factoren beïnvloed wordt. Joris et al (2013b) stelden uit hun longitudinale studies vast dat de uitscheiding van de kiem in de feces intermitterend en laag is bij de meeste geïnfecteerde runderen. Een klein percentage van de dieren scheidde hoge aantallen uit (>10⁴ Cfug feces) en worden daarom super uitscheiders ("supershedders") genoemd.

⁴International Organization for Standardization (2001). Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Horizontal method for the detection of Escherichia coli O157. <https://www.iso.org/standard/29821.html> (laatst geconsulteerd op 17 mei 2019)

Het zouden voornamelijk deze runderen zijn die van belang zijn in de transmissie en dus in het onderhouden van de infectie in de kuddes. Het voorkomen van super uitscheiders is afhankelijk van een aantal factoren waaronder het seizoen en het voeder. Runderen scheiden meer kiemen uit in de zomer en kalveren die gedistilleerde granen te eten krijgen zullen bepaalde serotypes ook meer uitscheiden (Cull et al., 2012). Onderzoek naar de prevalentie van “supershedders” in Europa en Canada resulteerde in twijfel over het bestaan van dieren die lange periode deze hoge aantallen bacteriën uitscheiden. In experimentele infecties ziet men een verhoogde uitscheiding in het begin van de infectie om dan te dalen naar waarden onder 10^4 Cfug feces (Cox et al., 2014). Bij dieren die onder veldomstandigheden opgevolgd werden kon men soms ook waarden boven de 10^4 Cfug feces detecteren, maar bij daaropvolgende staalnames was dit niet meer het geval (Joris et al., 2013b; Munns et al., 2014).

1.5 Transmissie

In het algemeen zijn runderen asymptomatische dragers van *E.coli* O157:H7 en vormen het belangrijkste reservoir voor infecties bij de mens. Ongeveer 75 % van de uitbraken bij de mens zouden te wijten zijn aan het consumeren van producten afkomstig van runderen. De overdracht ontstaat meestal ten gevolge van fecale contaminatie van karkassen tijdens het slachten of versnijden, gevolgd door consumptie van onvoldoende verhit vlees. Het FAVV (Federaal agentschap voor de veiligheid van de voedselketen) stelde vast dat gedurende verschillende jaren ongeveer 1 % van de runderkarkassen positief waren voor EHEC O157. Door verder bewerken van de karkassen kan de contaminatie sterk dalen. Zodoende was nog 0.1 % van de Belgische filet américain positief (Pierard et al., 2008). Vlees invriezen zal de contaminatiegraad niet doen dalen. EHEC blijkt resistent te zijn aan langdurig invriezen (Ro et al., 2015). Naast vlees zijn ook het drinken van gecontamineerd water of het consumeren van rauwe groenten die in contact kwamen met dit water voorbeelden van hoe de kiem van rund naar mens kan overgaan. Eveneens kan direct contact met *E. coli* O157:H7 geïnfecteerde dieren leiden tot overdracht. Zelfs overdracht van persoon tot persoon werd beschreven (zie figuur 7) (Walle et al., 2013).



Figuur 7: De verschillende transmissiewegen van EHEC (Uit: Fairbrother en Nadeau, 2006)

1.6 Vaccins

1.6.1 Inleiding

De behandeling van een EHEC infectie bij de mens is tot op de dag van vandaag enkel symptomatisch. Men tracht om op verschillende aspecten van de pathogenese in te grijpen maar voorlopig zijn er weinig effectieve geneesmiddelen op de markt. Het toedienen van antibiotica wordt best vermeden omdat bepaalde antibiotica de Stx productie kunnen induceren door inwerking op de profagen die de genetische info voor Stx1 en/of Stx2 bevatten. Daarenboven kan Stx nog steeds vrijkomen uit dode bacteriën (Goldwater en Bettelheim, 2012; Tarr et al., 2018). Doordat de behandeling van de mens verre van op punt staat en EHEC wereldwijd belangrijke zoönotische pathogenen zijn, werden de voorbije decennia verschillende studies uitgevoerd naar strategieën om de prevalentie en excretie van EHEC O157:H7 bij runderen te verlagen. Het rantsoen aanpassen zou een mogelijke strategie zijn om excretie van bepaalde serogroepen te verminderen. Uit verschillende studies, naar de invloed van voedingsfactoren op de uitscheiding van EHEC, blijkt echter dat er geen éénduidig verband bestaat. Zo toonden enkele studies aan dat de kans op terugvinden van EHEC O157 groter is bij het voederen van grote hoeveelheden gedistilleerde granen (bijproduct van de ethanol industrie) waarbij de vrije vetzuren de pH van de pens doen dalen. Andere studies konden daarentegen geen significant verschil aan tonen. De verschillende serogroepen zouden ook verschillend beïnvloed worden door voedingsfactoren. De kans op aantreffen van EHEC O103 blijkt groter te zijn bij het voederen van grote hoeveelheden gedistilleerde granen terwijl EHEC O111 dan juist minder vaak terug gevonden wordt (Schneider et al., 2018). Inspelen op het rantsoen is dus omslachtig. Hetzelfde geldt voor het oraal en tegelijk ook rectaal toedienen van bacteriofagen. Bacteriofagen zijn virussen die specifieke bacteriën infecteren. Ze zijn in staat de uitscheiding van EHEC O157:H7 te reduceren maar ze kunnen runderen niet vrij krijgen van de infectie (Sheng et al., 2006). Lactoferrine rectaal toedienen zou wel een effectieve strategie kunnen zijn. Kieckens et al (2018) waren de eersten die konden aantonen dat het rectaal toedienen van lactoferrine bij kalveren de excretie van EHEC O157:H7 kan doen dalen en zelfs kan zorgen voor een permanente klaring van de infectie. Lactoferrines zijn transferrines, dit zijn natuurlijke antimicrobiële glycoproteïnen die ijzer capteren wat een essentiële groeifactor is voor bacteriën. Ze destabiliseren ook de buitenste membraan van gram-negatieve bacteriën en via hun serine protease activiteit breken ze proteïnen af die de bacterie nodig heeft om poriën te vormen en contact met de gastheercel te maken. De werkzaamheid in het veld moet wel nog verder onderzocht worden.

De laatste jaren ligt de focus op rundervaccins tegen EHEC O157:H7. Er zijn twee types vaccins die een significante reductie in excretie teweeg brengen: type drie secretiesysteem (T3SS) vaccins en “siderophore receptor and porin protein” (SRP) vaccins.

1.6.2 Type drie secretiesysteem (T3SS) vaccins

Naylor et al (2008) vaccineerden kalveren met alleen gezuiverd H7 flagelline (onderdeel van H7 flagel). De kalveren werden ofwel systemisch intramusculair gevaccineerd ofwel mucosaal door rectaal toedienen van H7 flagelline of H7 flagelline geïncorporeerd in polymicropartikels. Na systemische vaccinatie zag men zowel hoge IgA en IgG concentraties in het bloed als detecteerbare concentraties van IgA en IgG in het rectum. Mucosale immunisatie met H7 flagelline kon enkel IgA rectaal opwekken, er werden geen H7-specifieke antistoffen in het bloed terug gevonden. H7-polymicropartikels waren niet in staat antistoffen op te wekken, noch rectaal, noch systemisch. De kalveren werden na vaccinatie oraal geïnfecteerd met EHEC O157:H7 om na te gaan in hoeverre de opgewekte antistoffen in staat waren kolonisatie en uitscheiding tegen te gaan. Bij de systemisch gevaccineerde kalveren verliep de kolonisatie minder snel en de piek van de uitscheiding was vertraagd. De totale bacteriële uitscheiding bleef wel dezelfde als bij de niet gevaccineerde kalveren. Rectale immunisatie met H7 of H7 polymicropartikels bleek geen effect te hebben op kolonisatie en uitscheiding. Dezelfde onderzoeksgroep vaccineerde in 2015, kalveren met verschillende combinaties van type 3 secretiesysteem geassocieerde proteïnen (EspA, intimine en Tir) van EHEC O157:H7 waarna de kalveren experimenteel werden geïnfecteerd. Zij concludeerden dat vaccinatie met een combinatie van EspA en intimine de kolonisatie kon beperken maar dat daarentegen de duur van aanwezigheid van de bacterie in het gastro-intestinaal stelsel langer was dan bij de controlegroep. Bij toevoegen van Tir of H7 flagelline aan het vaccin zag men dat de bacterie even lang aanwezig bleef in het gastro-intestinaal stelsel als bij de controlegroep het geval was. Bij toevoeging van H7 flagelline werd daarenboven vastgesteld dat het percentage gekoloniseerde kalveren, na experimentele blootstelling aan de bacterie, lager was. Dit wijst erop dat H7 flagelline een rol speelt in de initiële adhesie. Deze vaccins werken dus eerder door de adhesie te verhinderen dan dat ze de snelheid waarmee de bacterie uit het gastro-intestinaal stelsel verdwijnt, doen toenemen (McNeilly et al., 2015). Een mogelijke verklaring hiervoor is dat systemisch geïnduceerde H7-specifieke IgG's de aangeboren immuniteit zouden verstoren. *In vitro* ziet men namelijk dat H7-specifieke IgG's de flagelline-gemedieerde TLR5 activatie kunnen inhiberen (Gally et al., 2009). Belangrijk is dat door toevoegen van Tir of H7 flagelline de uitscheiding onder 10^4 Cfug feces blijft. Hierdoor zou de basis reproductie ratio (R_0) onder 1 blijven. Dit betekent dat in een volledig gevoelige populatie 1 typisch geïnfecteerd dier gedurende zijn volledige infectieuze periode minder dan 1 ander dier zal besmetten. De bacterie kan zich dus niet verspreiden in een kudde waardoor de besmetting zal uitdoven (McNeilly et al., 2015). Daarnaast toonden McNeilly et al. (2015) aan dat vaccinatie met Tir, intimine en EspA van EHEC O157 IgG1's opwekte die in staat waren kruis te reageren met EHEC O26, O103, O111, O103 en O145. Het kan wel zijn dat de opgewekte antistoffen, die in staat zijn om te kruisreageren, *in vivo* niet zullen beschermen tegen infecties met deze non-O157 *E. coli* serotypes. De functionaliteit van de antistoffen moet nog verder nagegaan worden.

1.6.3 “Siderophore receptor and porin protein” (SRP) vaccins

IJzer is een essentieel element voor zowel bacteriën als voor de gastheer. In het lichaam van de gastheer bevindt er zich weinig vrij ijzer omdat het in de bloedbaan gebonden wordt aan ijzer-bindende proteïnen zoals heem en transferrine. Bacteriën beschikken in hun membraan over hun eigen ijzer-bindende proteïnen, genaamd siderofoor-receptoren, om in competitie te kunnen gaan met de gastheer. Er is aangetoond dat “siderophore receptor and porin protein” (SRP) vaccins de prevalentie van *E. coli* O157:H7 in feces doen dalen (Cull et al., 2012; Snedeker et al., 2012). Antistoffen tegenover deze SRP proteïnes verhinderen namelijk de ijzeropname door de bacteriën waardoor de groei van de bacteriën in het gedrang komt. Een studie toonde aan dat SRP vaccinatie tegen EHEC O157:H7 de prevalentie, het aantal dagen waarop runderen positief testen en het aantal dagen dat runderen als superuitscheiders van EHEC O157:H7 worden bestempeld, doet verminderen. Drie subcutane injecties van het EHEC O157:H7 SRP vaccin zou hierbij effectiever zijn dan twee subcutane injecties (Walle et al., 2013). De dosis van het vaccin speelt ook een rol in de werkzaamheid. Fox et al (2009) voerden een studie uit op 60 runderen die op natuurlijke wijze EHEC O157 uitscheiden. De runderen werden random toegewezen aan één van de drie behandelingsgroepen: een controle groep gevaccineerd met adjuvans, een groep die twee maal met 2 ml subcutaan gevaccineerd werd met 21 dagen tussen en een groep die twee maal gevaccineerd werd met 3 ml subcutaan met 21 dagen tussen. In de 3ml groep zag men dat de prevalentie van EHEC O157 significant gedaald was in vergelijking met de controle groep. Bij de 2 ml groep was de daling niet significant. Cernicchiaro et al (2014) stelden vast dat wanneer EHEC O157 aanwezig was in fecesstalen, de odds ratio voor aanwezigheid van EHEC O26 gelijk is aan 9.0. Ondanks deze bevinding zagen ze dat een dubbele, subcutane vaccinatie in de nek met 2ml van het SRP vaccin, dat effectief was tegenover EHEC O157, de uitscheiding van zes non-O157 EHEC (O26, O45, O103, O111, O121, O145) niet significant deed dalen. Kruisbescherming tegenover non-O157 EHEC zou dus niet voorkomen bij SRP vaccinaties tegen EHEC O157. Een mogelijke oorzaak kan zijn dat de SRP proteïnen van EHEC O157, die aanwezig waren in het vaccin, antigenisch verschillend waren van de SRP proteïnen van de non-O157 EHEC stammen die circuleerden. De vraag stelt zich of een driedubbele vaccinatie met Epitopix, dat een SRP vaccin is, wel voldoende kruisreactie zou geven.

2 Probleemstelling

EHEC hebben een grote impact op zowel de voedselveiligheid, dier- en volksgezondheid als op de economie. De meeste aandacht ging afgelopen decennia naar EHEC O157 omdat EHEC O157:H7 het vaakst geassocieerd wordt met hemorragische collitis en/of HUS bij de mens. Door de verbeterde diagnostiek van de non-O157 serotypes, die kalverdiarree kunnen veroorzaken, blijkt dat O26 de tweede meest voorkomende EHEC zijn. Voorlopig zijn er voor mensen weinig effectieve geneesmiddelen op de markt. Daarom wordt er nu gezocht naar manieren om de aanwezigheid van EHEC bij runderen te verminderen. Volwassen runderen kunnen namelijk lange tijd asymptomatisch drager zijn van EHEC en vormen zo de grootste bron van infectie bij de mens. Vaccinatie is een veelbelovende strategie om de prevalentie van EHEC bij runderen te doen dalen. In het verleden is immers gebleken dat O157-vaccinatie effectief kan zijn bij runderen. Of deze O157-vaccins *in vivo* ook bescherming kunnen bieden tegenover non-O157 serotypes, die steeds meer in belang toenemen, is nog niet onderzocht.

3 Doelstellingen

In de vaccinatiestudie is het de bedoeling na te gaan of vaccinatie van kalveren tegenover *E. coli* O157 de prevalentie en excretie van non-O157 *E. coli* significant kan doen dalen. De focus zal liggen op O26 daar dit de tweede meest voorkomende EHEC zijn. We willen dus nagaan of de opgewekte antistoffen ook kruisbescherming bieden tegen O26 *E. coli* en zo een rol kunnen spelen in de preventie van diarree bij kalveren veroorzaakt door EHEC O26. Er zullen twee vaccins getest worden. Een SRP gebaseerd vaccin van EpiTopix (EpiTopix LLC, Willmar, Minnesota, U.S) dat in 2009 op de markt kwam in de US (Walle et al., 2013) en een vaccin dat zich richt op het T3SS en H7 flagelline (Roslin vaccin). Negatieve kalveren voor EHEC zullen geselecteerd worden op Vlaamse rundveebedrijven en naar de campus gebracht worden. Vervolgens zullen zij chronisch geïnfecteerd worden met een O26 EHEC stam geïsoleerd op Vlaamse rundveebedrijven om zoveel mogelijk de praktijksituatie te weerspiegelen. De O26 stam die gebruikt zal worden moet vrij zijn van het *stx1*- en *stx2*-gen vanwege bioveiligheidsredenen. Uiteindelijk zullen de kalveren ad random toegewezen worden aan 1 van de 3 vaccinatiegroepen: 3-dosis regime, 2-dosis regime en controlegroep dat enkel gevaccineerd wordt met adjuvans. De reductiegraad in fecale uitscheiding zal hierna vergeleken worden tussen de 3 vaccinatiegroepen.

Deze voorstudie focust zich op het isoleren van EHEC O26 stammen, die negatief zijn voor het *stx1*- en *stx2*-gen, om de kalveren chronisch mee te infecteren. In feite trachten we om vanuit EHEC O26 stammen, atypische EPEC O26 stammen te bekomen. Atypische EPEC bezitten, net zoals EHEC, het *eae*-gen maar geen *stx*-gen. Ze worden atypisch genoemd omdat ze het EAF (EPEC adherence factor) plasmide niet bezitten (Bielaszewska et al., 2007).

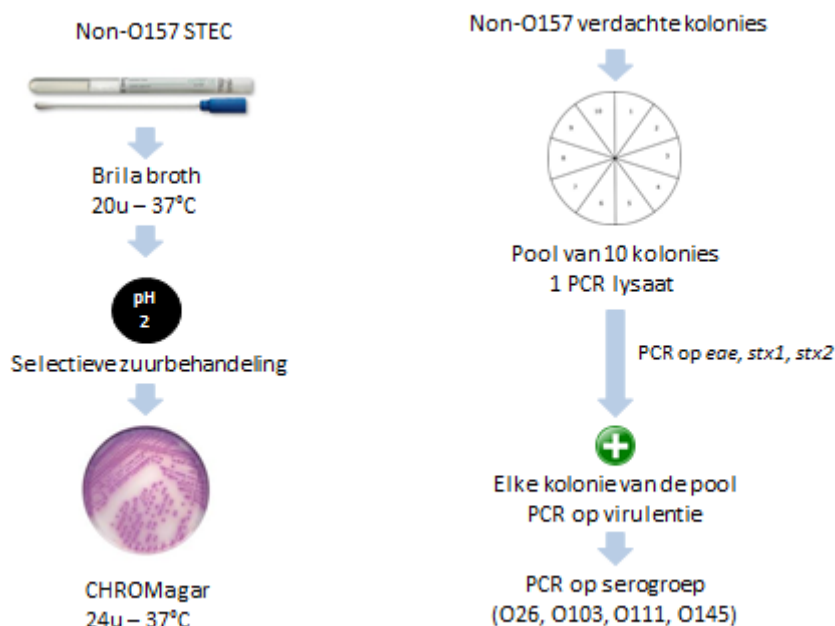
4 Materiaal en methoden

4.1 Isolatie van O26 stammen op Vlaamse rundveebedrijven

4.1.1 Materiaal

- rectale swabs (Heinz Herenz)
- transportbuisje met 6 ml maximum recovery diluent (peptone saline)(Oxoid)
- 5 ml dubbel geconcentreerd Brila broth (Brilliant green bile lactose broth)(Oxoid)
- 1 ml TSB pH2 (Tryptone Soya Broth)(Oxoid)
- 500 µl PBS (Phosphate Bufferd Saline)(Oxoid)
- CHROMagar™ STEC platen
 - Agar (15 g/l)
 - Peptonen en gist extract (8g/l)
 - Zout (5.2 g/l)
 - Chromogene mix (2.6 g/l)
 - Selectieve mix (10 ml/l)
- PCA (Plate Count Agar)(Oxoid)

4.1.2 Methode



Figuur 8: Isolatie O26

4.1.2.1 Staalname, O26 verrijking, uitplaten en poollysaten

Op 3 verschillende melkveebedrijven werden bij jonge kalveren rectale swabs genomen, ter hoogte van de recto-aneale junctie. De tip van de swabs werden telkens afgeknipt in een transportbuisje met 6 ml MRD. De buisjes werden, gekoeld door ijs, getransporteerd naar het laboratorium en onmiddellijk onderworpen aan een O26 verrijking. Na 1 minuut vortexen werd er, aan 5 ml van de suspensie, 5 ml dubbel geconcentreerd Brila-broth toegevoegd. Het geheel werd dan gedurende 20u bij 37°C geïncubeerd. Vervolgens werd 2ml van de verrijking gecentrifugeerd (12 000xg-3 min) en het supernatans werd verwijderd. Voor de selectie van O26 EHEC uit de verrijking werd gebruik gemaakt van de zuurresistente eigenschap die STEC bezitten.

De pellet die achterbleef in de buisjes werd in suspensie gebracht met 1 ml aangezuurd TSB (pH 2) en gedurende 30 minuten op kamertemperatuur geïncubeerd en geroteerd in een rotary mixer. Zodoende werd de microbiologische achtergrondflora sterk gereduceerd. Opnieuw werden de buisjes gecentrifugeerd (12 000xg-3 min) en het supernatans verwijderd. Nu werd elke pellet in suspensie gebracht in 500 µl PBS buffer. Van iedere suspensie werd uiteindelijk 50 µl overgebracht op een selectieve CHROMagar plaat waarbij aanwezigheid van STEC kan vermoed worden als kleurverandering optreedt. Het medium bevat namelijk een chromogeen substraat dat door STEC specifieke enzymen kan worden omgezet in een paars gekleurde verbinding. De platen werden overnacht (18-24u) geïncubeerd bij 37°C. Tot zover werd er voor elke rectale swab 1 CHROMagar plaat met STEC verdachte kolonies bekomen. Om met zekerheid te kunnen bevestigen dat het weldegelijk om STEC kolonies ging werden er per CHROMagar plaat ad random tien verdachte kolonies overgeënt op één PCA plaat. De PCA platen werden terug overnacht (18-24u) geïncubeerd bij 37°C. Op 1 PCA plaat bevonden zich dan 10 kolonies waar ten slotte één lysaat van werd gemaakt (poollysaat). Dit poollysaat, bestaande uit een staal van de 10 verdachte kolonies en 100 µl steriel water, werd gedurende 17 minuten opgewarmd tot 92.5°C zodat het DNA van de kolonies vrij komt voor PCR. Het isolatieprotocol dat gebruikt werd, is gebaseerd op de methode beschreven door Van Damme et al. (2015).

4.1.2.2 Multiplex PCR virulentiegenen

Om na te gaan of de poollysaten weldegelijk afkomstig zijn van STEC moet kunnen worden aangetoond dat er virulentiegenen (*eae*, *stx1* en *stx2*) aanwezig zijn. Hiervoor werd er van elk poollysaat 1µl samengebracht met 24µl mastermix.

Tabel 1: Samenstelling PCR-stalen voor virulentiegenen

Reagentia	Volume (µl) voor 1 staal
Mastermix	
Ultra-Puur water	15,33
Buffer (5 green GoTaq)	5,00
dNTP's: dATP, dGTP, dCTP, dTTP (10mM)	0,625
Stx2 forward en reverse primers (0.4 µM)	0,20
Stx1 forward en reverse primers (1 µM)	0,50
Eae forward en reverse primers (1µM)	0,50
MgCl₂ (25mM)	1,50
Taq	0,35
DNA-poollysaat	
	1,00

De stalen ondergingen vervolgens onderstaand PCR programma om de eventueel aanwezige virulentiegenen te amplificeren (Possé et al., 2007).

Tabel 2: PCR-programma virulentiegenen

Stap	Tijd	Temperatuur
Denaturatie	3'	95°C
Denaturatie	20"	95°C
Aanhechting primers	40"	58°C
Verlenging	30"	72°C
Verlenging	8'	72°C
	∞	4°C

4.1.2.3 Gel-elektroforese virulentiegenen

Via gel-elektroforese konden de geamplificeerde virulentiegenen in beeld gebracht worden.

Materiaal:

- stammen met gekende virulentiegenen ter controle
- PCR stalen
- agarose gel 1.5%
 - agarose (Promega)
 - TAE (Tris-acetaat EDTA) buffer 1x
- ethidiumbromide

Methode:

De 1.5% agarose gel werd geladen met 10 µl van elk PCR staal en 10 µl van 2 referentiestammen waarvan de virulentiegenen reeds gekend zijn. De gel werd in een elektroforesetank, in een 1x TAE buffer, gelegd gedurende 55 minuten bij 120 volt. De banden werden vervolgens gekleurd door de gel 30 minuten in een ethidiumbromide bad te leggen. Ethidiumbromide intercaleert met DNA waardoor de banden in de gel zichtbaar worden onder UV-licht. Ten slotte werden, met de Bio-Rad Gel Doc EZ imager, foto's genomen van elke gel om te zien welke stalen welke virulentiegenen bezitten.

Indien voor een poolysaat de multiplex PCR negatief was, was geen enkele van de 10 verdachte kolonies een non-O157 STEC. Indien wel positief werd elke kolonie van de pool apart met PCR getest op aanwezigheid van virulentiegenen.

4.1.2.4 Multiplex PCR (sub)serotypering

Kolonies die positief waren voor de aanwezigheid van virulentiegenen werden vervolgens geserotypeerd (O26, O103, O111, O145) met behulp van multiplex PCR. Bij de Stx1-positieve O26 EHEC stammen, werd ook het subtype van Stx1 bepaald via triplex PCR. De subtypering verliep volgens het sequentie gebaseerde protocol van Scheutz et al. (2012).

Tabel 2: Samenstelling PCR-stalen voor serotypering

Reagentia	Volume (µl) voor 1 staal
Mastermix	
Ultra-Puur water	13,10
Buffer (5 green GoTaq)	5,00
dNTP's: dATP, dGTP, dCTP, dTTP (10mM)	1,25
O26, O103, O111 en O145 forward primers (0.4 µM)	0,25
O26, O103, O111 en O145 reverse primers (0.4 µM)	0,25
MgCl ₂ (25mM)	3,00
Taq	0,15
DNA-lysaat (positieve kolonie voor virulentiegenen)	
	2,00

Tabel 3: PCR-programma serotypering

Stap	Tijd	Temperatuur
Denaturatie	40'	95°C
Denaturatie	30"	95°C
Aanhechting primers	45"	59°C
Verlenging	45"	72°C
Verlenging	3'	72°C
	∞	4°C

Tabel 4: Samenstelling PCR-stalen voor subtypering

Reagentia	Volume (µl) voor 1 staal
Mastermix (HotStarTaq, Qiagen)	12,00
Stx1a forward primer (5µM)	2,00
Stx1a reverse primer (5µM)	2,00
Stx1c forward primer (5µM)	1,00
Stx1c reverse primer (5µM)	1,00
Stx1d forward primer (5µM)	1,00
Stx1d reverse primer (5µM)	1,00
DNA-lysaat (Stx1-positieve EHEC O26 kolonie)	
	5,00

Tabel 5: PCR-programma subtypering

Stap	Tijd	Temperatuur
Denaturatie	15'	95°C
Denaturatie	50"	94°C
Aanhechting primers	40"	64°C
Verlenging	60"	72°C
Verlenging	3'	72°C
	∞	4°C

4.1.2.5 Gel-elektroforese (sub)serotypering

Materiaal:

- hyperladder 50bp (Bioline)
- stammen met gekende virulentiegenen ter controle
- PCR stalen
- agarose gel 1.5%
 - agarose (Promega)
 - TAE (Tris-acetaat EDTA) buffer 1x
- ethidiumbromide

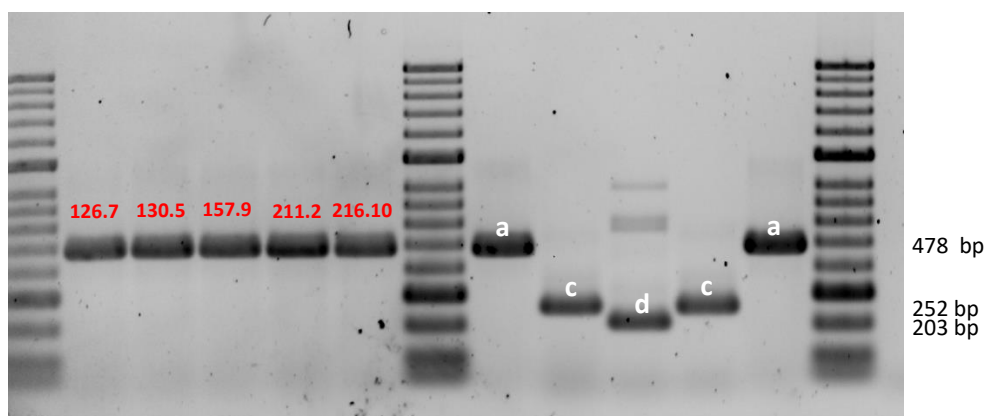
Methode:

De elektroforese verliep op dezelfde manier als voor de detectie van de virulentiegenen. Voor de serotypering werd gebruik gemaakt van referentiestammen met gekend serotype. Nadien werden, van de Stx1-positieve O26 EHEC stammen, de Stx1-subtypes bepaald aan de hand van referentiestammen met gekend Stx1-subtype.

Van de O26 EHEC stammen die geïsoleerd zijn, werd er voort gewerkt met 5 stammen die het *stx1*-gen dragen en met 4 stammen die het *stx2*-gen dragen. Meer specifiek was het subtype van alle 5 de Stx1-positieve stammen Stx1a. Stx1a is het meest voorkomende subtype bij isolaten (Scheutz et al., 2012) (Zie tabel 6 en 7 en figuur 9).

Tabel 6: Stx1-positieve O26 EHEC stammen

Stam	Bedrijf	Leeftijd kalf	Serotype	Virulentiegenen
126.7	J.D.	29d	O26	<i>eae + stx1a</i>
130.5	J.D.	12d	O26	<i>eae + stx1a</i>
157.9	D.M.	63d	O26	<i>eae + stx1a</i>
211.2	C.V.H.	21d	O26	<i>eae + stx1a</i>
216.10	C.V.H.	93d	O26	<i>eae + stx1a</i>



Figuur 9: Stx1-subtypering van Stx1-positieve O26 EHEC stammen (rood) op basis van referentiestammen met gekend Stx1-subtype (wit).

Tabel 7: Stx2-positieve O26 EHEC stammen

Stam	Bedrijf	Leeftijd kalf	Serotype	Virulentiegenen
36.10	J.D.	43d	O26	<i>eae + stx2</i>
81.9	D.M.	141d	O26	<i>eae + stx2</i>
190.5	J.D.	63d	O26	<i>eae + stx2</i>
193.1	J.D.	51d	O26	<i>eae + stx2</i>

4.2 Bekomen van O26 stammen negatief voor het *stx1*- en *stx2*-gen

Zoals hogerop reeds vermeld, liggen de *stx*-genen van EHEC in het DNA van een bacteriofaag dat geïntegreerd zit in het bacterieel genoom. Bielaszewska et al. (2007) toonden aan dat EHEC O26 *in vitro* de *Stx2*-coderende bacteriofagen kunnen verliezen waardoor ze converteren naar atypische EPEC O26. Andersom kunnen *Stx*-coderende bacteriofagen, afkomstig van EHEC, een lysogene cyclus veroorzaken in aEPEC waardoor deze worden omgevormd tot EHEC. Er bestaat dus een bi-directionele conversie tussen EHEC en aEPEC. Dit zou kunnen verklaren waarom bij eenzelfde patiënt een eerste fecesstaal EHEC O26 positief is en een later staal aEPEC O26 positief.

De *stx*-genen van EHEC zijn dus gelegen op mobiele elementen die de bacteriën kunnen verliezen. Het is net onze bedoeling dit verlies in de hand te werken voor bioveiligheidsredenen. Hiervoor werden twee methoden getest.

4.2.1 Spontaan verlies van *stx*-gen door herhaaldelijk overplaten op PCA-platen

4.2.1.1 Materiaal

- *Stx1*-positieve EHEC stammen
- PCA (Plate Count Agar)(Oxoid)

4.2.1.2 Methode

Verschillende studies vermelden dat, na opéénvolgende subcultivaties-stappen en na lang bewaren, EHEC hun *stx*-genen waren verloren. Joris et al. (2011) toonden zelfs aan dat het verlies van *stx*-genen al kan optreden na het maken van één subcultuur. De eerste methode die we gebruikt hebben was gebaseerd op deze bevindingen. De 5 *Stx1*-positieve EHEC O26 stammen werden uitgeplaat op PCA. Gedurende een aantal weken werden er elke dag subculturen gemaakt door een aantal kolonies per plaat over te enten op een nieuwe PCA-plaat. Om de 5 tot 10 dagen werd er PCR uitgevoerd op de kolonies om na te gaan of er reeds verlies van het *stx1*-gen was opgetreden.

4.2.2 Spontaan verlies van *stx*-gen door verdunningen op SMAC-platen

4.2.2.1 Materiaal

- *Stx1*- en *Stx2*-positieve EHEC stammen
- PCA (Plate Count Agar)(Oxoid)
- 50 µl UP (Ultra-Puur water)
- 5 ml TSB pH2 (Tryptone Soya Broth)(Oxoid)
- SMAC-agar (Sorbitol MacConkey)

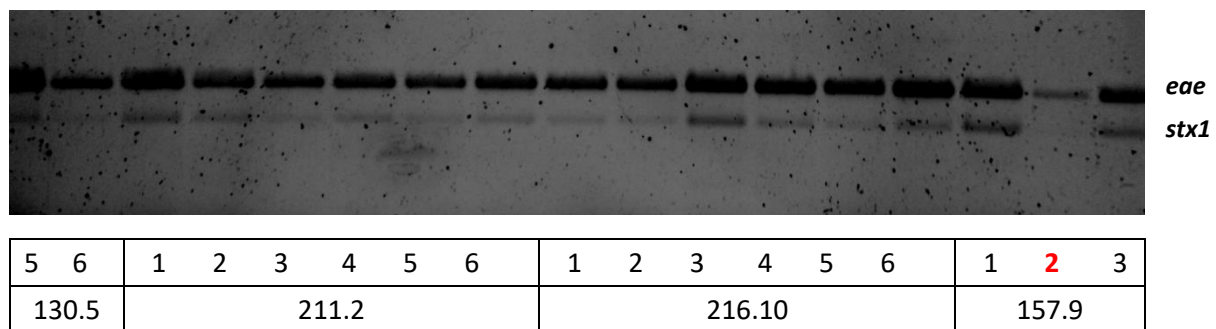
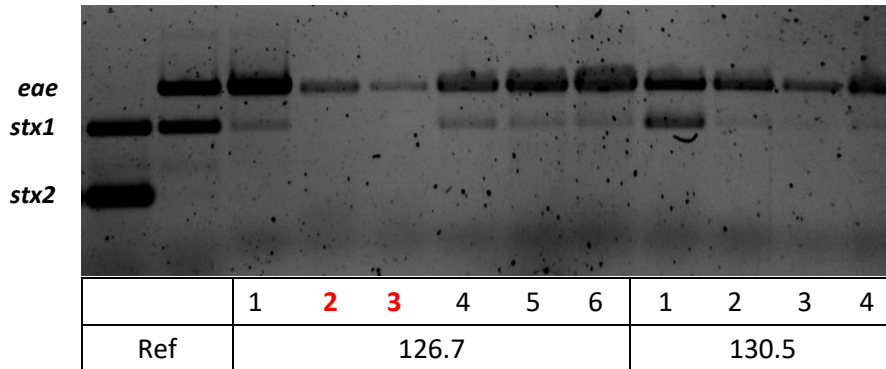
4.2.2.2 Methode

Deze methode is gebaseerd op de beschrijving van *stx2*-gen verlies door Bielaszewska et al (2007). De 5 stalen van de *Stx1*-positieve EHEC O26 stammen en de 4 stalen van de *Stx2*-positieve EHEC O26 stammen werden uitgeplaat op PCA en overnacht geïncubeerd bij 37°C. Van elke stam werd 1 kolonie aangestipt en opgelost in 50 µl UP. Er werd 5 µl van deze oplossing geïnoculeerd in 5 ml TSB en overnacht geïncubeerd. Vervolgens werden tienvoudige verdunningen van deze vloeibare cultuur uitgeplaat op SMAC-agar en terug overnacht geïncubeerd. Per stam werden 10 kolonies via PCR gescreend op de aanwezigheid van *stx1*- en *stx2*-gen. Bielaszewska et al. (2007) bekwamen via deze methode een verlies van het *stx2*-gen in 10 tot 14 % van de kolonies die ze getest hadden op de eerste subcultuur.

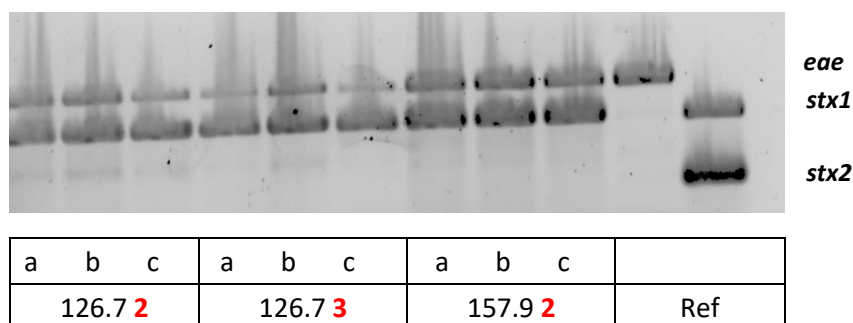
5 Resultaten

5.1 Spontaan verlies van *stx*-gen door herhaaldelijk overplaten op PCA-platen

De 5 *Stx1*-positieve EHEC O26 stammen (126.7, 130.5, 157.9, 211.2 en 216.10) werden dagelijks op PCA-platen overgeënt. Na 10 opeenvolgende dagen overplaten, werden 6 kolonies van elke stam aangestipt voor PCR-screening om na te gaan of er al verlies was opgetreden van het *stx1*-gen.

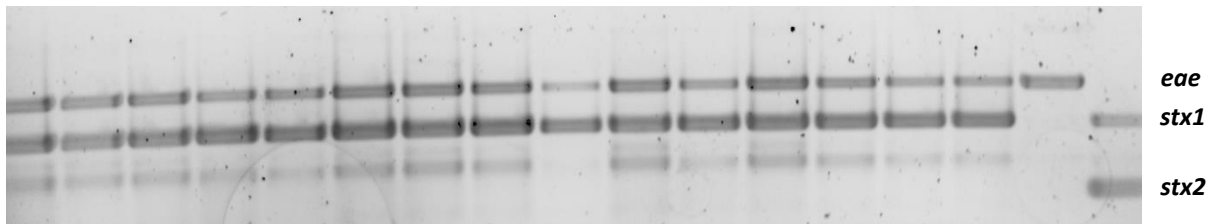


Kolonie 2 en 3 van stam 126.7 en kolonie 2 van stam 157.9 leken het *stx1*-gen kwijt te zijn. Ter controle werden deze 3 kolonies nogmaals overgeënt op PCA en overnacht geïncubeerd. Van elke plaat werden vervolgens 3 kolonies gebruikt voor PCR-screening.

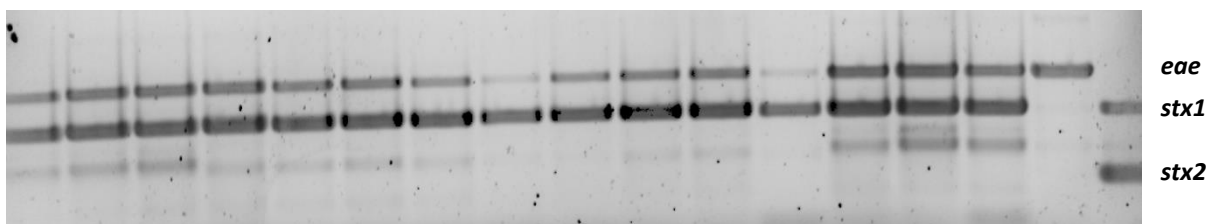


De kolonies die het *stx1*-gen leken kwijt te zijn, bleken op de controle screening toch nog het *stx1*-gen te bezitten.

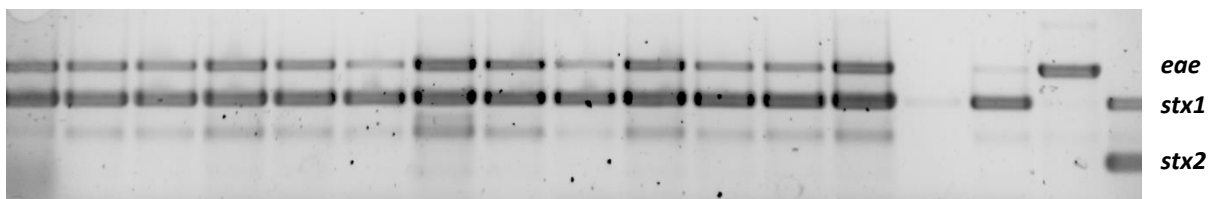
De 5 Stx1-positieve EHEC O26 stammen werden nog een week langer dagelijks overgeënt op PCA in de hoop dat ze het *stx1*-gen toch nog zouden verliezen. Deze keer werden er 9 kolonies per stam gescreend op aanwezigheid van het *stx1*-gen.



1	2	3	4	5	6	7	8	9	1	2	3	4	5	6	
211.2									130.5						Ref



7	8	9	1	2	3	4	5	6	7	8	9	1	2	3	
130.5			157.9									126.7			Ref



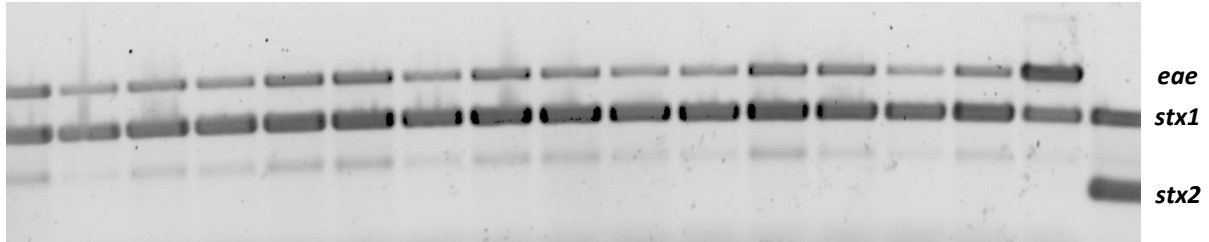
4	5	6	7	8	9	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
126.7						216.10									Ref

Opnieuw was geen enkele kolonie het *stx1*-gen kwijt geraakt. Kolonie 8 van stam 216.10 was negatief voor het *eae*-gen en slechts lichtjes positief voor het *stx1*-gen. Dit doet vermoeden dat er bij deze kolonie een fout heeft plaats gevonden bij de amplificatie van de genen.

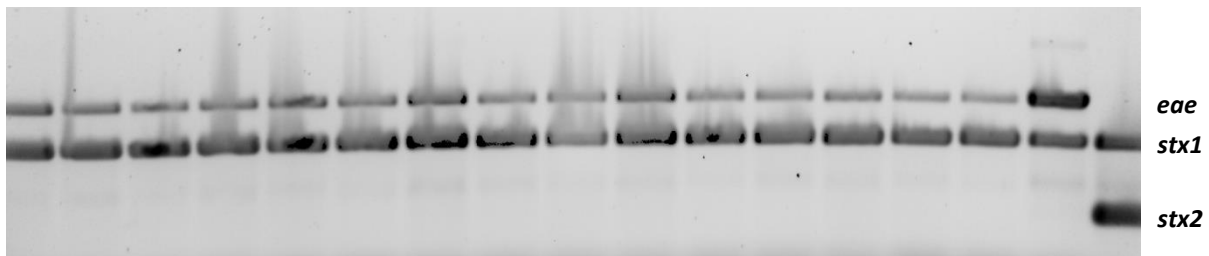
5.2 Spontaan verlies van *stx*-gen door verdunningen op SMAC-platen

Van zowel de 5 Stx1-positieve EHEC O26 stammen als van de 4 Stx2-positieve EHEC O26 stammen werden tienvoudige verdunningen gemaakt op SMAC-platen. De dag erop werden er per stam 15 kolonies aangestipt voor PCR-screening op virulentiegenen.

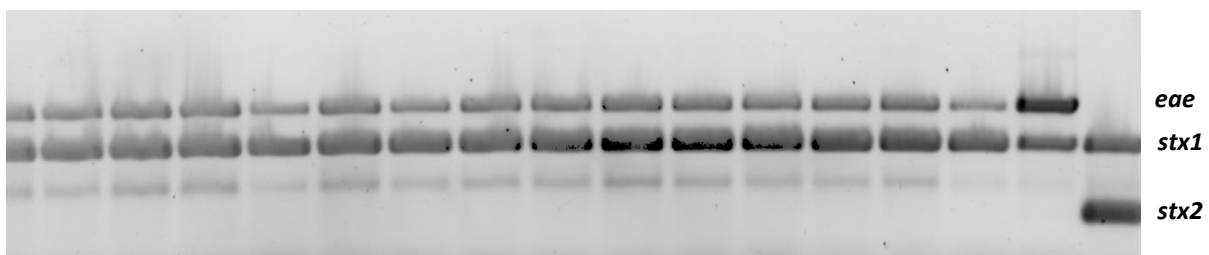
5.2.1 Stx1-positieve EHEC O26 stammen



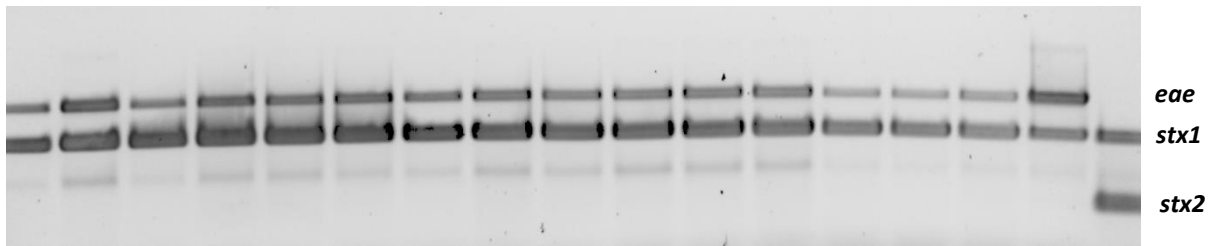
1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	
130.5 (10^{-2})					130.5 (10^{-1})					130.5 (niet verdund)					Ref



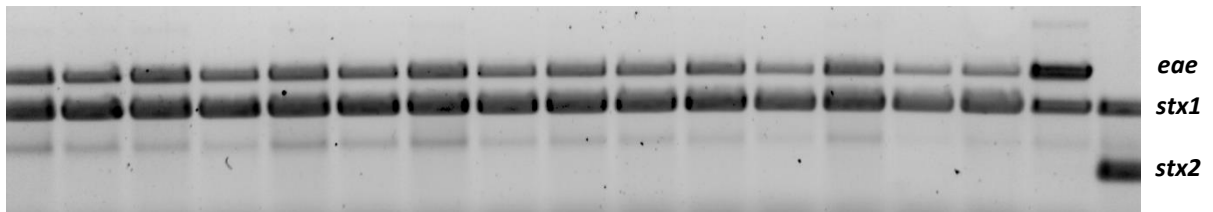
1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	
157.9 (10^{-2})					157.9 (10^{-1})					157.9 (niet verdund)					Ref



1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	
211.2 (10^{-2})					211.2 (10^{-1})					211.2 (niet verdund)					Ref



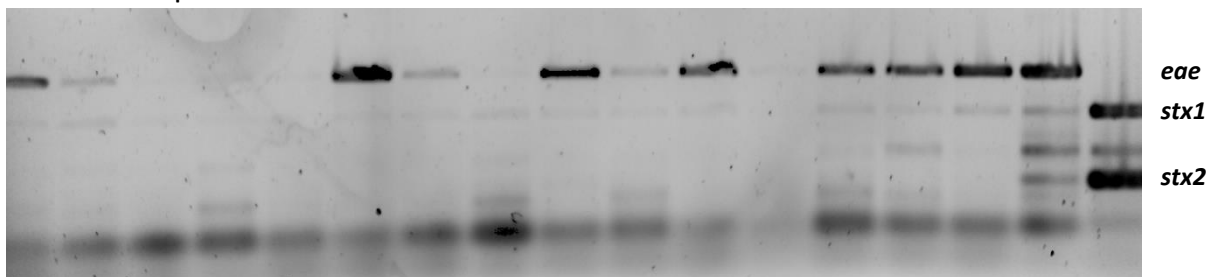
1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	Ref
126.7 (10^{-2})					126.7 (10^{-1})					126.7 (niet verdund)					



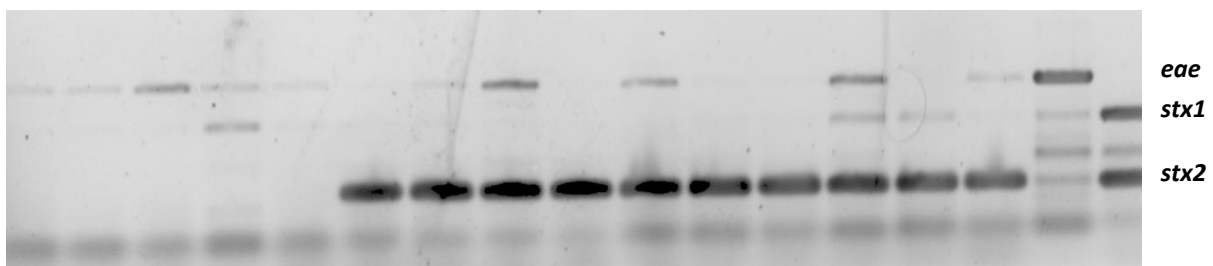
1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	Ref
216.10 (10^{-2})					216.10 (10^{-1})					216.10 (niet verdund)					

Uit de elektroforeses bleek dat geen enkele kolonie, van de 5 Stx1-positieve EHEC O26 stammen, het *stx1*-gen was kwijt geraakt.

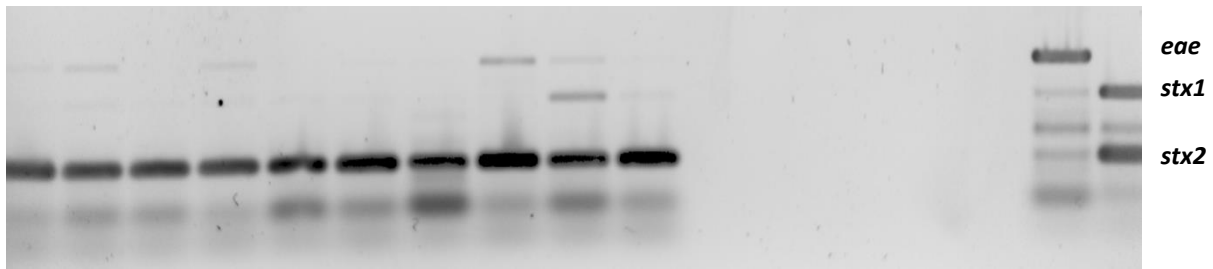
5.2.2 Stx2-positieve EHEC O26 stammen



1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	1	2	3	4	5	Ref
36.10										81.9					



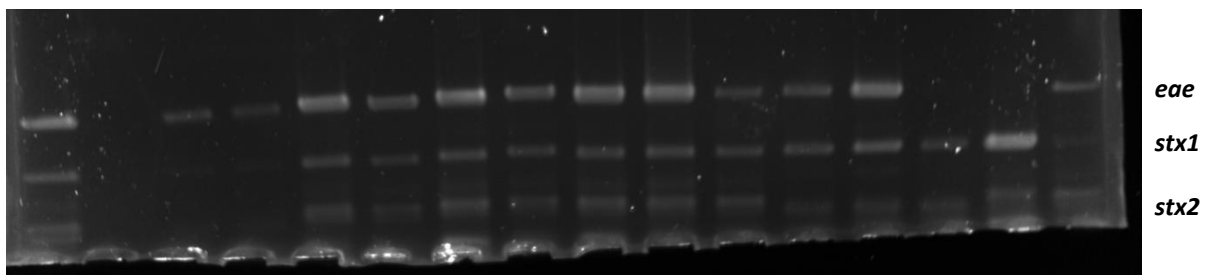
6	7	8	9	10	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Ref
81.9					190.5										



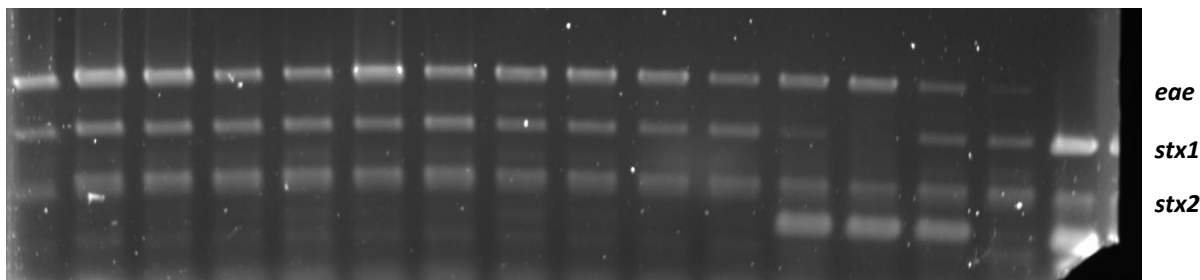
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
193.1										Blanco	Ref

Uit de elektroforeses bleek dat geen enkele kolonie van de stammen 190.5 en 193.1 het *stx2*-gen was verloren. Daarentegen bleken alle kolonies van de stammen 36.10 en 81.9 wel het *stx2*-gen te zijn verloren. De resultaten van deze elektroforeses zijn vreemd, aangezien deze stammen oorspronkelijk geen *stx1*-gen bezaten en sommige kolonies nu toch aankleuren voor het *stx1*-gen. Tevens is een deel van de kolonies negatief voor het *eae*-gen. Terwijl het *eae*-gen in het chromosomale DNA van de bacterie ligt en niet op een bacteriofaag of plasmide. Een bacterie kan het *eae*-gen normaal gezien niet kwijt spelen zoals wel het geval is voor de *stx*-genen. Hoogstwaarschijnlijk is er iets misgelopen met de PCR. Daarom zou de PCR best nog eens herhaald worden vooraleer hieruit conclusies kunnen worden getrokken.

Om na te gaan of de kolonies van de stammen 36.10 en 81.9 effectief het *stx2*-gen kwijt waren, werden er telkens 5 kolonies geselecteerd die *eae*-positief en *stx2*-negatief waren op de elektroforeses. Voor stam 36.10 waren dit de kolonies 1, 2, 6, 7 en 9. Voor stam 81.9 waren dit de kolonies 1, 5, 6, 7 en 8. De kolonies werden overgeënt op PCA en overnacht geïncubeerd. Nadien werden van elke plaat 2 subkolonies (a en b) gescreend op de aanwezigheid van virulentiegenen. Daarnaast werden de 4 originele *stx2*-positieve EHEC O26 stammen (36.10, 81.9, 190.5 en 193.1) nogmaals PCR-gescreend. Zij zouden geen *stx1*-gen bezitten maar alleen het *eae*- en *stx2*-gen.



a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	A		b
1		2		6		7		9		1		5		
36.10										81.9		Ref	193.1	



b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	
5	6		7		8									
81.9							36.10	81.9	190.5	193.1	Ref			

Alweer werden vreemde resultaten bekomen waaruit geen conclusies kunnen worden getrokken. Beide referentiestammen lijken op de eerste gel het *eae*-gen kwijt te zijn, terwijl dit normaal gezien niet kan. De virulentiegenen van subkolonie 36.10 1b lijken niet goed geamplificeerd te zijn, zelfs het *eae*-gen kleurt niet aan. Kolonie 2 van stam 36.10 bezit geen *stx2*-gen meer, wel nog het *eae*- en *stx1*-gen (lichtjes gekleurd). Alle 4 de originele *stx2*-positieve EHEC O26 stammen (36.10, 81.9, 190.5 en 193.1) bezitten het *stx1*-gen terwijl zij verondersteld werden *stx1*-negatief te zijn. Je zou kunnen vermoeden dat er een fout is met de gebruikte *eae*-primers aangezien sommige stalen hier niet op kleuren terwijl dit eigenlijk wel zou moeten. Omdat andere stalen wel *eae*-positief kleuren waren de gebruikte *eae*-primers wel goed en kunnen we dit uitsluiten. De 4 originele *stx2*-positieve EHEC O26 stammen zouden oorspronkelijk niet enkel *stx2*- maar ook *stx1*-positief kunnen geweest zijn. Er zou dan een fout zijn opgetreden in het verleden, bij de bepaling van de virulentiegenen van de originele stammen, waardoor het leek dat deze stammen geen *stx1*-gen bezaten maar dit eigenlijk wel het geval was. De fout zou kunnen geweest zijn dat, bij de bereiding van de mastermix, vergeten werd *stx1*-primer toe te voegen of dat de *stx1*-primer van slechte kwaliteit was. Beide fouten lijken niet te zijn opgetreden omdat de toen gebruikte referentiestam, waarvan geweten was dat het *stx1*-gen bezat, wel *stx1*-positief kleurde op de elektroforese. De gebruikte *stx1*-primer was dus wel goed en aanwezig in de mastermix. Indien de 4 originele *stx2*-positieve EHEC O26 stammen ook het *stx1*-gen bezaten, hadden zij dus moeten aankleuren.

6 Discussie

Het is niet gelukt om, in de beschikbare tijd, een EHEC O26 stam te isoleren die negatief is voor zowel het *stx1*- als *stx2*-gen. Een éénduidige verklaring hiervoor hebben we niet door de abnormale resultaten die telkens bekomen werden. Indien spontaan verlies van de *stx*-genen niet mogelijk is via subcultivatie, zullen andere alternatieven moeten verkend worden of zal er overwogen moeten worden om toch een originele stam te gebruiken voor de vaccinatieproef.

6.1 Antibiotica resistentie

Vooraleer de vaccinatieproef van start kan gaan, moeten de kalveren chronisch geïnfecteerd worden met een *Stx*-negatieve O26 EHEC stam. De geselecteerde stam moet resistent zijn aan een bepaalde concentratie antibioticum. Zo zal er een grote zekerheid zijn dat bij het kweken van deze stam, op een medium waarin dit antibioticum aanwezig is, de gevormde kolonies afkomstig zijn van deze stam en niet van andere bacteriën. Hierdoor zal er niet telkens elektroforese moeten gedaan worden om zeker te zijn dat het nog altijd de juiste stam is waarmee verder gewerkt wordt. Het medium zal ook gebruikt worden om het aantal bacteriën, die de kalveren uitscheiden, te kwantificeren. De werking van de verschillende vaccins en dosissen kan dan vergeleken worden.

Van de originele *Stx1*- en *Stx2*-positieve O26 EHEC stammen werd het antibioticaresistentie profiel opgevraagd (zie figuur 10). Op basis hiervan kan een antibioticum gekozen worden waartegen de geselecteerde stam al enige resistentie vertoont. De resistentie zal dan opgedreven worden door de stam telkens over te enten en te laten groeien in een medium (bv TSB) met een hogere concentratie van het antibioticum.

Uit het antibioticaresistentie profiel kunnen we afleiden dat alle stammen reeds resistentie vertonen tegenover cefalexine en colistine. Cefalexine heeft voornamelijk een gram-positief spectrum en colistine een gram-negatief spectrum. Aangezien dit geen breedwerkende antibiotica zijn, is het mogelijk dat bij contaminatie van de culturen ook andere bacteriën nog in staat zijn om te groeien. Daarom wordt er best gekozen voor een breedwerkend antibioticum of een combinatie van antibiotica. Wanneer de stam, waarmee men de kalveren wenst te infecteren, een oorspronkelijk *Stx1*-positieve O26 EHEC stam is, kan gekozen worden voor de combinatie cefalexine en colistine. De meeste gram-positieve en -negatieve kiemen zullen dan niet in staat zijn om op het medium te groeien. Indien de geselecteerde stam een oorspronkelijk *Stx2*-positieve stam is, kan gewerkt worden met het breedwerkende amoxicilline of doxycycline. Een combinatie van smalspectrum antibiotica, waartegen de stam al resistentie vertoont, is ook een optie.

Antibioticum	Stx1-positieve O26 EHEC stammen					Stx2-positieve O26 EHEC stammen			
	126.7	130.5	157.9	211.2	216.10	36.10	81.9	190.5	193.1
Amoxicilline	Gevoelig	Gevoelig	Gevoelig	Gevoelig	Inter-mediair	Resistent	Inter-mediair	Resistent	Resistent
Cefalexine	Inter-mediair	Inter-mediair	Inter-mediair	Inter-mediair	Inter-mediair	Inter-mediair	Inter-mediair	Resistent	Resistent
Colistine	Inter-mediair	Inter-mediair	Inter-mediair	Inter-mediair	Inter-mediair	Resistent	Resistent	Resistent	Resistent
Doxycycline	Gevoelig	Gevoelig	Gevoelig	Gevoelig	Gevoelig	Resistent	Gevoelig	Resistent	Resistent
Kanamycine	Gevoelig	Gevoelig	Gevoelig	Gevoelig	Gevoelig	Resistent	Gevoelig	Resistent	Resistent

Figuur 10: antibioticaresistentie profiel

6.2 Vaccinatieschema's

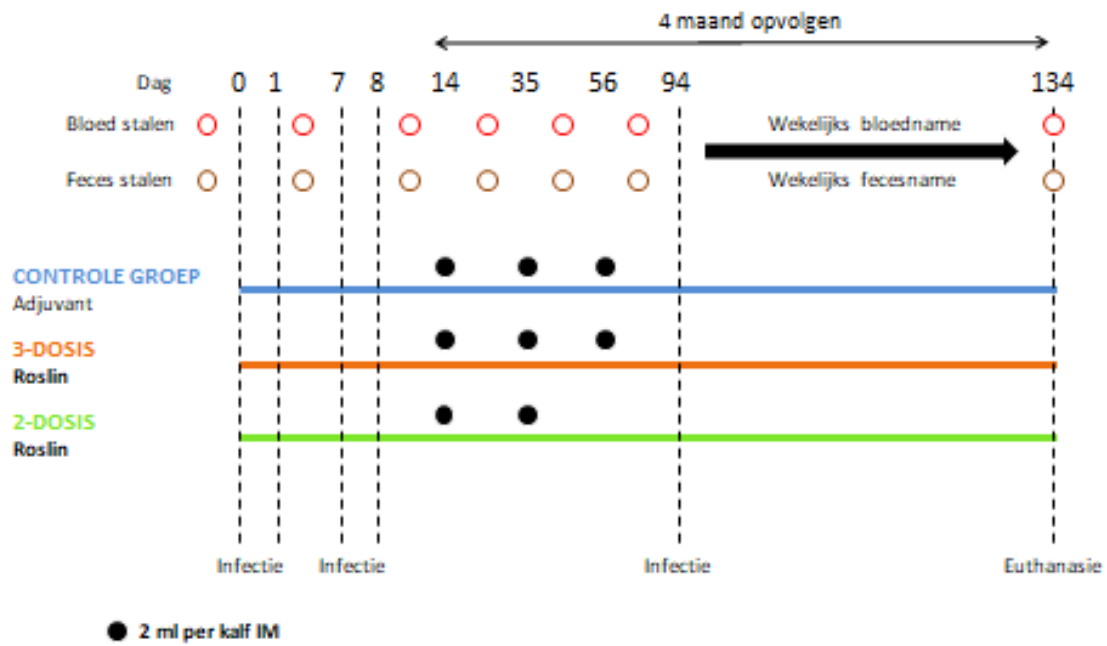
Voor de vaccinatieproef zullen kalveren, tussen 1 en 2 maanden oud, gescreend worden op de aanwezigheid van antistoffen in het bloed tegenover EspA, EspB en intimine en op de aanwezigheid van EHEC in de feces. Negatieve kalveren worden naar de faculteit gebracht en bij aankomst nogmaals gecontroleerd op afwezigheid. Per vaccin zullen er 18 kalveren ad random worden ondergebracht in één van de drie stallen. In elke stal zitten dan 6 kalveren die geblindeerd gevaccineerd zullen worden. Per stal zullen er 2 kalveren als controledieren dienen, 2 kalveren volgen het 3-dosis regime en 2 kalveren het 2-dosis regime. De kalveren zullen ad libitum gevoederd worden.

Na 1 week acclimatisatie worden de kalveren meermaals oraal geïnfecteerd met de O26 stam (10^{10} Cfu *E. coli*). De experimentele infectie zal plaats vinden op dag 0 en 1 van het experiment en een week later op dag 7 en 8. Uit vroeger onderzoek, van de vakgroep Immunologie van de Universiteit Gent campus Diergeneeskunde, is namelijk gebleken dat dit protocol aanleiding heeft tot een reproduceerbare chronische uitscheiding zoals op bedrijven wordt gezien. Bij 80% van de meermaals geïnfecteerde dieren duurde de uitscheiding meer dan 2 weken, terwijl bij 100% van de éénmalig geïnfecteerde dieren de uitscheiding minder dan 2 weken duurde (Kieckens et al., 2016). Op dag 94 zal er een éénmalige herinfectie plaatsvinden om continu contact met de O26 stam te garanderen om zo goed mogelijk de bedrijfssituatie na te bootsen.

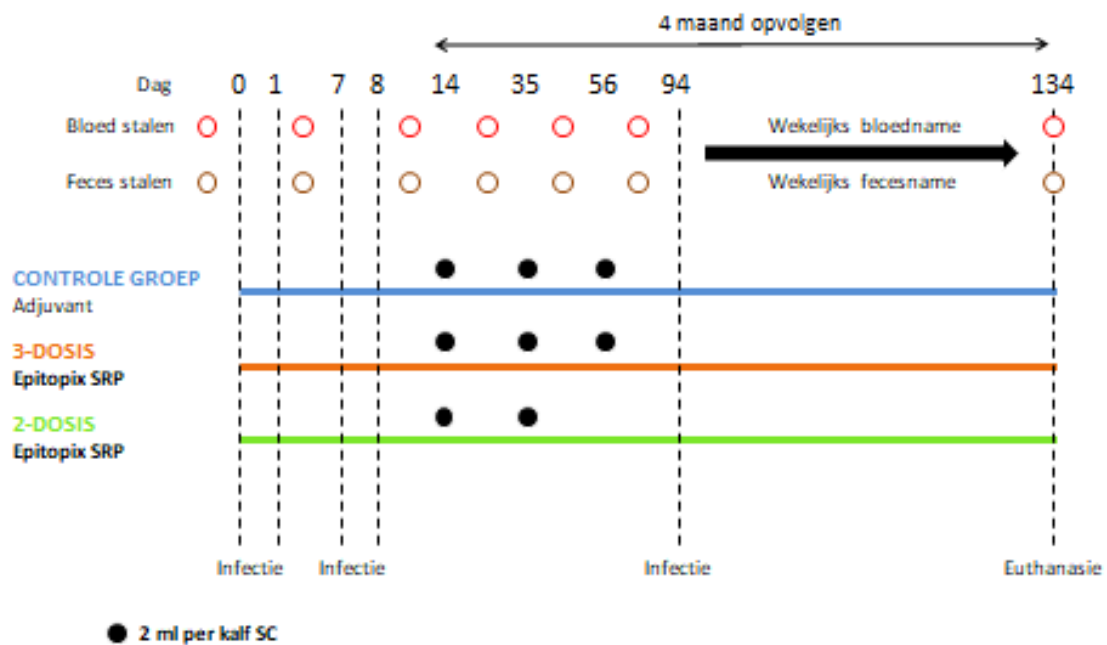
De vaccinaties zullen starten op dag 14 en herhaald worden, met een interval van 3 weken, op dag 35 en dag 56. Gedurende 4 maand zullen de kalveren opgevolgd worden door wekelijks feces en bloedstalen te nemen. Van elk kalf zal telkens de O26 excretie kwantitatief bepaald worden. Na euthanasie, via een penetrerende "captive bolt", zal er bij elk kalf ook nagegaan worden hoeveel bacteriën er nog aanwezig zijn in het jejunum, ileum, cecum, colon en rectum.

Uiteindelijk zal er worden nagegaan of er een significant verschil bestaat, in reductie van O26 excretie, tussen de 3 vaccinatiegroepen van elk vaccin. Indien er effectief sprake is van kruisbescherming tegen EHEC O26 zou O157 vaccinatie een rol kunnen spelen in de preventie van kalverdiarree veroorzaakt door non-O157 serotypes. Als O157 vaccinatie dan ook nog vergoed zou worden door de overheid zou dit de veeteelt kunnen aanzetten tot vaccinatie op grote schaal. Hierdoor zou de belangrijkste doelstelling kunnen bereikt worden, namelijk de voedselveiligheid verhogen.

Ter illustratie staan hieronder de vaccinatieschema's van het Roslin en Epitopix SRP vaccin (zie figuur 11 en 12).



Figuur 11: Roslin vaccinatieschema



Figuur 12: Epitopix SRP vaccinatieschema

7 Literatuurlijst

1. Alperi, A., Figueras, M.J., 2010. Human isolates of *Aeromonas* possess Shiga toxin genes (stx1 and stx2) highly similar to the most virulent gene variants of *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology and Infection* 16, 1563-1567.
2. Amirlak L., Amirlak B., 2006. Haemolytic uraemic syndrome: an overview. *Nephrology* 11, 213-218.
3. Bardiau, M., Mainil, J., Nahayo, A., Linden, A., Grégoire, F., Muylaert, A., Duprez, J.-N., 2010. Enteropathogenic (EPEC), enterohaemorrhagic (EHEC) and verotoxigenic (VTEC) *Escherichia coli* in wild cervids. *Journal of Applied Microbiology* 109, 2214-2222.
4. Bergholz, T.M., Whittam, T.S., 2007. Variation in acid resistance among enterohaemorrhagic *Escherichia coli* in a simulated gastric environment. *Journal of Applied Microbiology* 102, 352-362.
5. Bielaszewska, M., Prager, R., Köck, R., Mellmann, A., Zhang, W., Tschäpe, H., Tarr, P.I., Karch, H., 2007. Shiga toxin gene loss and transfer *in vitro* and *in vivo* during enterohemorrhagic *Escherichia coli* O26 infection in humans. *Applied and Environmental Microbiology* 73, 3144-3150.
6. Blease, S.C., French, A.T., Knight, P.A., Gally, D.L., Pemberton, A.D., 2009. Bovine intelectins: cDNA sequencing and expression in the bovine intestine. *Research in Veterinary Science* 86, 254-256
7. Bunger, J.C., Melton-Celsa, A.R., Maynard, E.L., O'Brien, A.D., 2015. Reduced toxicity of Shiga toxin (Stx) type 2c in mice compared to Stx2d is associated with instability of Stx2c holotoxin. *Toxins* 7, 2306–2320.
8. Cernicchiaro, N., Renter, D.G., Cull, C.A., Paddock, Z.D., SHI, X., Nagaraja, T.G., 2014. Fecal Shedding of Non-O157 Serogroups of Shiga Toxin–Producing *Escherichia coli* in Feedlot Cattle Vaccinated with an *Escherichia coli* O157:H7 SRP Vaccine or Fed a Lactobacillus-Based Direct-Fed Microbial. *Journal of Food Protection* 77,732–737.
9. Conly, J. M., Stein, K., Worobetz, L., and Rutledge-Harding, S. (1994). The contribution of vitamin K2 (menaquinones) produced by the intestinal microflora to human nutritional requirements for vitamin K. *The American Journal of Gastroenterology* 89, 515–923.
10. Conway, T., Cohen, P.S., 2015. Commensal and Pathogenic *Escherichia coli* Metabolism in the Gut. *Microbiology Spectrum* 3, 1-24.
11. Cox, E., Duchateau, L., Vanrompay, D., Kieckens, E., De Zutter, L., Rybarczyk, J., 2014. Clearance of *Escherichia coli* O157:H7 Infection in Calves by Rectal Administration of Bovine Lactoferrin. *Applied and Environmental Microbiology* 81, 1644-1651.
12. Cull, C.A., Paddock, Z.D., Nagaraja, T.G., Bello, N.M., Babcock, A.H., Renter, D.G., 2012. Efficacy of a vaccine and a direct-fed microbial against fecal shedding of *Escherichia coli* O157:H7 in a randomized pen-level field trial of commercial feedlot cattle. *Vaccine* 30 6210–6215.
13. Donnenberg, 2002. *Escherichia coli*: Virulence Mechanisms of a Versatile Pathogen
14. Fang, H., Kang, J., Zhang, D., 2017. Microbial production of vitamin B12: A review and future perspectives. *Microbial Cell Factories*, 1-14.
15. Fairbrother en Nadeau (2006). *Escherichia coli*: on-farm contamination of animals. Scientific and Technical Review of the Office International des Epizooties, 15.
16. Fox, J.T., Thomson, D.U., Drouillard, J.S., Thornton, A.B., Burkhardt, D.T., Emery, D.A., Nagaraja, T.G., 2009. Efficacy of *Escherichia coli* O157:H7 Siderophore Receptor/Porin Proteins–Based Vaccine in Feedlot Cattle Naturally Shedding *E. coli* O157. *Foodborne Pathogens And Disease* 6, 893-899.
17. Franz, E., 2009. risicofactoren en update Nederland 1–54.
18. Gally, D.L., McNeilly, T.N., Huntley, J.F., Mahajan, A., Smith, D.G.E., Erridge, C., Mitchell, M.C., Inglis, N.F., Nisbet, A.J., McAteer, S., Low, J.C., 2009. IgA and IgG antibody responses following systemic immunization of cattle with native H7 flagellin differ in epitope recognition and capacity

- to neutralise TLR5 signalling. *Vaccine* 28, 412–421.
19. Goldwater, P.N., Bettelheim, K.A., 2012. Treatment of enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) infection and hemolytic uremic syndrome (HUS). *BioMedCentral Medicine* 10, 1-8.
 20. Joris, M.A., Verstraete, K., de Reu, K., de Zutter, L., 2011. Loss of vtx genes after the first subcultivation step of verocytotoxigenic *escherichia coli* O157 and non-O157 during isolation from naturally contaminated fecal samples. *Toxins* 3, 672–677.
 21. Joris, M.-A., Vanrompay, D., Verstraete, K., De Reu, K., De Zutter, L., Cox, E., 2013a. Use of antibody responses against locus of enterocyte effacement (LEE)-encoded antigens to monitor enterohemorrhagic *Escherichia coli* infections on cattle farms. *Applied and Environmental Microbiology* 79, 3677–3683.
 22. Joris, M.-A., Verstraete, K., De Reu, K., De Zutter, L., 2013b. Longitudinal Follow-Up of the Persistence and Dissemination of EHEC on Cattle Farms in Belgium. *Foodborne Pathogens and Disease* 10, 295–301.
 23. Kieckens E, Rybarczyk J, Li R, Vanrompay D, Cox E, 2016. Potential immunosuppressive effects of *Escherichia coli* O157: H7 experimental infection on the bovine host. *BioMedCentral Genomics* 17, 1-15.
 24. Kieckens, E., Rybarczyk, J., Cox, E., Vanrompay, D., 2018. Antibacterial and immunomodulatory activities of bovine lactoferrin against *Escherichia coli* O157:H7 infections in cattle. *Biometals* 31, 321–330.
 25. Kremer Hovinga, J.A., Heeb, S.R., Skowronska, M., Schaller, M., 2018. Pathophysiology of thrombotic thrombocytopenic purpura and hemolytic uremic syndrome. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 16, 618–629.
 26. Lim, J.Y., Yoon, J.W., Hovde, C.J., n.d. A Brief Overview of *Escherichia coli* O157:H7 and Its Plasmid O157. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 20, 5–14.
 27. McNeilly, T.N., Mitchell, M.C., Corbishley, A., Nath, M., Simmonds, H., McAteer, S.P., Mahajan, A., Low, J.C., Smith, D.G.E., Huntley, J.F., Gally, D.L., 2015. Optimizing the protection of Cattle against *Escherichia coli* O157:H7 colonization through immunization with different combinations of H7 flagellin, Tir, intimin-531 or EspA. *PLoS One*, 1-19.
 28. Menge, C., Eisenberg, T., Stamm, I., Baljer, G., 2006. Comparison of binding and effects of *Escherichia coli* Shiga toxin 1 on bovine and ovine granulocytes. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 113, 392–403.
 29. Miyamoto, Y., Iimura, M., Kaper, J.B., Torres, A.G., Kagnoff, M.F., 2006. Role of Shiga toxin versus H7 flagellin in enterohaemorrhagic *Escherichia coli* signalling of human colon epithelium *in vivo*. *Cellular Microbiology* 8, 869–879.
 30. Moxley, R.A., Smith, D.R., 2010. Attaching-effacing *Escherichia coli* Infections in Cattle. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice* 26, 29-56.
 31. Munns, K.D., Selinger, L., Stanford, K., Selinger, L.B., McAllister, T.A., 2014. Are Super-Shedder Feedlot Cattle Really Super? *Foodborne Pathogens and Disease* 11, 329-331.
 32. Naylor, S.W., Gally, D.L., Huntley, J.F., Mahajan, A., Smith, D.G.E., McNeilly, T.N., Mitchell, M.C., Low, J.C., Deane, D., McAteer, S., 2008. *Escherichia coli* O157:H7 Colonization in Cattle following Systemic and Mucosal Immunization with Purified H7 Flagellin. *Infection and Immunity* 76, 2594–2602.
 33. Orth, D., Khan, A.B., Naim, A., Grif, K., Brockmeyer, J., Karch, H., Joannidis, M., Clark, S.J., Day, A.J., Fidanzi, S., Stoiber, H., Dierich, M.P., Zimmerhackl, L.B., Würzner, R., 2009. Shiga Toxin Activates Complement and Binds Factor H: Evidence for an Active Role of Complement in Hemolytic Uremic Syndrome. *The Journal of Immunology* 182, 6394-6400.
 34. Piérard, D., De Zutter, L., Cobbaut, K., Lauwers, S., n.d. Enterohemorrhagische *Escherichia coli* O157, andere serotypes en hun voorkomen in België bij mens, dier en in levensmiddelen. *Vlaams Infectieziektebulletin* 66, 15-19.
 35. Possé, B., De Zutter, L., Heyndrickx, M., Herman, L., 2007. Metabolic and genetic profiling of clinical O157 and non-O157 Shiga-toxin-producing *Escherichia coli*. *Research in Microbiology* 158,

591–599.

36. Qi, B., Han, M., 2018. Microbial Siderophore Enterobactin Promotes Mitochondrial Iron Uptake and Development of the Host via Interaction with ATP Synthase. *Cell* 175, 571-582.
37. Rafat, C., Coppo, P., Fakhouri, F., Frémeaux-Bacchi, V., Loirat, C., Zuber, J., Rondeau, E., 2017. Hemolytic and uremic syndrome and related thrombotic microangiopathies: Epidemiology, pathophysiology and clinics. *Revue de Medecine Interne* 38, 817-824.
38. Ro, E.Y., Ko, Y.M., Yoon, K.S., 2015. Survival of pathogenic enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) and control with calcium oxide in frozen meat products. *Food Microbiology* 49, 203–210.
39. Saeedi, P., Yazdanparast, M., Behzadi, E., Salmanian, A.H., Mousavi, S.L., Nazarian, S., Amani, J., 2017. A review on strategies for decreasing *E. coli* O157:H7 risk in animals. *Microbial Pathogenesis* 103, 186–195.
40. Scheutz, F., Teel, L.D., Beutin, L., Piérard, D., Buvens, G., Karch, H., Mellmann, A., Caprioli, A., Tozzoli, R., Morabito, S., Strockbine, N.A., Melton-Celsa, A.R., Sanchez, M., Persson, S., O'Brien, A.D., 2012. Multicenter evaluation of a sequence-based protocol for subtyping Shiga toxins and standardizing Stx nomenclature. *Journal of Clinical Microbiology* 50, 2951–2963.
41. Schneider, L.G., Klopfenstein, T.J., Stromberg, Z.R., Lewis, G.L., Erickson, G.E., Moxley, R.A., Smith, D.R., 2018. A randomized controlled trial to evaluate the effects of dietary fibre from distillers grains on enterohemorrhagic *Escherichia coli* detection from the rectoanal mucosa and hides of feedlot steers. *Zoonoses and Public Health* 65, 124-133.
42. Sheng, H., Knecht, H.J., Kudva, I.T., Hovde, C.J., 2006. Application of bacteriophages to control intestinal *Escherichia coli* O157:H7 levels in ruminants. *Applied and Environmental Microbiology* 72, 5359–5366.
43. Snedeker, K.G., Campbell, M., Sargeant, J.M., 2012. A Systematic Review of Vaccinations to Reduce the Shedding of *Escherichia coli* O157 in the Faeces of Domestic Ruminants. *Zoonoses and Public Health* 59,126–138.
44. Tarr, G.A.M., Oltean, H.N., Phipps, A.I., Rabinowitz, P., Tarr, P.I., 2018. Strength of the association between antibiotic use and hemolytic uremic syndrome following *Escherichia coli* O157:H7 infection varies with case definition. *International Journal of Medical Microbiology* 308, 921-926.
45. Tutenel, A. V., Pierard, D., Vandekerchove, D., Van Hoof, J., De Zutter, L., 2003. Sensitivity of methods for the isolation of *Escherichia coli* O157 from naturally infected bovine faeces. *Veterinary Microbiology* 94, 341–346.
46. Van Damme, I., Botteldoorn, N., Elhadidy, M., De Reu, K., Dierick, K., Verhaegen, B., De Zutter, L., Denayer, S., Verstraete, K., Heyndrickx, M., 2015. Evaluation of detection methods for non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from food. *International Journal of Food Microbiology* 219, 64–70.
47. Walle, K. Vande, Vanrompay, D., Cox, E., 2013. Bovine innate and adaptive immune responses against *Escherichia coli* O157: H7 and vaccination strategies to reduce faecal shedding in ruminants. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 152, 109– 120.
48. Wasteson, Y., 2002. Zoonotic *Escherichia coli*. *Acta Veterinaria Scandinavica* 95, 79-84.
49. Zoja, C., Buelli, S., Morigi, M., 2019. Shiga toxin triggers endothelial and podocyte injury: the role of complement activation. *Pediatric Nephrology* 34, 379-388.