

HET VOORKOMEN VAN OPKOMENDE BACTERIËLE VOEDSELPATHOGENEN OP VARKENSVLEES

Aantal woorden: 21.310

Sabrina Mujić

Studentennummer: 01901439

Promotor: Prof. dr. Kurt Houf

Promotor: Zeeshan Zafar

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

Academiejaar: 2022 – 2023

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

In dit kort voorwoord wil graag mijn dank betuigen aan de personen die geholpen hebben bij het tot stand brengen van deze masterproef. Om te beginnen wil ik mijn promotor, professor Kurt Houf, bedanken voor de goede begeleiding en het vele geduld. De gegeven adviezen waren direct en zeer duidelijk. Ik wist altijd wat er van mij verwacht werd, waardoor het maken van deze masterproef vlot verliep. En ook al duurde het soms zeer lang voor ik een geschreven stuk doorstuurde, bleef professor Houf vertrouwen in mij hebben dat ik alles op tijd zou afwerken. Ik heb alles kunnen uitwerken op mijn eigen tempo. Daar ben ik zeer dankbaar voor. Daarnaast wil ik ook Muhammad Zeeshan Zafar, mijn co-promotor en doctoraatsstudent, en Lore Heyvaert, doctoraatsstudente, bedanken voor de begeleiding. Zeeshan heeft mij, samen met Martine Boonaert (laborante), die ik uiteraard ook wil bedanken, begeleid in het labo. Daarnaast hebben hij en Lore mij goede uitleg gegeven over de resultaten die uit het onderzoek kwamen en al mijn vragen beantwoord. Zij hebben telkens tijd genomen om een afspraak te maken wanneer het nodig was. Martine wil ik ook bedanken voor de rondleiding in het labo en de uitgebreide uitleg. Zij was altijd enthousiast om mij zaken aan te leren en uit te leggen. Zonder deze personen zou het niet mogelijk zijn geweest om deze masterproef tot een goed einde te brengen.

Inhoudsopgave

1	Samenvatting	6
2	Inleiding	6
3	Varkensvleesproductie en -consumptie in België	7
4	Het voorkomen van de targetpathogenen op varkensvlees.....	13
5	Targetpathogenen	14
5.1	<i>Proteus mirabilis</i>	14
5.1.1	Taxonomie	14
5.1.2	Identificatie.....	18
5.1.3	Klinisch belang voor de mens.....	19
5.1.4	Voorkomen bij het varken	21
5.2	<i>Campylobacter concisus</i>	21
5.2.1	Taxonomie	21
5.2.2	Identificatie.....	27
5.2.3	Klinisch belang voor de mens.....	29
5.2.4	Voorkomen bij het varken	31
5.3	<i>Escherichia albertii</i>	31
5.3.1	Taxonomie	31
5.3.2	Identificatie.....	33
5.3.3	Klinisch belang voor de mens.....	35
5.3.4	Voorkomen bij het varken	36
6	Wat is MALDI-TOF-MS?	36
6.1	Werking.....	36
6.2	MALDI-TOF MS in de klinische bacteriologie.....	38
7	Doelstellingen	40
8	Materiaal en methoden.....	40
8.1	Staalname, verrijking van de bouillon en homogenisatie	40
8.2	Algemene analyse	41
8.2.1	Totaal aerob kiemgetal	41
8.2.2	<i>E. coli</i> telling.....	41
8.2.3	Telling vermoedelijke <i>Pseudomonas</i> species	41
8.3	Pathogenen	42
8.3.1	Detectie van thermofiele campylobacters	42
8.3.2	Detectie van <i>Salmonella</i>	42
8.4	Targetpathogenen	43
8.4.1	Detectie van niet-thermofiele campylobacters	43
8.4.2	Detectie en telling van <i>Proteus mirabilis</i>	43
8.4.3	Detectie en telling van <i>Escherichia albertii</i>	44
9	Resultaten	45

9.1	Algemene analyse	45
9.1.1	Totaal aeroob kiemgetal	45
9.1.2	<i>E. coli</i> telling.....	46
9.1.3	Telling vermoedelijke <i>Pseudomonas</i> species	46
9.2	Thermofiele campylobacters	47
9.3	<i>Salmonella</i>	47
9.4	Targetpathogenen	47
10	Discussie	50
10.1	Resultaten.....	50
10.1.1	Algemene analyse	50
10.1.2	Thermofiele <i>Campylobacter</i> spp.....	51
10.1.3	<i>Salmonella</i>	52
10.1.4	Targetpathogenen	53
10.2	Literatuur.....	54
10.3	Klinisch belang bij de mens	55
10.4	Voorkomen bij varkens	56
11	Conclusie	56
12	Referentielijst	57

1 Samenvatting

Bij voedselinfecties wordt er vaak gedacht aan bacteriën zoals *Escherichia coli*, *Campylobacter* spp. of *Salmonella* spp. Vele onderzoeken zijn gericht op de gekende voedselpathogenen. Nochtans blijkt uit onderzoek dat wanneer er minder selectieve media gebruikt worden, er ook andere bacteriële pathogenen op etenswaren van dierlijke oorsprong aanwezig kunnen zijn. In deze masterproef zal het voorkomen van niet-thermofiele *Campylobacter* species, *Proteus mirabilis* en *Escherichia albertii* op varkensvlees aangekocht op consumentenniveau onderzocht worden. Verschillende onderzoeken geven aan dat er een verhoogd risico is op infectie bij de mens en hebben aangetoond dat deze bacteriën in verhoogde aantallen aanwezig zijn bij patiënten met chronische maag-darm aandoeningen en dysbiose. Desondanks zijn er nog maar weinig studies gebeurd naar de prevalentie van deze pathogenen op vleeswaren. Uit de resultaten van deze masterproef is gebleken dat wanneer er effectief gezocht wordt naar deze pathogenen, dat deze wel degelijk gevonden kunnen worden. Daarnaast zijn ook *Proteus hauseri* en *Proteus vulgaris* verschillende keren geïsoleerd en geïdentificeerd geweest. Het lijkt er op dat deze veel meer voorkomen dan *Proteus mirabilis*. *Escherichia albertii* is niet gevonden. Omdat *E. albertii* geregeld verkeerdelijk geïdentificeerd wordt als een andere verwante bacterie is het mogelijk dat deze toch voorkomt. Wanneer er gekeken wordt naar het type vlees, blijkt varkensgehakt meer gecontamineerd dan varkensfilet. Omdat het aantal stalen niet voldoende is om een representatief beeld te vormen over de prevalentie van deze pathogenen, moet verder onderzoek gebeuren. Daarnaast kan de vraag gesteld worden hoe deze vleeswaren besmet worden en of deze pathogenen als commensaal of als pathogeen voorkomt bij de varkens zelf. Echter geven deze resultaten al een beeld over de situatie en kan er al een inschatting gemaakt worden van het risico op de volksgezondheid. Of dit risico significant is, zal verder onderzoek moeten uitwijzen.

2 Inleiding

Onderzoeken van de Wereldgezondheidsorganisatie (WHO) geven aan dat meer dan 70% van de infectieuze agentia zoönotisch zijn. Voor veel van de bacteriële opkomende pathogenen lijken eetwaren, vooral van dierlijke oorsprong, een belangrijke bron van besmetting te zijn. Vaak wordt in eerste instantie gedacht aan bacteriën zoals onder andere *Escherichia coli*, *Campylobacter* spp. of *Salmonella* spp. als mogelijk agens. Echter wordt op vandaag bij ongeveer 78% van de enteritis cases bij mensen nog geen oorzakelijk agens gevonden (Humphries and Linscott, 2015). Dit betekent dat voor een groot deel van de voedselinfecties geen oorzaak kan worden geïdentificeerd.

De afgelopen jaren heeft onderzoek naar door voedsel overgedragen pathogenen zich voornamelijk toegespitst op de gekende pathogenen. Pathogenen worden vooral onderzocht met cultuur-afhankelijke en nu meer en meer met cultuur-onafhankelijke methodes. De cultuur-onafhankelijke methodes hebben echter niet de mogelijkheid om lage aantallen pathogenen te detecteren. Een voorbeeld van een cultuur-onafhankelijke methode is het gebruik van 16S amplicon sequencing. Hierbij wordt een bacteriële populatie gescreend op het voorkomen van vooral gekende pathogenen. Er wordt dus in veel gevallen niet direct naar andere mogelijke pathogenen gezocht. De cultuur-afhankelijke methodes hebben op vandaag een zeer doorgedreven selectiviteit en specificiteit. Isolaten die fenotypisch voldoen aan bepaalde voorop opgestelde karakteristieken worden als verdacht of typisch beschouwd, en verder onderzocht.

Uit onderzoek uitgevoerd in het labo van Prof. Houf en uit internationaal onderzoek is naar voren gekomen dat wanneer minder selectieve analysemethoden worden gebruikt, ook andere bacteriële pathogenen op producten van dierlijke oorsprong kunnen worden geïsoleerd.

Met de analysestrategie die momenteel gebruikt wordt, kunnen deze opkomende pathogenen niet of verlaat worden gedetecteerd. In het project waar deze masterproef betrekking op heeft, zal gefocust worden op drie pathogenen, de zogenaamde targetpathogenen: niet-thermofiele *Campylobacter* species, meer specifiek *Campylobacter concisus*, *Campylobacter curvus* en *Campylobacter rectus*, *Proteus mirabilis* en *Escherichia albertii*. Daarbij zal het voorkomen van deze pathogenen op vlees, aangekocht op consumentenniveau, onderzocht worden. Deze targetpathogenen zijn gekozen omdat beschikbare wetenschappelijke data aangeven dat er een verhoogd risico is op infecties bij de mens. Deze bacteriën blijken ook in hogere aantallen aanwezig bij patiënten met chronische maag-darm aandoeningen en dysbiose. (Costa and Iraola, 2019; Farmer et al., 1985; Hamilton et al., 2018) Uit onderzoek uitgevoerd door Bilulu, een netwerk van 9 Vlaamse ziekenhuis laboratoria in 2020, is naar voren gekomen dat klinische stoelgangstalen 7% niet-thermofiele campylobacters en 4% *Proteus mirabilis* bevatten. (Yu et al., 2021)

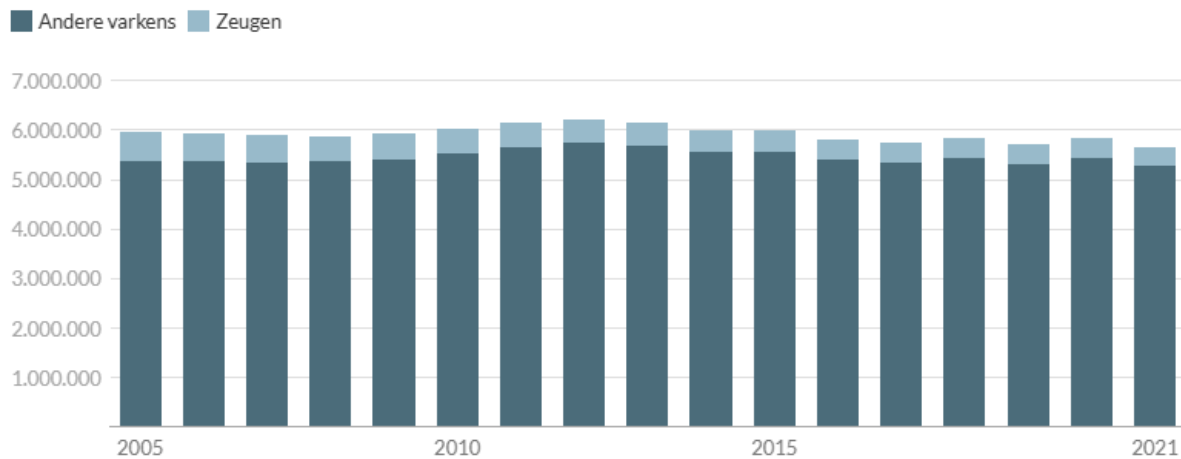
Campylobacter concisus, *C. curvus*, *C. rectus*, *P. mirabilis* en *E. albertii* worden dus beschouwd als opkomende voedselpathogenen. Uit onderzoek is namelijk naar voren gekomen dat bovenstaande pathogenen een klinisch beeld geven gelijkaardig aan andere voedselpathogenen (Costa and Iraola, 2019a). Echter behoren deze pathogenen nog niet tot het standaard klinisch screeningspakket waardoor de klinische incidentie nog altijd onbekend is.

Er is op dit moment weinig tot geen wetenschappelijke data over het voorkomen van bovenstaande species op Belgische eetwaren van dierlijke oorsprong. De meeste voedseluitbraken met *E. albertii* zijn bijvoorbeeld gerapporteerd in Japan en de Verenigde Staten. Zoals eerder aangegeven wordt ongeveer 70% van de infectieuze agentia overgedragen via producten van dierlijke oorsprong. Echter wordt maar in 22% van de klinische gevallen het oorzakelijke agens gevonden.

Deze masterproef betreft een onderzoek naar het voorkomen van de targetpathogenen op rauw varkensvlees aangekocht op consumentenniveau. Er zullen stalen genomen worden van varkensgehakt en varkensvlees aangekocht op detailniveau, waaronder supermarkten, slagerijen en markten. De hoofddoelstelling van deze masterproef is om het risico op een besmetting op consumentenniveau te bepalen. De stalen zullen geanalyseerd worden door een combinatie van verschillende isolatiemethoden die gekoppeld zullen worden aan high-throughput MALDI-TOF MS voor identificatie.

3 Varkensvleesproductie en -consumptie in België

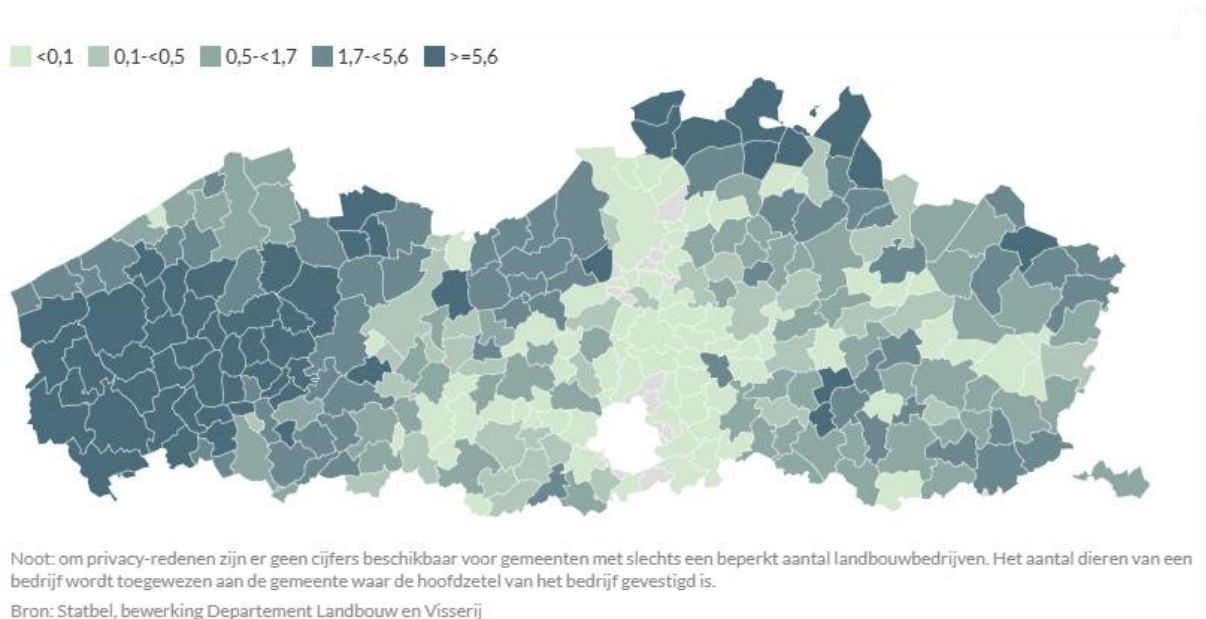
Het Vlaams departement van landbouw en visserij houdt cijfers bij over de grote van de veestapel in Vlaanderen. In 2021 waren er 5,66 miljoen varkens in Vlaanderen. Slechts een klein deel hiervan zijn zeugen. Figuur 1 geeft een overzicht van het aantal varkens tussen 2005 en 2021. Het aantal varkens in Vlaanderen ligt sinds 2005 rond de 6 miljoen, maar de voorbije jaren zijn de aantallen lichtjes aan het dalen. Het aantal zeugen bijvoorbeeld is al een tijd aan het dalen. In 2021 waren er 34% minder zeugen dan in 2005.



Bron: Statbel, bewerking Departement Landbouw en Visserij

Figuur 1: Een grafiek¹ die het aantal varkens in het Vlaamse gewest weergeeft over de periode 2005-2021. De lichtblauwe balkjes vertegenwoordigen de zeugen, de donkerblauwe balkjes zijn de andere varkens.

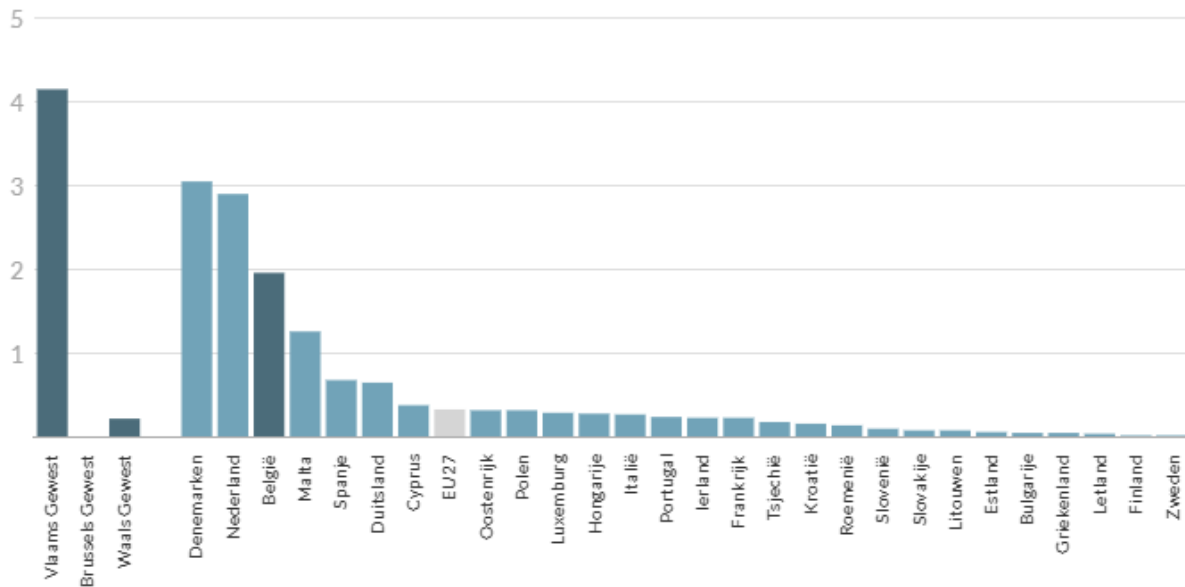
De varkens zijn niet evenredig verdeeld over het Vlaamse gewest. De meeste varkens bevinden zich in West-Vlaanderen. Ook in het Meetjesland, het Waasland, de Noorderkempen en in Noord-Limburg is er een hoge dichtheid aan varkens. De situatie in 2021 wordt weergegeven in figuur 2.



Figuur 2: De varkensdichtheid in de gemeenten van het Vlaamse gewest in 2021. Het aantal varkens per hectare worden weergegeven¹.

Gemiddeld waren er 4,16 varkens per hectare in het Vlaamse gewest, 0,23 varkens per hectare in het Waals gewest en 1,97 varkens per hectare in België. Dit maakt België, na Denemarken en Nederland, het land met de 3^{de} hoogste dichtheid aan varkens. In figuur 3 wordt de dichtheid aan varkens per hectare voor de 27 landen in de Europese Unie vergeleken. De dichtheid voor de drie gewesten in België worden ook vergeleken met de andere landen.

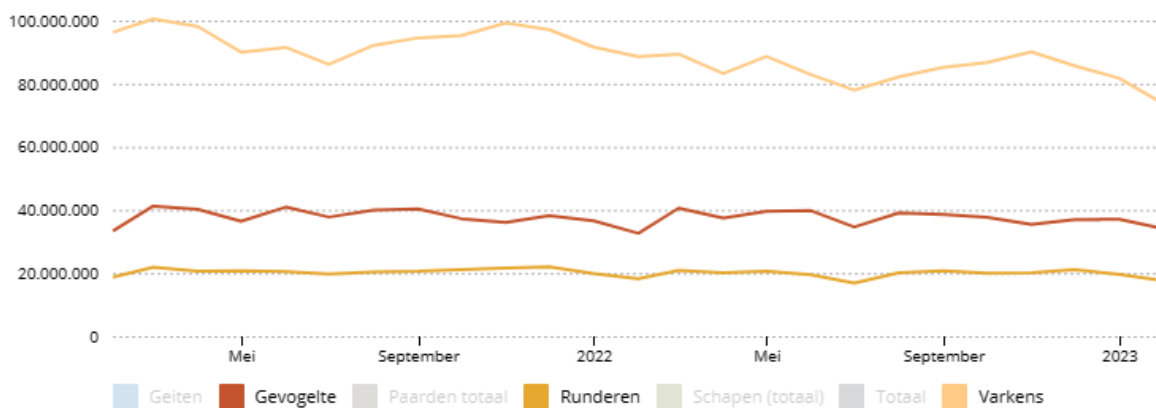
¹ <https://www.vlaanderen.be/statistiek-vlaanderen/landbouw-en-visserij/veestapel#57-miljoen-varkens>, geraadpleegd op 14 januari 2023.



Figuur 3: De grafiek¹ geeft een overzicht van de dichtheid aan varkens in de drie gewesten in België en de 27 landen in de Europese Unie in 2021. De waarden worden weergegeven in aantal varkens per hectare.

Cijfers over het aantal geslachte varkens en het totale slachtgewicht kunnen gevonden worden op de website van Statbel, het Belgisch statistiekbureau. De cijfers werden verzameld op basis van de beschikbare gegevens in de databanken van het FAVV. Het aantal varkens zijn de varkens die zijn geslacht in een slachthuis, gekeurd zijn en geschikt verklaard zijn voor menselijke consumptie. Het slachtgewicht, uitgedrukt in kilogram (kg), is het gewicht van het karkas na het slachten. Dit wordt ook wel het koud gewicht genoemd.

Geslacht gewicht in kg



Figuur 4: Een grafiek die het slachtgewicht in kg weergeeft voor gevogelte, runderen en varkens².

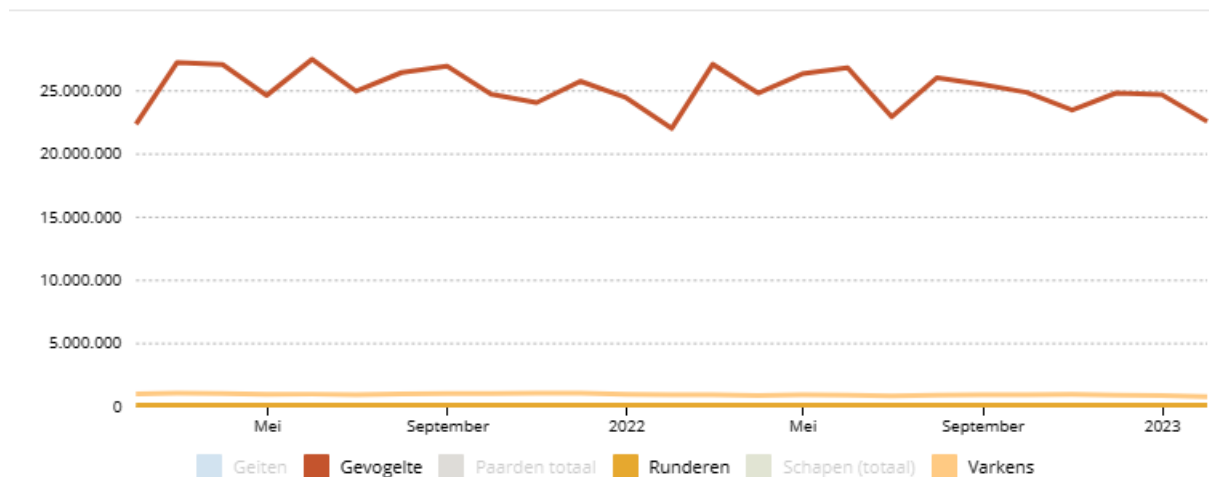
In België vertegenwoordigt de varkenssector het grootste aandeel van de vleesproductie. Daarnaast hebben de rundveesector en de pluimveesector, met name de kippenindustrie, ook een groot aandeel in de vleesproductie. Andere sectoren, zoals deze van de kleine herkauwers (schapen en geiten) en deze van de paarden, zijn zeer klein ten opzichte van de drie grootste sectoren. Figuur 4 geeft het totaal slachtgewicht weer van gevogelte, runderen en varkens ten

² <https://statbel.fgov.be/nl/themas/landbouw-visserij/geslachte-dieren#panel-12>, geraadpleegd op 10 mei 2023.

opzichte van elkaar. Er wordt meer dan dubbel zo veel varkensvlees geproduceerd dan gevogelte en ongeveer vijf keer meer dan rundsvlees.

Als er gekeken wordt naar het aantal dieren die geslacht worden, is het duidelijk dat er veel meer pluimvee geslacht wordt dan andere dieren. Dit komt doordat de opfokperiode zeer kort is ten opzichte van varkens en runderen. In figuur 5 worden de aantallen geslachte varkens, runderen en pluimvee weergegeven.

Aantal geslachte dieren



Figuur 5: Het aantal geslachte varkens, runderen en pluimvee in België^{Error! Bookmark not defined.}.

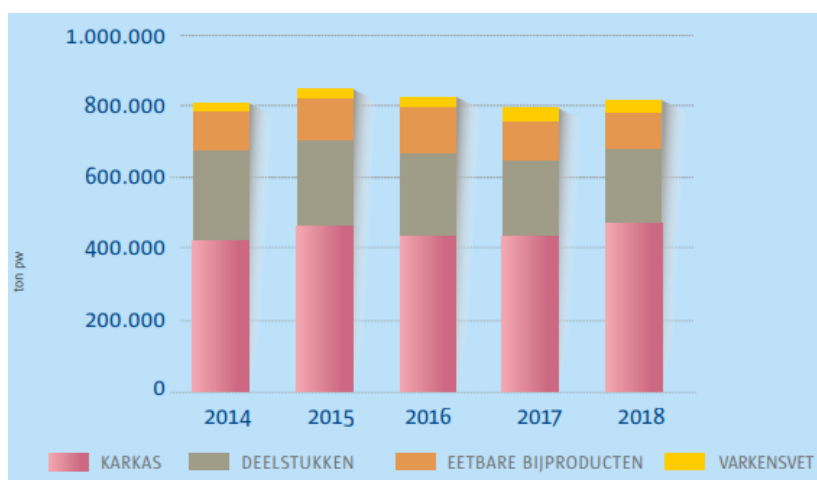
Van de perioden 2019 tot 2022 zijn er volledige jaarrapporten beschikbaar. In deze jaarrapporten zijn cijfers beschikbaar voor het Vlaams en Brussels hoofdstedelijk gewest, het Waals gewest en het volledige land. Tabel 1 geeft een overzicht van de cijfers voor deze periode. Het aantal varkens dat in het Waals gewest geslacht wordt is relatief beperkt. Het overgrote deel wordt geslacht in Vlaanderen. Dit is logisch aangezien het merendeel van de varkens gehouden worden in Vlaanderen. Voor beide regio's en voor België zijn de cijfers licht stijgend tot 2021. In 2022 zijn er in België ongeveer 10% minder varkens geslacht ten opzichte van 2021³. De redenen hiervoor waren waarschijnlijk de aanhoudende slechte prijzen en het onzekere wettelijke kader. Verschillende varkenshouders zijn hierdoor gestopt waardoor er minder varkens gehouden werden en er dus minder dieren geslacht konden worden. Daarnaast was er ook de dalende vraag naar varkensvlees. Dit kwam deels door de coronacrisis en de verminderde vraag naar varkens vanuit Europa naar China. Dit laatste is nog steeds een gevolg van de Afrikaanse varkenspest (2018). Er zijn verschillende markten die nog niet zijn opengesteld voor exporteurs. Op basis van het gewicht maakt varkensvlees nog altijd het grootste aandeel in het aantal slachtingen in België. Dit bedraagt ongeveer 60% van het totaal slachtgewicht in 2022. Elke maand werden er gemiddeld 877.000 varkens geslacht in België.

³https://vilt.be/nl/nieuws/slachtingen-runderen-en-varkens-op-laatste-niveau-in-30-jaar?utm_medium=email&utm_campaign=Nieuwsbrief%20Vilt%20-%202023-02-2023&utm_content=Nieuwsbrief%20Vilt%20-%202023-02-2023+CID_3ef2b82fecbe982ef06069f88b0bb0cb&utm_source=nieuwsbrieven%20Vilt&utm_term=Lees%20meer, geraadpleegd op 26 februari 2023.

Tabel 1: Een overzicht van het aantal geslachte varkens en het totale slachtgewicht, in kg, voor de gewesten en België voor de jaren 2019, 2020, 2021 en 2022⁴.

		Vlaams + Brussels Hoofdstedelijk gewest	Waals gewest	België
2019	Aantal slachtingen	10.018.430	701.106	10.719.536
	Totaal slachtgewicht (kg)	970.667.781	68.248.620	1.038.916.401
2020	Aantal slachtingen	10.420.962	729.280	11.150.242
	Totaal slachtgewicht (kg)	1.025.197.234	75.517.253	1.098.714.487
2021	Aantal slachtingen	10.793.312	791.347	11.584.659
	Totaal slachtgewicht (kg)	1.062.770.171	77.232.197	1.140.002.368
2022	Aantal slachtingen	9.810.633	709.695	10.520.328
	Totaal slachtgewicht	954.629.548	77.567.006	1.032.196.554

België is de 5^{de} netto exporteur van varkensvlees in de Europese Unie. 91% wordt binnen de Europese Unie geëxporteerd en 9% naar 3^{de} landen⁵. De export van varkensvlees steeg in 2018 met 2,7% naar 815.609 ton⁶. Afbeelding 6 toont de verhoudingen van de producten die geëxporteerd werden.



Figuur 6: Een overzicht van de verhoudingen tussen de producten die geëxporteerd werden in hoeveelheid ton⁷

De belangrijkste exportbestemming is Duitsland. Polen staat op de 2^{de} plaats en wordt gevolgd door Nederland, het Verenigd koninkrijk en Tsjechië. Afbeelding 7 toont de percentages van de exporthoeveelheid naar verschillende landen.

⁴<https://bestat.statbel.fgov.be/bestat/crosstable.xhtml?view=c7c4200e-42d4-47ea-9546-3e18dc9a15a4>, geraadpleegd op 14 januari 2023.

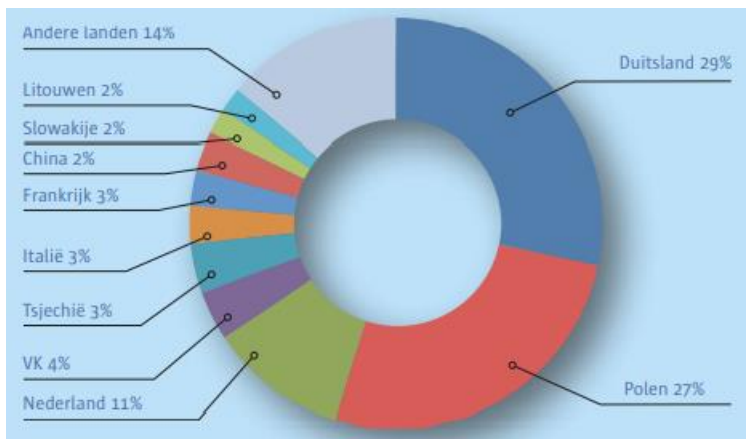
⁵ <https://www.belgianmeat.com/nl/product/varkensvlees>, geraadpleegd op 23 januari 2023.

⁶

https://www.belgianmeat.com/sites/vlamfresh_meat/files/publication/file/Belgisch%20vlees_Feiten%20%26%20cijfers_2019.pdf, geraadpleegd op 24 januari 2023.

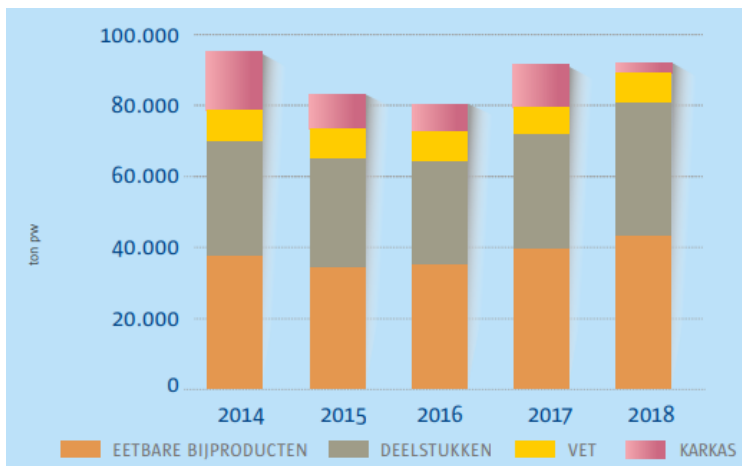
⁷

https://www.belgianmeat.com/sites/vlamfresh_meat/files/publication/file/Belgisch%20vlees_Feiten%20%26%20cijfers_2019.pdf, geraadpleegd op 24 januari 2023.



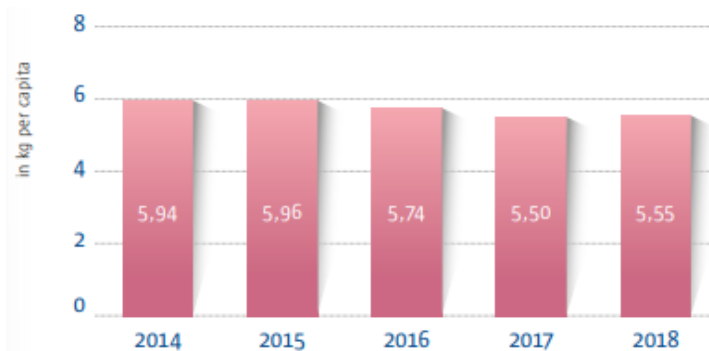
Figuur 7: De percentages van export naar verschillende landen⁷.

De totale export naar Nederland steeg in 2018 met 11% tot 92.386 ton. Vooral eetbare bijproducten worden geëxporteerd. Ook deelstukken, vet en karkassen worden geëxporteerd naar Nederland. Afbeelding 8 toont de verhoudingen tussen de producten. De uitvoer van deelstukken steeg in 2018 met 17%.



Figuur 8: De verhouding tussen de verschillende producten die geëxporteerd worden naar Nederland in ton⁷.

Vlees in het algemeen wordt vooral thuis geconsumeerd. Voor varkensvlees wordt 75% van het geconsumeerde vlees thuis bereid en opgegeten. Het vlees wordt het meest gekocht bij supermarkten, slaggers en markten. De consumptie van vlees is de laatste jaren aan het dalen. Ook voor varkensvlees is er een licht dalende trend. Afbeelding 9 toont een grafiek die deze trend weergeeft. Het aandeel varkensvlees in de vleesconsumptie is nog steeds de grootste en bedroeg 31% van de totale vleesconsumptie in België qua volume.



Figuur 9: De grafiek geeft de licht dalende trend van de consumptie van varkensvlees weer⁷.

4 Het voorkomen van de targetpathogenen op varkensvlees

In België en in Europa zijn er nagenoeg geen of zeer weinig studies over het voorkomen van de targetpathogenen op varkensvlees. In andere werelddelen zijn er wel studies of casereports, hetzij zeer beperkt.

In India is er een studie uitgevoerd naar het voorkomen van een brede range aan voedselpathogenen, waaronder ook *P. mirabilis*, op traditionele voedingsproducten in het Noordoosten van India. Hierbij werd *P. mirabilis* gevonden in gefermenteerd varkensvlees, zelfs in alarmerende hoeveelheden. Verder onderzoek naar virulentiegenen geven aan dat deze aanwezig zijn. Dit geeft aan dat *P. mirabilis* een gevaar voor de volksgezondheid kan zijn. (Keisam et al., 2019)

Er is een casereport over een voedselvergiftiging die specifiek veroorzaakt zou zijn door *P. mirabilis* door het eten van gestoofde varkensballetjes in bruine saus in Beijing, China. De kok en de serveerster zouden de bron zijn geweest die het eten hebben besmet. Beiden zijn in aanraking geweest met het eten zonder het wassen van de handen. Daarnaast wordt de oorzaak ook gelegd bij het niet optimaal verwarmen van het vlees. (Wang et al., 2010) Belangrijk om bij deze case op te merken is dat hier niet het vlees de bron van de infectie was. Dit incident werd dan wel veroorzaakt door *P. mirabilis*, maar het verband met het eten van varkensvlees, kon hierbij niet aangetoond worden.

Uit een studie naar het voorkomen van antibioticaresistentie en plasmiden analyse uitgevoerd in Nigeria (Uzeh et al., 2021), kan er van de bekomen resultaten van uitgegaan worden dat *P. mirabilis* wel degelijk circuleert, maar er kan niet afgeleid worden dat varkensvlees een bron is voor entropathologische ziekten. Varkensvlees bleek ook niet het meest besmette vlees te zijn met *P. mirabilis*. Dit waren rundsvlees en schapenvlees.

In Brazilië heeft Sanches et al., (2021) een studie uitgevoerd naar *P. mirabilis* geïsoleerd uit urineweginfecties en uit vleesproducten. Hoewel deze studie niet gaat over gastro-intestinale infecties, is het een van de weinige studies die specifiek het voorkomen van *P. mirabilis* onderzocht op vleesproducten. De studie toont ook het belang van *P. mirabilis* aan als potentieel zoönotisch pathogeen. De studie onderzocht het voorkomen, het virulentieprofiel en de gelijkenissen tussen *P. mirabilis* geïsoleerd uit kippenvlees, rundsvlees en varkensvlees en deze geïsoleerd uit patiënten met een urineweginfectie veroorzaakt door *P. mirabilis*. In totaal zijn er 920 stalen, waarvan 360 stalen varkensvlees, en 200 isolaten van *P. mirabilis* van patiënten met een urineweginfectie onderzocht. Het vlees was afkomstig van slagerijen in supermarkten. Uit 83 (23,05%) stalen varkensvlees kon *P. mirabilis* geïsoleerd worden. Alle isolaten van de stalen vertoonden virulentiefactoren die betrokken zijn bij de infectie van *P. mirabilis* in de urinewegen. De isolaten op varkensvlees vertoonden op zijn minst vier virulentiegenen. Alle isolaten vertoonden ook een agressief adhesiepatroon in HEp-2 cellen. 77 (92,8%) isolaten van varkensvlees vertoonde cytotoxische effecten in Vero cellen. De meeste isolaten van varkensvlees vormden een zwakke biofilm. Sommigen vormden zeer sterke, sterke en gemiddelde biofilms. Uit het onderzoek kan geconcludeerd worden dat vleesproducten een bron van besmetting kunnen zijn. Kippenvlees is het sterkst gecontamineerd met stammen die de meeste virulentiefactoren vertonen. Er is geen verschil in contaminatie tussen rundsvlees en varkensvlees. Het hygiënisch verwerken van vlees is belangrijk aangezien *P. mirabilis* een duidelijk zoönotisch potentieel heeft.

In Ierland werd een studie gevoerd (Lynch et al., 2011) naar het voorkomen van verschillende *Campylobacter* spp. in vers vlees in supermarkten en bij slaggers. Bij de *Campylobacter* spp. bevonden zich ook *C. concisus* en *C. curvus*. Het doel van deze studie was het uitzoeken welke species zich op het vlees bevonden en of het vlees een potentiële vector kon zijn voor

het overbrengen van o.a. niet-thermofiele campylobacters die klinisch relevant zouden kunnen zijn. Uit de resultaten kwam dat varkensvlees één van de hoogste prevalenties vertoonde na rundsvlees, maar wel met het minst aantal verschillende species. Naast de 2 meest voorkomende campylobacters, *C. jejuni* en *C. coli*, werd ook *C. curvus* en *C. fetus* gevonden. Ondanks het feit dat *C. curvus* is gevonden, zijn er nog geen cases waarbij voedsel de bron van een infectie zou zijn, gedocumenteerd.

Een studie in Ierland (Scanlon et al., 2013) onderzocht het voorkomen van niet-thermofiele *Campylobacter* spp. in de caecuminhoud van varkens en op onder andere karkassen van varkens en verwerkte producten in de supermarkt. In 3 slachthuizen in verschillende regio's en van verschillende grootte werden swabs genomen van caecale inhoud en van karkassen. In de retail werden stalen verzameld van rauwe varkensworsten, varkensgehakt, karbonades en andere stukken varkensvlees. De studie toonde aan dat niet-thermofiele campylobacters in hogere mate aanwezig zijn op varkensproducten dan gedacht en dat *C. concisus* de 2^{de} meest geïsoleerde species was. 10% van de stalen was positief voor *C. concisus*. *Campylobacter curvus* werd maar in 1 caecum staal gevonden. De meeste isolaten hadden bepaalde virulentiegenen en vertoonden antibioticaresistentie. Of dit op termijn een risico kan vormen voor de volksgezondheid moet nader onderzocht worden. Uit de studie bleek dat *C. concisus* consistent op alle varkensstalen voorkwam. Omdat een aanzienlijk percentage voorkomt op varkensproducten in de winkel en gevonden wordt in stoelgangstalen van patiënten en bij diarree, is dit een indicatie dat *C. concisus* een zoönotische transmissieroute heeft. Verder onderzoek moet gebeuren om dit te bevestigen. De isolatie van deze niet-thermofiele *Campylobacter* werd uitgevoerd met een methode die specifiek hiervoor is ontwikkeld.

Het voorkomen van *C. rectus* op varkensvlees en zijn eventuele betrokkenheid bij gastro-enteritis is nog niet beschreven in de literatuur. Ook over *C. curvus* is weinig tot geen literatuur te vinden.

Escherichia albertii wordt vaak verward als *E. coli*. In China is er een studie (Wang et al., 2016) uitgevoerd naar het voorkomen van *E. albertii* op rauw vlees op distributieniveau. Van de 446 stalen, waarvan 41 stalen varkensvlees, die onderzocht werden, was maar één varkensstaal positief. De meest besmette vleesproducten waren kippendarmen en eendendarmen. Deze studie bewijst niet dat varkensvlees een mogelijke bron is voor *E. albertii*.

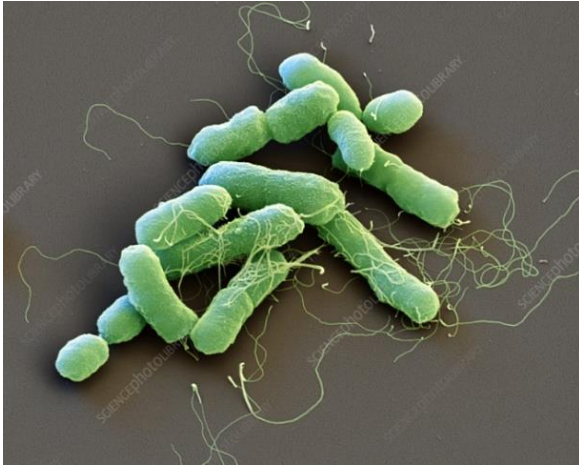
Verder zijn er geen andere publicaties over het voorkomen van *E. albertii* op varkensvlees en zijn betrokkenheid bij uitbraken van gastro-enteritis. Dit kan deels het gevolg zijn dat *E. albertii* vaak aanzien wordt als *E. coli*. Hierdoor wordt de prevalentie onderschat. Verder diepgaander onderzoek is vereist om de prevalentie te bepalen.

5 Targetpathogenen

5.1 *Proteus mirabilis*

5.1.1 Taxonomie

Proteus mirabilis behoort tot de familie van de *Enterobacteriaceae* en daarbinnen tot het genus *Proteus*. Het genus *Proteus* is sterk gerelateerd aan de genera *Morganella* en *Providentia*. Binnen het genus *Proteus* zijn er 10 species bekend: *P. mirabilis*, *P. vulgaris*, *P. penneri*, *P. terrae*, *P. hauseri*, *P. faecis*, *P. columbea*, *P. cibi*, *P. cibarius* en *P. alimentorum*. Het zijn allemaal facultatief anaerobe, Gram-negatieve staven met flagellen rondom het lichaam waardoor ze beweeglijk zijn. Figuur 10 toont een scanning electron micrograph van *P. mirabilis*.



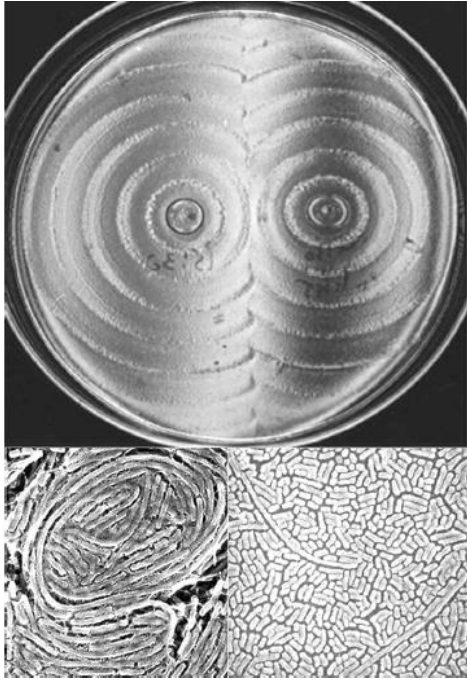
Figuur 10: Een ingekleurde scanning electron micrograph (SEM) van *P. mirabilis*. Deze staafvormige bacteriën kunnen bedekt zijn met flagellen die zich overal op het oppervlak bevinden.⁸

Proteus mirabilis en *P. vulgaris* waren de twee eerste species die tot dit genus behoorde. Beiden hebben de drang om te zwermen. De splitsing van deze twee species is onder andere gebaseerd op de snelheid waarbij ze gelatine vloeibaar maken. *Proteus vulgaris* doet dit sneller dan *P. mirabilis*. Alle species produceren waterstofsulfaat en fermenteren geen lactose. *Proteus vulgaris* fermenteert glucose, sucrose en maltose, terwijl *P. mirabilis* enkel glucose goed fermenteert. Sucrose wordt langzaam gefermenteerd en maltose niet. (Mohr O'hara et al., 2000)

Soorten die behoren tot het genus *Proteus* worden beschouwd als commensalen in het spijsverteringsstelsel. In verhouding met het volledige microbioom vormen ze maar een zeer klein deel (<0,05%) van de flora. Dit maakt dat detectie via onder andere 16S proliferering en metagenomie moeilijk is. (Hamilton et al., 2018b)

Proteus mirabilis is een korte (1,5-2µm) staaf die kan voorkomen als zwemmer of zwermers. De zwemmers zijn dominant in vloeibare omgevingen. Ze komen dan voor als enkele cellen met 4 tot 10 flagellen die over de hele oppervlakte voorkomen. Bij zwermende kolonies wordt er een typerend "bull's eye" patroon gevormd op cultuurplaten. Dit patroon wordt geïllustreerd op figuur 11. Dit komt door een cyclisch proces van zwermen en consolidatie. In een viskeuze omgeving of op vaste oppervlakken wordt er een metamorfose ondergaan naar filamenteuze zwermcellen die meerdere nuclei bevatten en veel flagellen hebben. Hierna volgt er een consolidatiefase waarbij de bacteriën weer korter worden. Tijdens deze fase worden er metabolische voorbereidingen getroffen voor de zwermfase. Tijdens het zwermen is er een enorme stijging in de productie van proteïnes. Zwermers kunnen voorkomen onder zowel aerobe als anaerobe omstandigheden. Deze veruiterlijking kan geïnduceerd worden door de concentratie van aminozuren en dan vooral de concentratie van glutamine. Ook een zuurdere pH verhoogd het voorkomen van zwermers. Metabolieten die in de darm voorkomen, zouden ook het zwermen bevorderen. Dit zou vooral het geval zijn voor choline, glutamine en putrescine, een veelvoorkomend polyamine in de darm. Of *P. mirabilis* echt kan zwermen in de darm is nog niet bevestigd, maar de combinatie van het viskeuze oppervlak van de darmmucosa, de hoge concentraties aan glutamine en polyamines in de darm en de aanwezigheid elektronen acceptoren voor aerobe respiratie, zoals choline, maakt het zeer waarschijnlijk. (Hamilton et al., 2018b)

⁸ <https://www.sciencephoto.com/media/1114261/view/proteus-mirabilis-bacteria-sem>, geraadpleegd op 26 februari 2023.



Figuur 11: De bovenste foto toont het typische "bull's-eye" patroon. *Proteus mirabilis* is 2 keer geënt op de plaat. De foto onderaan links toont *P. mirabilis* in de zwermvorm en de foto onderaan rechts toont zwermende cellen en zwemmende cellen in een biofilm. (Hamilton et al., 2018c)

Voor infectie van het spijsverteringsstelsel is adhesie aan de epitheliale cellen zeer belangrijk. *Proteus mirabilis* kan 7 types fimbriae produceren. Zes ervan zijn al geïdentificeerd: mannose-resistent *Proteus*-like fimbriae (MR/P fimbriae), mannose-resistent *Klebsiella*-like fimbriae (MR/K fimbriae), nonagglutinating fimbriae (NAP), deze fimbriae zijn ook gekend als uroepithelial cell adhesin (UAC), ambient-temperature fimbriae (ATF), *P. mirabilis* P-like pli (PMP) en *P. mirabilis* fimbriae (PMF). Deze fimbriae hebben een belangrijke rol in het vormen van biofilms. MR/P en NAP/UCA zijn de belangrijkste wat betreft gastro-intestinale problemen. De expressie van deze adhesiefactoren zijn sterk gekoppeld aan de beweeglijkheid. Daarnaast lijkt de inductie van MR/P gekoppeld te zijn aan de aanwezigheid van zuurstof. De productie van MR/P kan aan en af gezet worden door plaatsspecifiek DNA recombinase, Mrlp, dat een promotor invertteert, dat geflankeerd wordt door geïnverteerde herhalingen. Het invertteerbare element schakelt, afhankelijk van de omgevingsomstandigheden, het MR/P operon aan of uit. Zuurstofarme omstandigheden, zoals in het gastro-intestinaal stelsel, zouden de aanwezigheid van MR/P fimbriae bevorderen. Dit draagt waarschijnlijk bij aan de aanhechting in de darm en de persistentie in de darm. Zowel de expressie van fimbriae als het zwermen zou de invasiviteit, persistentie en de pathogeniciteit van *P. mirabilis* in de darm vergroten. (Hamilton et al., 2018b)

Urease is een enzym dat ureum kan metaboliseren. Ureum is het meest voorkomende afvalproduct dat stikstof bevat. Ureum wordt omgezet in ammoniak en koolzuur. Het is de ammoniak dat een bron van stikstof vormt voor het microbiële metabolisme in de darm. Doordat *Proteus* species dit enzym kunnen produceren, kan er nitraat gevormd worden voor niet-fermentatieve anaerobe respiratie wat de expansie van *Enterobacteriaceae* bevordert, dus ook deze van *P. mirabilis*. De lokale pH stijgt ook waardoor urease-positieve organismen kunnen overleven in de zuurdere gastro-intestinale omgeving. *Proteus* species kunnen groeien bij een pH van 5 tot 10, met een optimum van 7 tot 8. Het is aangetoond dat *P. mirabilis* urease kan produceren en dat de productie ervan gereguleerd wordt door zowel de concentratie van ureum in de omgeving als door de verhoogde chromosomale transcriptie bij zwermende cellen. (Hamilton et al., 2018b)

Proteus mirabilis produceert het hemolysine HpmA. HpmA veroorzaakt cellyse van erythrocyten, epitheelcellen in de blaas, B-cellen en monocyten. Het kan erythrocyten lyseren onder anaerobe omstandigheden en bij verschillende temperaturen. Het wordt gecodeerd door de hpm locus dat ook codeert voor HpmB. Dit is een activator en begeleider van HpmA. De expressie van deze hemolysines is sterk gekoppeld aan de zwem-zwerm cyclus. Zwermende cellen zijn hierbij meer cytotoxisch dan zwemmende cellen. HpmA draagt bij aan de gastro-intestinale pathogenese door lyse van aangeboren immuuncellen, de inductie van NOD-like receptor proteïne 3 (NLRP3) inflammatie en de vrijstelling van interleukine-1 β (IL-1 β). (Hamilton et al., 2018b)

Proteus mirabilis vertoont intracellulaire invasie van onder andere cellen in het colon. Afhankelijk van het celtype zijn er verschillen in de intracellulaire invasie en pathways van opname. Zo worden er intracellulaire vacuolen, die *P. mirabilis* bevatten, gevormd met een dubbele membraan in intestinale cellen, terwijl er maar een enkele membraan gevormd wordt in uroepitheliale cellen. Deze mechanismen dragen bij tot een effectieve intracellulaire kolonisatie met de vorming van cytoplasmatische kolonies, het ontwijken van het immuunsysteem en resistentie tegen antibiotica. *Proteus mirabilis* kan langer dan 20 uur intracellulair overleven zonder de viabiliteit van de erythrocyt aan te tasten. Het type staal waar *P. mirabilis* uit wordt geïsoleerd, heeft een effect op de invasiviteit bij studies in het laboratorium. Isolaten uit stoelgang vertoonden een efficiëntere invasie. Het is ook bewezen dat *P. mirabilis* op zijn minst de bovenste mucosale laag in de darm en de binnenste laag van het epitheliale oppervlak kan invaderen wanneer er bepaalde immundefecten, zoals de afwezigheid van het Lypd8 proteïne en defecten in de aangeboren immuniteit, zijn. (Hamilton et al., 2018b)

ZapA is een extracellulair metalloprotease dat heel wat substraten kan degraderen. Het speelt een belangrijke rol bij het ontwijken van het aangeboren immuunsysteem door *P. mirabilis* door de degradatie van secretor IgA en IgG. De expressie van ZapA is ook gekoppeld aan de differentiatie van zwemmer cellen tot zwermende cellen. ZapA hydrolyseert β -defencine 1, een antimicrobieel peptide van het aangeboren immuunsysteem dat tot expressie gebracht wordt in het epitheel van het colon, en secretor IgA. Dit verstoort de immunreacties in de darm waardoor *P. mirabilis* de darm aanhoudend kan koloniseren. (Hamilton et al., 2018b)

Omdat *P. mirabilis* een Gram-negatieve bacterie is en tot de *Enterobacteriaceae* behoort, worden er flagellines en pro-inflammatoire celwand componenten (LPS) geproduceerd. Lipid A is zeer immunostimulerend. Het wordt gedetecteerd door het aangeboren immuunsysteem, specifiek door de Toll-like receptor 4. Dit activeert een stroomafwaartse signalisatiecascade die NF- κ B vrijstelt. Dit stimuleert een pro-inflammatoire cascade, gemedieerd door tumor necrosis factor α (TNF- α), die kan leiden tot acute sepsis. Naast lipid A zijn er ook O-antigenen. Dit zijn polysacchariden van herhalende delen die bestaan uit 2 tot 8 suikerresiduen. De O-antigenen zijn structureel zeer divers. De expressie van virulentiefactoren, zoals urease, proteasen en hemolysine, kunnen sterk variëren tussen O-antigeen serogroepen. Zo hebben negatief geladen O-antigeen serogroepen een hogere ureolytische, proteolytische en zwermactiviteit. Bacteriële flagellines zijn de herhalende proteïne subunits waaruit flagellen zijn opgebouwd. Deze zijn zeer immunogeen door de drie dimensionele structuur. Bacteriële flagellinen worden waargenomen door Toll-like 5 receptoren die een aantal inflammatoire pathways activeert waaronder MyD88. De recombinatie van flageline genen flaA en flaB kunnen leiden tot hybride flageline proteïnen die kunnen bijdragen bij het ontwijken van het aangeboren immuunsysteem. (Hamilton et al., 2018b)

Proteus species zijn van nature resistent tegen bepaalde antibiotica. Resistentie tegen polymyxines wordt gemedieerd door covalente modificaties van lipid A. Op deze manier wordt

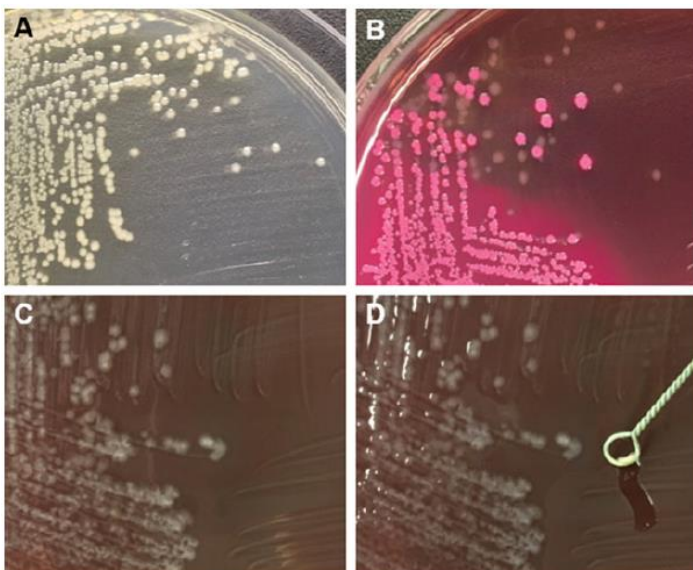
de negatieve lading van LPS naar 0 gebracht waardoor de cationische polymyxines niet meer binden. Er is ook resistentie voor colistine, tigecycline en tetracycline. Sommige stammen van *P. mirabilis* hebben het *Salmonella* genomic island 1 (SGI1) verworven. SGI1 integreert in het recipient chromosoom. Het bevat verschillende genen die coderen voor resistentie tegen streptomycine, trimethoprim, tetracycline, sulfonamiden, chlooramfenicol, fluoroquinolone en een breed spectrum van β -lactam-antibiotica. (Hamilton et al., 2018b)

5.1.2 Identificatie

Proteus mirabilis is gemakkelijk in cultuur te brengen, maar het zwermen kan interfereren met de isolatie van een enkele kolonie of met andere bacteriën. Gespecialiseerde media moeten gebruikt worden om het zwermen tegen te gaan.

Voor routine cultuur kunnen er drie verschillende media gebruikt worden: Low salt lysogeny broth (LB), LSW-agar en *Proteus* minimal salt medium (PMSM), ook wel minimal A genoemd. Op deze media is cultuur mogelijk zonder dat *P. mirabilis* gaat zwermen. Dit is nodig voor verschillende toepassingen in de moleculaire biologie en routine microbiologische toepassingen.

Voor mengculturen waar *P. mirabilis* bijzit, zijn er twee media die gebruikt worden. De MacConkey agar differentieert lactose fermenterende bacteriën van niet-lactosefermenterende bacteriën. Bij fermentatie van lactose zullen de kolonies roze kleuren. Wanneer geen lactose gefermenteerd wordt, blijven de kolonies kleurloos. Dit wordt geïllustreerd op figuur 12. Op de cysteïne-, lactose- en elektrolyt-deficiënte (CLED) agar produceert *P. mirabilis* blauwe transparante kolonies. Om zwermen nog meer tegen te gaan kan de concentratie aan agar verhoogd worden of kunnen er chemische inhibitoren toegevoegd worden aan standaard media zoals LB, bloed agar of chocolade agar. Deze chemische inhibitoren kunnen de fysiologie van de bacteriën beïnvloeden en zelfs groei inhiberen. *p*-nitrophenylglycerol (PNPG) zou de groei van andere bacteriën niet inhiberen, maar zou wel de expressie van virulentiefactoren van *P. mirabilis* inhiberen. Andere additieven die gebruikt kunnen worden zijn: chloralhydraat, boorzuur, sulfonamiden, houtskool, triclosaan, vetzuren en sodium azide. Deze worden niet standaard gebruikt, enkel in meer specifieke omstandigheden.



Figuur 12: De veruiterlijking van *P. mirabilis* kolonies op twee verschillende agars. A toont de kleurloze kolonies van *P. mirabilis* op een low salt LB. B toont de verschillende verschijningen van *P. mirabilis* (witte kolonies) en *E. coli* (roze kolonies) op een MacConkey agar. C toont zwemmende kolonies van *P. mirabilis*. D toont het zwermen van de *P. mirabilis* kolonies aan.

Het Dienes fenomeen wordt gebruikt voor het onderscheiden van *P. mirabilis* subspecies. Dit fenomeen is gebaseerd op het vermogen om te kunnen zwermen en is geassocieerd met competitie en territorialiteit tussen zwermende stammen. Bij de celidentificatie speelt het self-identity proteïne (IdsD) een belangrijke rol. Wanneer het IdsD van de ene cel niet kan binden met de IdsE van een ander nabijgelegen cel, is er verschil tussen de *P. mirabilis* isolaten. Bij een confrontatie van twee verschillende subspecies, zal de dominante de andere omsingelen. De staafvormige cellen van de minder dominante subspecies veranderen dan in ronde cellen waardoor de Dienes-lijn gevormd wordt. Waarom dit fenomeen zich voordoet en het volledige mechanisme hierachter is niet gekend. Figuur 13 toont verschillende Dienes-lijnen op een bloed agar plaat.

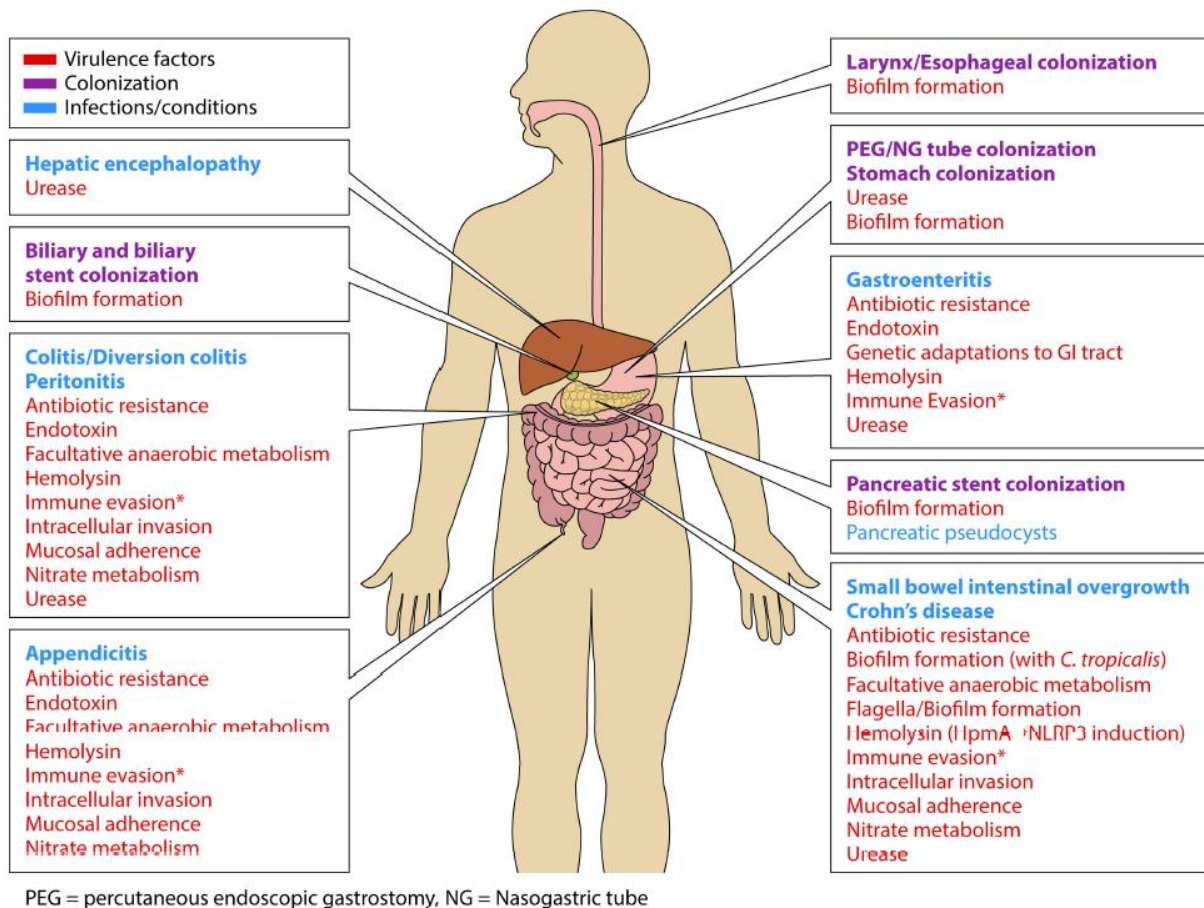


Figuur 13: Dienes-lijnen gevormd door twee verschillende subspecies van *P. mirabilis*. De linkse foto toont typische Dienes-lijnen. De middelste foto toont atypische Dienes-lijnen. Op de rechtse foto zijn er geen Dienes-lijnen aanwezig. (Yu et al., 2021)

Een specifieke isolatiemethode voor *P. mirabilis* is er nog niet. Vaak worden stalen direct op een MacConkey agar en een bloed agar geënt. De isolaten worden dan geïdentificeerd via biochemische testen, PCR-assays of MALDI-TOF MS. Fenotypische kenmerken worden gebruikt om species of subspecies te identificeren. Om stammen te bepalen worden er genetische methoden gebruikt. Pulsed-field gel electroforese (PFGE) blijft de gouden standaard. Op alternerende elektrische velden worden DNA-fragmenten groter dan 50kb gescheiden op een agarose-gel. Andere methoden zijn op PCR gebaseerde methoden zoals repetitive element sequence-based PCR (rep-PCR) genomische fingerprinting waarbij BOW rep-PCR geschikt is voor klinische isolaten van *P. mirabilis*.

5.1.3 Klinisch belang voor de mens

Proteus mirabilis wordt vooral geassocieerd met urineweginfecties, maar heeft ook een rol bij cholanchitis, leverabcessen en sepsis. (Zhang et al., 2021) Andere gastro-intestinale problemen die geassocieerd zijn met *P. mirabilis* zijn (infectieuze) gastro-enteritis (zowel spontaan als voedsel gerelateerd), ziekenhuisinfecties, appendicitis en de ziekte van Crohn. Hoewel het gekend is dat *Proteus* species pathogeen kunnen zijn en dat de darm een reservoir is, is enkel hun rol in urinaire infecties grondig onderzocht. Recente studies over het microbioom in de darm van gezonde en zieke individuen geven aan dat er grote veranderingen zijn in de proportie van belangrijke bacteriële taxa die geassocieerd zijn met dysbiose. Kenmerkend bij dysbiose bij inflammatoire bowel disease (IBD) is de toename van *Proteobacteriae* en dan vooral de *Enterobacteriae*. Onderzoek naar andere genera die behoren tot de *Enterobacteriae*, zoals *Escherichia*, *Shigella*, *Salmonella* en *Klebsiella*, is al gebeurd. Over de rol van *Proteus* is er nog maar weinig onderzoek uitgevoerd. Figuur 14 toont verschillende virulentiefactoren aan, waar *P. mirabilis* kan koloniseren en de ziekten die deze kan veroorzaken. (Hamilton et al., 2018b)



Figuur 14: Een overzicht van de virulentiefactoren (rood), kolonisatieplaatsen in het lichaam (paars) en de aandoeningen (blauw) die *P. mirabilis* kan veroorzaken. (Hamilton et al., 2018c)

Proteus species kunnen gelinkt worden aan diarree, maar de primaire pathogene rol is nog niet bevestigd kunnen worden. (Hamilton et al., 2018b)

Proteus mirabilis is een oorzaak van ziekenhuisinfecties. Veel patiënten met gastro-intestinale ziekten zijn gevoelig voor een secundaire infectie met *P. mirabilis*. Dit is vaak bij polybacteriële infecties. *Proteus* species kunnen ook medisch materiaal koloniseren die gebruikt worden voor het onderzoeken van het gastro-intestinale stelsel, zoals gastroscopen of colonoscopen. (Hamilton et al., 2018b)

Een recente studie van Zhang et al., (2021) toonde aan dat de aanwezigheid *P. mirabilis* een belangrijke rol heeft in de pathogenese van de ziekte van Crohn. Bij de ziekte van Crohn is de regulatie verstoord van de immuunrespons op het microbiom in de darm. Dit onderzoek toonde aan dat *P. mirabilis* de progressie van de ziekte van Crohn versterkt door een dysbiose in de darmen te veroorzaken, specifieke inflammatoire pathways in de darm te activeren en door de secretie van inflammatoire cytokines. Eerdere onderzoeken naar de aanwezigheid van *P. mirabilis* zijn niet gebeurd doordat lage hoeveelheden niet gedetecteerd worden bij het sequencen van het microbiom en bioinformatica. Er zijn 108 stoelgangstalen en 114 biopsiestalen van het colon (67 van patiënten en 40 gezonde mensen) via PCR onderzocht op de aanwezigheid van *P. mirabilis*. De hoeveelheden *P. mirabilis* waren beduidend hoger bij patiënten met de ziekte van Crohn dan bij gezonde mensen. Binnen de groep van patiënten was er geen significant verschil in hoeveelheden *P. mirabilis* in biopsies van stukken colon die ontstoken waren en die niet ontstoken waren. Hogere hoeveelheden *P. mirabilis* zouden wel meer ernstige symptomen geven dan lagere hoeveelheden. Isolaten van de stoelgang waren sterk gerelateerd aan *P. mirabilis* isolaten van de urinewegen en waren verschillend van 2

isolaten vanuit de biopsies. De directe interactie van *P. mirabilis* en zijn receptoren op het epitheel van het colon moeten verder onderzocht worden. *Proteus mirabilis* zou een diagnostisch en therapeutisch doelwit kunnen zijn om patiënten te helpen met de behandeling en het voorkomen van hervat.

5.1.4 Voorkomen bij het varken

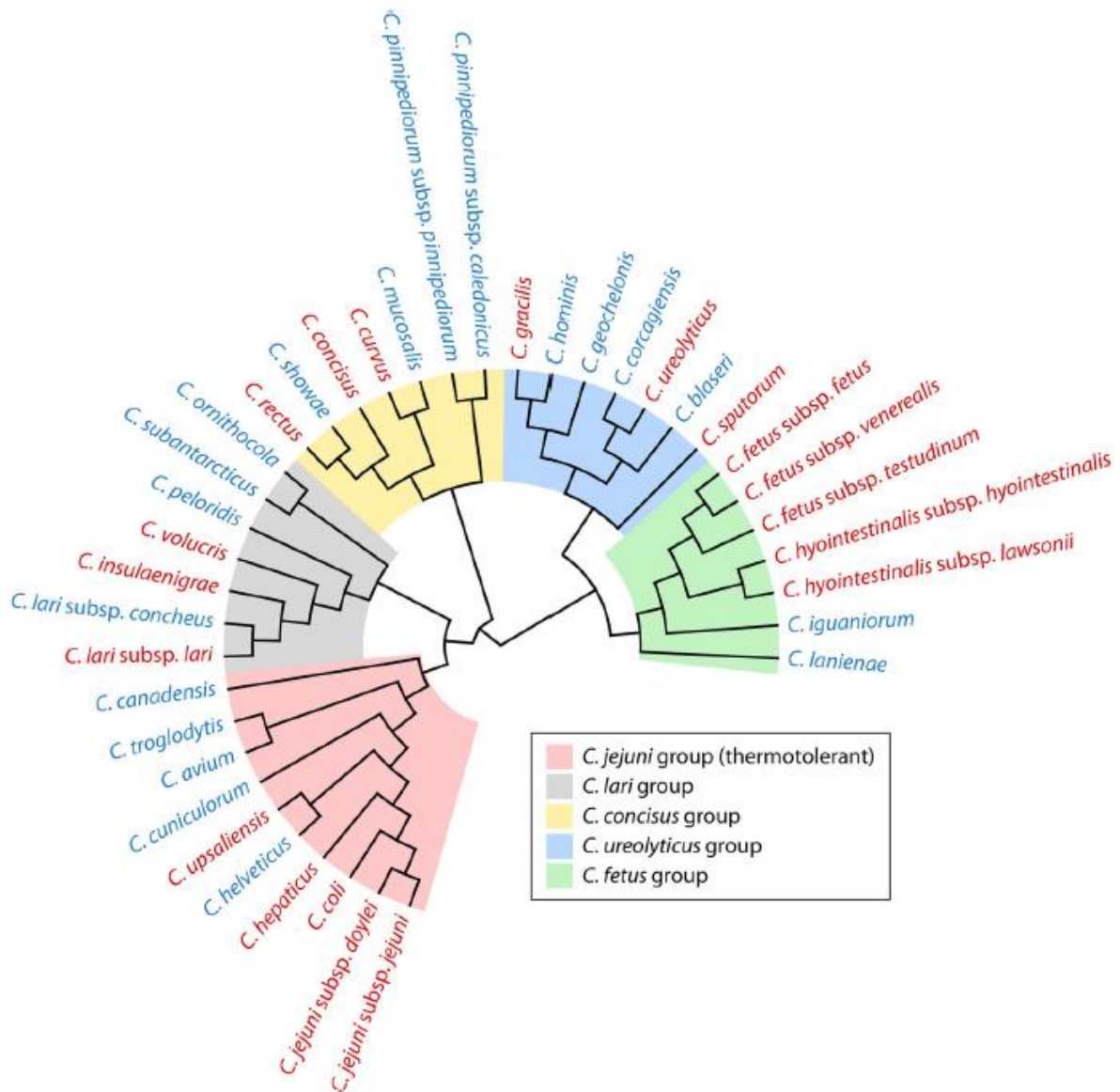
Over het voorkomen van *P. mirabilis* bij varkens is weinig gekend. Het is ook niet gekend of *P. mirabilis* enig pathogeen belang heeft bij varkens. In de literatuur is hierover weinig terug te vinden.

Lei et al., (2015) vonden twee nieuwe varianten van het *Salmonella* genomic island 1 (SGI1) in *P. mirabilis* geïsoleerd uit varkens op boerderijen in China. De multidrug resistance (MDR) regio in het SGI1 bevat vijf antibiotica resistentiegenen die de bacterie resistent maken voor ampicilline, chlooramfenicol, florfenicol, streptomycine, spectinomycine, sulfonamiden en tetracycline. Het SGI1 is via conjugatie van *Salmonella enterica* aan *P. mirabilis* overgedragen. In de studie zijn er stalen genomen van de stoelgang en van geïnfecteerd weefsel van 35 varkens van boerderijen uit 16 provincies in China. Het feit dat het SGI1 bij *S. enterica* voorkomt en deze het SGI1 kan doorgeven aan onder andere *P. mirabilis* kan een risico vormen voor de volksgezondheid. Vooral als deze bacteriën via vleesproducten zouden kunnen verspreiden. Het feit dat deze bacteriën resistent zijn aan verschillende antibiotica bemoeilijkt de behandeling van zowel mens als varken.

5.2 *Campylobacter concisus*

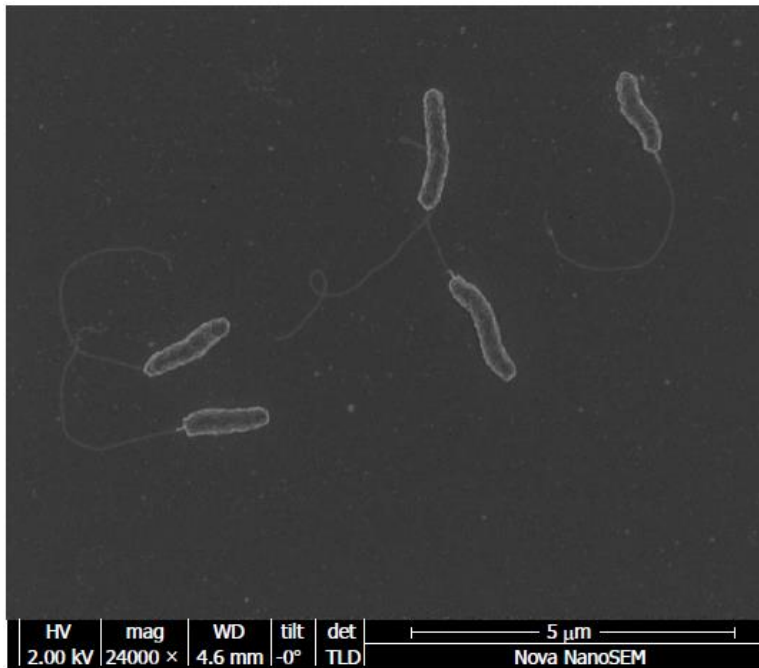
5.2.1 Taxonomie

Het genus *Campylobacter* is sterk gerelateerd aan de genera *Acrobacter* en *Sulfurospirillum*. Ze behoren tot de familie van de *Campylobacteraceae*. Binnen het genus *Campylobacter* zijn er 32 species beschreven en 9 subgroepen: *C. avium*, *C. blaseri*, *C. canadensis*, *C. coli*, *C. concisus*, *C. corcagiensis*, *C. cuniculorum*, *C. curvus*, *C. fetus* subsp. *fetus*, *C. fetus* subsp. *venerealis*, *C. fetus* subsp. *testudinum*, *C. geochelonis*, *C. gracilis*, *C. helveticus*, *C. hepaticus*, *C. hominis*, *C. hyointestinalis* subsp. *hyointestinalis*, *C. hyointestinalis* subsp. *lawsonii*, *C. iguaniorum*, *C. insulaenigrae*, *C. jejuni* subsp. *jejuni*, *C. jejuni* subsp. *doylei*, *C. lanienae*, *C. lari* subsp. *lari*, *C. lari* subsp. *concheus*, *C. mucosalis*, *C. ornithocola*, *C. peloridis*, *C. pinnipediorum* subsp. *pinnipediorum*, *C. pinnipediorum* subsp. *caledonicus*, *C. rectus*, *C. showae*, *C. sputorum*, *C. subantarcticus*, *C. troglodytis*, *C. upsaliensis*, *C. ureolyticus*, en *C. volucris*. Deze species zijn gegroepeerd in 5 fylogenetische groepen, die elk pathogene species bevatten. De groepen zijn: de *C. jejuni* groep, de *C. lari* groep, de *C. concisus* groep, de *C. ureolyticus* groep en de *C. fetus* groep. De namen van de groepen zijn zo gekozen omdat deze species het meest klinisch relevant was binnen de groep. De 5 fylogenetische groepen en hun leden worden weergegeven in figuur 15. (Costa and Iraola, 2019b)



Figuur 15: De 5 fylogenetische groepen en hun leden worden weergegeven. De species in het rood veroorzaken infecties in mens en/of dier. Voor de blauwe species zijn er geen infecties gedocumenteerd. (Costa and Iraola, 2019b)

Campylobacter species zijn gebogen, S-vormige of spiraalvormige staven van 0,2-0,9µm breed en 0,5-5µm lang. Ze zijn Gram-negatief, niet-sporenvormend en niet-sacchrolytisch. Meestal zijn ze bewegelijk door middel van een flagel die zich op één of aan beide uiteinden bevindt. Figuur 16 toont *C. concisus* onder de elektronenmicroscopie. *Campylobacter concisus* kan ook biofilms vormen. De meeste species zijn microaeroob met een respiratoir type metabolisme, maar sommige stammen kunnen aeroob of anaeroob groeien. Op oude culturen of op culturen die te lang zijn blootgesteld aan lucht, kunnen de campylobacters sferische of coccoïde vormen aannemen. (Newell, 2005) *Campylobacter* species hebben over het algemeen een lage G+C inhoud in het genoom. Bij de meeste species varieert deze inhoud tussen de 28 en de 40%. Sommige species, zoals *C. curvus*, *C. rectus*, *C. showae* en *C. gracilis*, vertonen meer dan 40% C+G inhoud. (Liu et al., 2018) *Campylobacter concisus* is urease en catalase negatief en oxidase positief. (Miljković-Selimović et al., 2021)



Figuur 16: Een foto van *C. concisus* gemaakt met een elektronen microscoop. (Zhang et al., 2014)

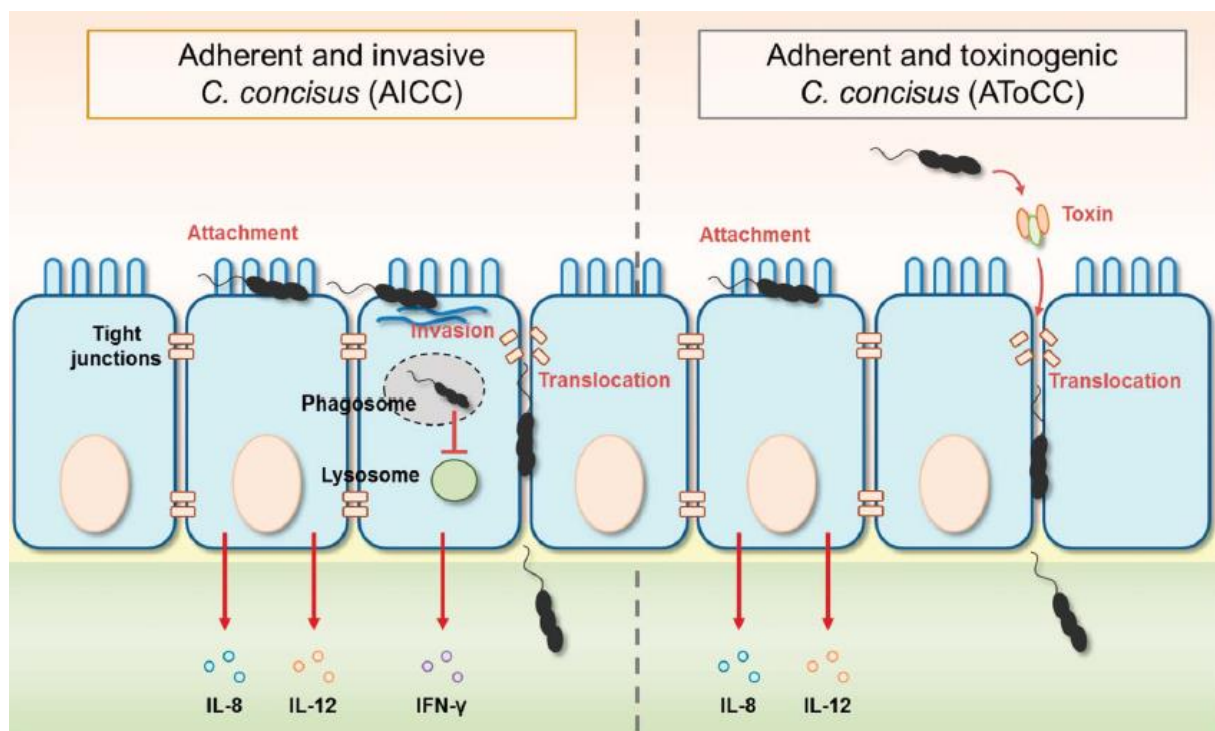
Vele species koloniseren de mucus van het intestinale stelsel. Omdat *C. concisus* zowel bij gezonde individuen als bij patiënten met diarree voorkomt, is er geen duidelijke associatie tussen de aanwezigheid van *C. concisus* en ziekte. Een reden hiervoor kan zijn dat er pathogene en niet-pathogene subpopulaties bestaan. (Newell, 2005) Verschillen in de prevalentie van *C. concisus* tussen patiënten met intestinale aandoeningen en gezonde individuen zijn niet significant. (Kaakoush and Mitchell, 2012) In een studie van Engberg et al. (2005) konden geen duidelijke fenotypische of genotypische verschillen gevonden worden tussen isolaten van patiënten met diarree en isolaten uit gezonde individuen.

Campylobacter concisus werd voor het eerst beschreven in 1981 en werd gevonden in paradontale laesies. Later werd *C. concisus* ook gevonden in stoelgangstalen van zowel gezonde mensen als patiënten met diarree. (Costa and Iraola, 2019b)

Onderzoek naar de genetische diversiteit en de pathogeniciteit met pulsed field elektroforese (PFGE), DNA-DNA hybridisatie en analyse van ribosomale genen toonden een complexe intraspecifieke taxonomie aan met een hoge genetische heterogeniteit. Dit heeft geleid tot genomospecies. Dit zijn groepen van genetisch verschillende stammen zonder duidelijke fenotypische verschillen. (Costa and Iraola, 2019b)

Op basis van virulentiekarakteristieken kan *C. concisus* ingedeeld worden in 2 pathotypes: adherente en invasieve *C. concisus* (AICC) en adherente en toxigene *C. concisus* (AToCC). Deze zijn genetisch verschillend van commensale stammen. Adherente en invasieve *C. concisus* kan beter intracellulair overleven. Dit gebeurt door autofagie te vermijden. Preferentieel worden de cel-cel juncties gekoloniseerd. Hierna is er translocatie doorheen de monolayer en is er paracellulair transport tussen 2 aaneengrenzende cellen. Het mechanisme hierachter is niet gekend. Na het binnendringen van de cel induceert het de productie van IL-8, IL-12 en INF- γ . Adherente en toxigene *C. concisus* produceert zona occludens toxine (zot) die de tight junctions van de cellen aantast. Er is dus transcellulair transport door de intestinale barrière. Een ander verschil met AICC is dat deze wel effectief kan opgenomen worden door autofagie. Na het binnendringen van de cel is er ook geen inductie van de INF- γ productie. Deze eigenschap is eigen aan bacteriën die intracellulair kunnen overleven. Figuur 17 geeft deze mechanismen weer. Extrachromosomale virulentiedeterminanten zoals een restrictie-

modificatie (RM)-systeem zijn geconserveerd gebleven in AICC-pathotypen. Het RM-systeem bevat zeker 4 genen: een restrictie-endonuclease, een DNA-methyltransferase, een plaatsspecifiek recombinase en endotoxine 9. Adherente en toxigene *C. concisus* pathotypes kunnen zot produceren. (Kaakoush et al., 2014; Underwood et al., 2016)



Figuur 17: De werkingsmechanismen van adherente en invasieve *C. concisus* (AICC) en adherente en toxigene *C. concisus* (AToCC). (Kaakoush et al., 2014)

Campylobacter concisus kan overleven bij verschillende pH's en kan ook actief blijven in zure omgevingen. Het contact met de epitheliale cellen gebeurt via de polaire flagel. Na contact met de microvilli van de epitheliale cel ontstaat er een "membrane ruffling"-achtige reactie waarna het niet-geflagellerde uiteinde van *C. concisus* de celmembraan penetreert. Het is aangetoond dat *C. concisus* die geïsoleerd werden uit patiënten met verschillende aandoeningen van het gastro-intestinale stelsel en uit gezonde individuen verschillen in mobiliteit. De bewegelijkheid speelt een rol in de mogelijkheid van de bacterie om door de intestinale mucus te kunnen zwemmen om de intestinale cellen te bereiken. Daarnaast kunnen ze zich aanpassen aan de viscositeit van de buitenste en de binnenste mucuslagen van het colon. Een andere virulentiefactor die met de flagel te maken heeft, is het vermogen om biofilms te vormen. De vorming ervan wordt, zo lijkt het althans, getriggerd door de aanwezigheid van mucus. De biofilms vormen vaak dikke aggregaten op het epitheel in het colon. Nadat *C. concisus* de cel heeft geïnvadeerd, worden er inflammatoire cytokines zoals TNF- α en IFN- γ vrijgesteld. Door het induceren van apoptose van de intestinale cellen ontstaan er milde veranderingen in de tight junctions. Hierdoor is er lekkage en influx van moleculen en vocht die de klinische diarree veroorzaken. Het is aangetoond dat stammen die geïsoleerd werden uit patiënten met chronische intestinale ziekten ongeveer 500 keer meer invasief waren dan stammen die geïsoleerd werden uit patiënten met acute gastritis en gezonde individuen. Endotoxine9/DnaI is een virulentiefactor die gelegen is op de plasmide. Deze wordt geassocieerd met het vermogen om beter te kunnen overleven in de epitheliale cellen. (Kaakoush et al., 2014, 2011; Miljković-Selimović et al., 2021)

De aanwezigheid van proteïnen die potentieel enkel door *C. concisus* zou kunnen gesecreteerd worden, zou gebruikt kunnen worden als target voor identificatie en diagnose.

Onderzoek naar stamspecifieke genomische regio's die mogelijk geassocieerd zouden kunnen zijn met de virulentie toonde aan dat er een type VI secretiesysteem (T6SS) aanwezig is bij *C. concisus*. Dit systeem is betrokken bij gastheer-pathogeen interacties en de virulentie. Het is ook aangetoond bij onder andere *Salmonella*, *Yersinia* en *Vibrio*. Een ander belangrijk gen is het zona occludens toxine (zot) gen dat zich in een profaag bevindt. Zot verhoogd de permeabiliteit in de darmen door de tight junctions aan te tasten. Stammen van *C. concisus* verschillen ook in de flagelline glycosylatie pathways. Dit betekent dat er verschillende immuunreacties kunnen zijn tegen de verschillende stammen van *C. concisus*. (Costa and Iraola, 2019b)

Fosfaat transportgenen *pstS*, *pstA* en *pstC* zijn specifiek voor genomospecies 1 (GS1). *Campylobacter concisus* genotypes hebben dus een verschillende capaciteit voor fosfaattransport. Genomospecies 2 (GS2) heeft een aquaporine Z gen. Dit heeft een functie bij het onderhouden van de intracellulaire osmotische druk. Dit impliceert dat *C. concisus* zich kan aanpassen aan omgevingen met een fluctuerende osmolariteit. CRISPR/CAS genen zijn enkel gevonden in genomospecies 2. Dit voorkomt het incorporeren van vreemd DNA zoals dat van plasmiden en fagen. Er is geen correlatie tussen de aan- of afwezigheid van CRISPR/CAS en de profaag die het zona occludens toxine gen bevat. Zot komt voor bij beide genomospecies. Nog een belangrijk verschil tussen beide genomospecies is dat genomospecies 1 vooral gevonden wordt in orale stalen en genomospecies 2 in stalen van de mucosa in de darmen. (Costa and Iraola, 2019b) Daarnaast zouden genen die betrokken zijn bij de synthese van de celmembraan vooral voorkomen bij orale stammen en deze genen die betrokken zijn in het celtransport, het metabolisme en secretorische pathways vooral voorkomen bij enterische stammen. (Liu et al., 2018)

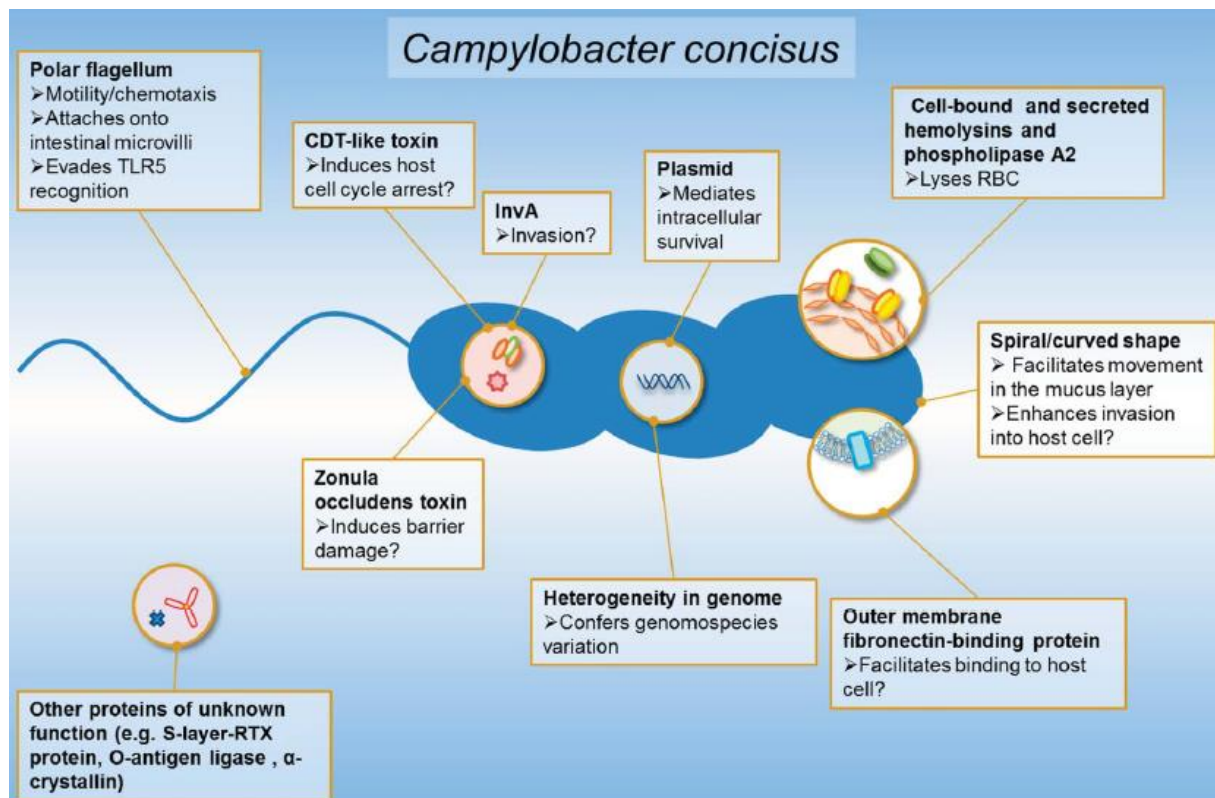
Er zijn 2 genomische eilanden, *CON_PiiA* en *CON_piiB*, aanwezig die coderen voor type IV secretiesystemen (T4SS) en proteïne effectoren die gelijken op deze in *Legionella pneumophilla* en *Helicobacter pylori*. Het effect van deze LepB- en CagA-achtige effectoren op humane cellen is niet geheel gekend. Deze eilanden komen voor bij orale of intestinale stammen op verschillende manieren. Er wordt verondersteld dat er een voorkeur is om in intestinale stammen te integreren. Onderzoek bij een groter aantal stammen is nodig om te bepalen of deze verschillen statistisch significant zijn. Beide eilanden komen voor bij beide genomospecies. (Costa and Iraola, 2019b; Liu et al., 2018; Miljković-Selimović et al., 2021)

Er is een gen in *C. concisus* dat codeert voor het exoproteïne *C. concisus* secreted protein 1 (Csep1). Dit lijkt op enterotoxine B dat voorkomt bij *Staphylococcus aureus*. Enterotoxine B veroorzaakt diarree en activeert T-cellen die grote hoeveelheden cytokines gaan produceren. Het Csep1 gen is gelokaliseerd op het bacteriële chromosoom en op de *pICON* plasmide. Het chromosomale gecodeerd Csep1 gen kan enkel teruggevonden worden bij G2. Het Csep1 gen dat gecodeerd wordt door *pICON* kan gevonden worden bij zowel GS1 als GS2. Het gen dat codeert voor Csep1 vertoont een insertie van 6 baseparen (csep1-6bpi) bij de meeste stammen die geïsoleerd werden bij patiënten met de ziekte van Crohn. Csep1-6bpi zou gebruikt kunnen worden om de ziekte van Crohn die geassocieerd is met *C. concisus* stammen te diagnosticeren. Tot op heden is dit de enige gekende merker in *C. concisus* om een associatie met IBD aan te tonen. (Costa and Iraola, 2019b; Liu et al., 2018; Miljković-Selimović et al., 2021)

In een studie naar de fenotypische en genotypische kenmerken van *C. concisus*, uitgevoerd door Engberg et al. (2005), kon uit 90% van de isolaten van patiënten met diarree, in alle isolaten van de gezonde individuen en de type stam, effecten gezien worden van het cytolethal distending toxin (*cdt*) op Vero cellen. Dit maakt dat dit geen goede merker is om potentieel gastro-enterische pathotypes van *C. concisus* te identificeren. In *C. jejuni* is dit het meest

karacteriserende toxine van de *Campylobacter* toxinen. Alle humane isolaten van *C. jejuni* hebben het cdt gen locus. De expressie hiervan verschilt wel. De functie in de pathogenese is nog onbekend, maar het is aangetoond dat dit toxine een blokkering van de G2 fase in de celcyclus geeft in gevoelige cellen. De directe rol van cdt in campylobacteriosis is nog niet aangetoond.

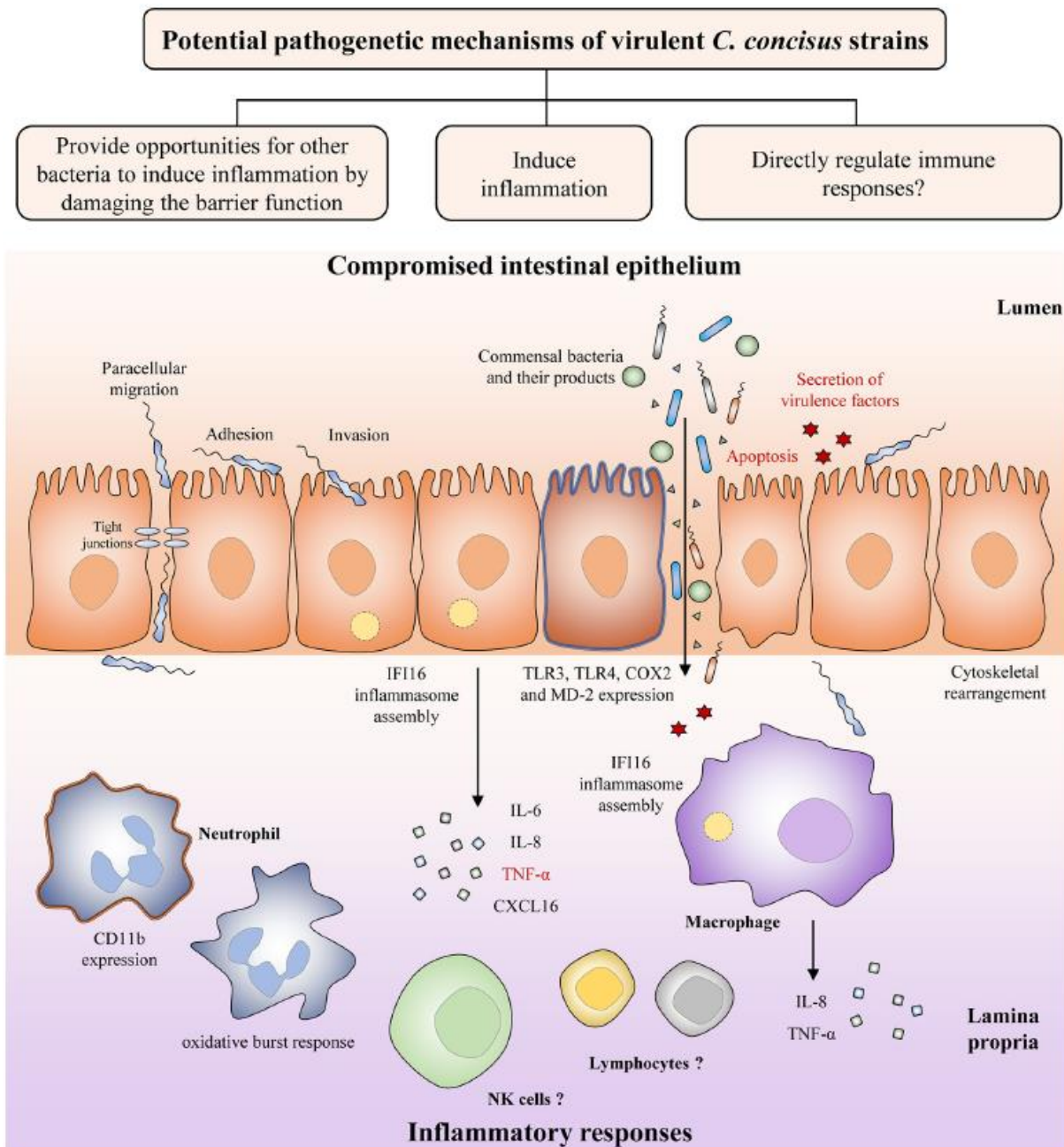
Figuur 18 geeft een overzicht van virulentiefactoren van *C. concisus*. Naast de virulentiefactoren die hierboven besproken zijn, worden er extra virulentiefactoren vermeld.



Figuur 18: Een overzicht van de virulentiefactoren van *C. concisus*. (Kaakoush et al., 2014)

Campylobacter concisus heeft het vermogen om het aangeboren immuunsysteem te activeren en neutrofielen te stimuleren om meer aan te hechten en meer oxidatieve uitbarstingen te vertonen. Dit zijn belangrijke kenmerken om een acute inflammatie uit te lokken. *Campylobacter concisus* die uit stoelgangstalen geïsoleerd werden zijn gevoeliger aan bactericide effecten in het serum. Dit kan deels verklaren waarom *C. concisus* niet gevonden wordt bij een bacteraemie. (Miljković-Selimović et al., 2021)

Op figuur 19 worden de pathogene mechanismen en de immunogene pathways die geactiveerd worden wanneer *C. concisus* de epitheliale darmcellen binnendringt, weergegeven. Wanneer *C. concisus* de darm bereikt heeft, dringt het de intestinale cellen binnen. Dit induceert een aantal reacties van de gastheer. Het cytoskelet wordt herschikt, ontstekingsfactoren worden vrijgesteld, toll-like receptoren komen tot expressie en is er vrijstelling van pro-inflammatoire cytokines. De expressie van virulentiefactoren door *C. concisus*, zoals zot, zorgt niet alleen voor de productie van pro-inflammatoire cytokines, maar resulteert ook in apoptose van de epitheliale cellen. Doordat het intestinale epitheel nu beschadigd is, is er een verhoogde translocatie van commensale bacteriën en hun secreten naar de lamina propria mogelijk. De pro-inflammatoire cytokines en chemokines die door de epitheliale cellen zijn vrijgesteld, trekken immuuncellen aan. Dit zal bijdragen aan de ontstekingsreactie.



Figuur 19: Een overzicht van de pathogene mechanismen van *C. concisus*. (Liu et al., 2018)

5.2.2 Identificatie

Wat isolatie betreft, kan *C. concisus* het best gecultiveerd worden na filtratie op een niet-selectief medium dat geïncubeerd wordt bij 37°C in een waterstofrijke atmosfeer. (Newell, 2005) Selectieve media bevatten antibiotica die de groei van atypische campylobacters kunnen inhiberen of vertragen wanneer deze gevoelig zouden zijn. (Aabenhus et al., 2005) *Campylobacter concisus* is een chemolitroof bacterie die H₂ kan gebruiken als energiebron voor de groei. De beste groei treedt op bij een H₂ concentratie van 2,5-10%. *Campylobacter concisus* kan ook groeien in anaerobe condities zonder waterstof, formaat of furamaat. (Milković-Selimović et al., 2021) Furamaat zou wel de groei van *C. concisus* bevorderen. De sterkste groei werd gezien wanneer media 0,4% geneutraliseerd furamaatzuur, geneutraliseerd mononatrium furamaat en natrium furamaat bevatte. (Liu et al., 2018)

Voor de identificatie kunnen PCR, RT-PCR en MALDI-TOF MS gebruikt worden. De meest gebruikte primers zijn genen voor 16S rDNA, 23S rDNA en chaperonin-60. (Miljković-Selimović et al., 2021)

Tot op vandaag zijn er nog geen routinematig toepasbare manieren om genotypes te differentiëren voor het omschrijven van individuele stammen van *C. concisus* die in overeenstemming zijn met de minimale normen. Comparatieve genomische analyses geven nuttige fylogenetische informatie die kan helpen om de classificatie te bepalen. Daarnaast kan de identificatie van taxon-specifieke genen helpen bij de fenotypische differentiatie van de genomospecies, wat het beschrijven van een nieuwe soort zou vergemakkelijken. Deze taxon specifieke genen kunnen gebruikt worden als doelwit voor moleculaire identificatiemethoden, zoals PCR, om genomospecies te onderscheiden. De combinatie van ANIm, GBDP-gegeneraliseerde isDDH en G+C inhoud onderscheidt genomospecies clusteronafhankelijk en is routinematig te gebruiken in laboratoria die whole genome sequencing (WGS) doen. Andere methoden die data van genoom sequencerings gebruiken, zijn steeds meer beschikbaar. Alternatieven voor DNA-DNA hybridisatie (DDH) zijn average nucleotide identity (ANI) en genome BLAST distance phylogeny (GBDP). Deze kunnen gebruikt worden om de interspecifieke verwantschap van bacteriën te bepalen. Ribosomal multi-locus sequencing typing (rMLST) doet een enkele analyse om intraspecies bacteriën te typeren en te identificeren tot op domeinniveau. Dit gebeurt door de sequentievariatie in 53 ribosomale eiwit subeenheid genen te indexeren. Het vergelijken op functioneel niveau kan met handmatig samengestelde clusters van orthologe groepen eiwitten (COG) databanken. Hiermee kunnen voorspellingen gedaan worden van genfuncties op basis van de overeenkomst in aminozuur samenstelling tussen onbekende genen en genen die al experimenteel bestudeerd zijn. De diversiteit van het ribosomale RNA (rrn)-operon is veelbelovend voor het evalueren van de relaties tussen *C. concisus* isolaten. Onder het rrn-operon vallen de 5S rRNA-, 16S rRNA-, 23S rRNA-genen en de internal transcribed spacer (ITS) regio. Van al deze methoden zijn er nog maar weinig gebruikt om *C. concisus* toe te schrijven aan een genomospecies. Enkel 23S rRNA sequentie en rrn zijn al gebruikt. Dit wil echter niet zeggen dat de andere methoden hier niet voor gebruikt kunnen worden. Deze methoden evalueren kleine proporties sequenties van het genoom. De prestaties van andere WGS methoden die grotere delen van het genoom evalueren zijn momenteel nog niet gekend. (Cornelius et al., 2021)

Voor het identificeren van kerngenomen of accessoire genomen zijn er verschillende software programma's beschikbaar. Het kerngenoom is verantwoordelijk voor de basis biologie en de belangrijkste fenotypische kenmerken van een bacterie species. Accessoire genomen hebben een functie in karakteristieke pathways, virulentiefactoren, het aanpassen aan verschillende omgevingen, gastheerfactoren en het voorzien van molecular fingerprinting doelwitten die nuttig zijn in epidemiologische studies en populatiestudies. Twee van deze software programma's zijn large scale BLAST score ratio (LS-BSR) en Roary. (Cornelius et al., 2021)

Campylobacter concisus is zowel biochemisch als genotypisch het meest gerelateerd aan *C. mucosalis*. Beiden zijn belangrijk in de humane geneeskunde en de diergeneeskunde. De differentiatie tussen deze species gebeurde in het verleden via 3 fenotypische tests: de gevoeligheid voor cephalothine, de temperatuur waarbij de bacterie groeit en de kleur van de kolonie. Deze tests waren echter niet betrouwbaar door de variabiliteit van de stammen. Alternatieve methoden zoals DNA-DNA hybridisatie, immunotypering of whole-cell protein electrophoresis zijn echter te arbeidsintensief om in een routine laboratorium uit te voeren. Bastyns et al. (1995) hebben een PCR test ontwikkeld op basis van een 23S rDNA regio die de specifieke detectie van *C. concisus* mogelijk maakt. Er werd een voorwaartse primer, MUC1 ontwikkeld specifiek voor *C. mucosalis* en een reverse primer, CON1, die specifiek is voor *C. concisus*. Er werd een tweede reverse primer ontwikkeld die bindt op dezelfde positie als

CON1. Deze werd CON2 genoemd. Na verschillende tests bleek deze PCR test een goed alternatief te zijn om *C. concisus* te identificeren.

Miller et al. (2012) hebben verschillende multilocus sequence typing methoden ontwikkelt voor verschillende opkomende *Campylobacter* species, waaronder *C. concisus*. Met MLST methoden worden relatief bewaarde huishoud loci geamplificeerd en gesequeneerd. De data kunnen gebruikt worden om eventuele relevante taxonomische subdivisies in een species te identificeren. Daarnaast kan er genotypische informatie bekomen worden over nieuwe species die fenotypisch divers zijn. Dit is vooral nuttig bij deze species die enkel via 16S rDNA sequencing gespecificeerd kunnen worden. De genenset die gebruikt werd voor *C. concisus* is identiek aan deze die gebruikt wordt voor *C. jejuni* met als enige verschil dat tkt vervangen is door ilvD. De diversiteit in de tkt locus was te groot om een geschikte primer te kunnen ontwikkelen. De andere genen zijn: aspA, atpA (UncA), glnA, gltA, glyA en pgm. Uit deze studie blijkt dat deze MLST methode geschikt is voor het genotyperen van *C. concisus*.

5.2.3 Klinisch belang voor de mens

Campylobacter concisus zou een rol spelen bij orale ziekten zoals parodontitis en gingivitis. Het is bij deze patiënten dat *C. concisus* voor het eerst gevonden werd. *Campylobacter concisus* kan meer geïsoleerd worden uit deze patiënten dan bij gezonde individuen. Ondanks het feit dat er verschillende studies zijn uitgevoerd, is er nog steeds weinig bewijs dat *C. concisus* de oorzaak zou zijn. Dit komt doordat deze studies enkel *C. concisus* isoleerden bij patiënten en niet bij gezonde individuen. Het blijft dus onduidelijk of *C. concisus* effectief een oraal pathogeen is, een opportunistisch pathogeen is in weefsels die ontstoken zijn of een commensaal is in de mondholte. (Kaakoush and Mitchell, 2012) Analyse van data zou aantonen dat de mens een natuurlijke gastheer zou zijn voor *C. concisus* en dat vooral in de mondholte. (Akutko and Matusiewicz, 2017) Transmissie zou dus kunnen gebeuren via speeksel. Daarnaast zou transmissie ook mogelijk kunnen zijn door gecontamineerd eten en drinken, vooral wanneer het in de koelkast bewaard wordt. (Liu et al., 2018)

De laatste jaren wordt er steeds meer vermoed dat *C. concisus* betrokken zou zijn bij inflammatory bowel disease (IBD). Dit is een verzameling van chronische ontstekingen in het gastro-intestinale stelsel waarvoor geen gekende oorzaak is. Verschillende zaken zoals genetische factoren, omgevingsfactoren en het microbioom zouden allemaal een rol spelen in het ontwikkelen van IBD. Er zijn 2 vormen: de ziekte van Crohn en ulceratieve colitis. Bij de ziekte van Crohn zou de inflammatie overal in het gastro-intestinale stelsel kunnen plaatsvinden. Er zijn transmurale laesies die zich over het mucosale oppervlak kunnen verspreiden en in de onderliggende serosa. Bij ulceratieve colitis is er een continue submucosale inflammatie die enkel voorkomt in het colon. Het ontstaan van IBD zou komen door een dysregulatie in de immuunrespons op het microbioom in de darm. Deze dysregulatie wordt waarschijnlijk getriggerd. Er wordt gedacht dat zot-positieve *C. concisus* een trigger kan zijn. Omdat de mondholte een reservoir is van *C. concisus*, is er een constante aanvoer in het gastro-intestinale stelsel. Maar uit onderzoek is gebleken dat, via PCR en isolatie, veel minder *C. concisus* uit faecale stalen gevonden wordt dan uit speekselstalen. *Campylobacter concisus* koloniseert dus niet altijd de darm. De kolonisatie zou ook maar tijdelijk zijn. Waarom *C. concisus* bij sommige individuen de darm koloniseert en bij anderen niet, is niet geweten. Het is ook niet geweten of de dysbiose die geassocieerd wordt met IBD een rol speelt bij de kolonisatie door *C. concisus*. Toch tonen de meeste studies aan dat *C. concisus* meer voorkomt bij patiënten met IBD dan bij gezonde individuen. Bij actieve ziekte van IBD sterven epitheliale cellen af en beschadigen proinflammatoire cytokinen de darmbarrière. Daarnaast is het ook aangetoond dat zo'n actieve periode of een herval vooraf gaat aan een verhoogde

permeabiliteit van de darm. Het is geweten dat zot geproduceerd door *C. concisus* de tight junctions kan aantasten. (Kaakoush and Mitchell, 2012; Zhang et al., 2014)

Gastro-enteritis is een inflammatoire aandoening. De voornaamste symptomen die optreden zijn diarree, buikpijn, koorts en braken. Meestal gaan de problemen vanzelf over binnen de 2-5 dagen. (Liu et al., 2018) Hess et al. (2012) beschreef een case van gastro-enteritis die werd veroorzaakt door *C. concisus*. Een 55-jarige man van Kaukasische origine vertoonde klachten van abdominale krampen, frequente waterige diarree over een periode van een week en verlies van eetlust. De man was 5kg afgevallen. Een belangrijk gegeven is dat de symptomen startte na het volgen van chemotherapie. Het was dus geen geval bij een gezond individu, maar bij een individu waarvan de immuniteit onderdrukt was. Nielsen et al. (2013) voerde een studie uit naar de prevalentie van *C. concisus* bij gastro-enteritis in Noord Jutland in Denemarken. De studie toonde aan dat *C. concisus* bijna even vaak voorkwam als *C. Jejuni* en *C. coli*. *Campylobacter concisus* werd vaker gevonden bij kleine kinderen jonger dan 1 jaar oud en ouderen, ouder dan 65. *Campylobacter concisus* kon het hele jaar aan constante frequenties gevonden worden, terwijl *C. jejuni* en *C. coli* een piek incidentie hadden in de late zomer en de vroege herfst. Er wordt geschat dat de echte prevalentie van *C. concisus* dubbel zo hoog is. Hoewel de meeste studies deze trends bevestigen, moet er opgemerkt worden dat er vaak geen controlegroep was en dat wanneer er wel een controlegroep was, de resultaten niet betrouwbaar waren. Of *C. concisus* een rol heeft in gastro-enteritis moet nog verder onderzocht worden. (Liu et al., 2018)

Ferreira et al. (2022) heeft gedemonstreerd dat *C. concisus Helicobacter pylori* kan imiteren bij sommige gevallen van gastritis. Dit is aangetoond in routineonderzoek van biopsies. Uit 50 van de 2.191 maagbiopsies tussen 2017 en 2018 kon *C. concisus* gecultiveerd worden. Van 28 cases waar *C. concisus* geïdentificeerd was op cultuur en waarbij er ook een biopsie van de maag is genomen, konden er bij 6 gevallen actieve gastritis op histologie gezien worden. De verschillende klinische veruiterlijking ondersteunt de theorie dat *C. concisus* de maag kan koloniseren zonder dat er een actieve gastritis is, niet. Echter is *C. concisus* wel al geïdentificeerd uit maagsap zonder gastritis. Twee-derde van deze 6 patiënten met actieve gastritis die ook positief waren voor de cultuur van *C. concisus* vertoonden geen identificeerbare organismen op het oppervlak van de mucosa op histologie. Deze waren ook niet aanwezig bij patiënten die geen gastritis hadden, maar waarbij de cultuur van *C. concisus* wel positief was. *Campylobacter concisus* kan dus de maag koloniseren, maar het aantal dat gevonden kan worden, is zonder een actieve gastritis veel lager en kunnen dus hoogstwaarschijnlijk niet geïdentificeerd worden op histologie. Omdat een lage pH de groei van *C. concisus* bij cultuur inhibeert, kan het ook zijn dat de lage pH in de maag verhindert dat *C. concisus* kan koloniseren. Met deze hypothese in gedachten kunnen er vragen gesteld worden bij het veelvuldig gebruik van proton-pomp inhibitoren en medicatie die de pH van de maag verhogen. Dit zou er voor zorgen dat de condities in de maag meer gunstig worden voor het overleven en het koloniseren van *C. concisus*.

Verder zijn er nog een paar andere ziekten waarbij *C. concisus* betrokken zou kunnen zijn. De belangrijkste hiervan is Barret's esophagus. Dit is een aandoening waarbij gastro-duodenale reflux er voor zorgt dat het squameus celepitheel in de oesophagus vervangen wordt door langwerpige verhoorde cellen. Bij deze aandoening kunnen hoge aantallen *C. concisus* en *C. rectus* teruggevonden worden. *Campylobacter concisus* kan geïsoleerd worden vanuit een aspiraats en uit mucosale stalen. (Kaakoush and Mitchell, 2012) Ook bij oesophageale reflux kunnen er meer *C. concisus* gevonden worden. Het lijkt er op dat de blootstelling aan maagzuur de omgevingscondities voor *C. concisus* gunstig lijkt te beïnvloeden. De initiële verandering die deze kolonisatie veroorzaken zijn nog niet opgehelderd. (Akutko and Matusiewicz, 2017)

5.2.4 Voorkomen bij het varken

Er zijn tot op het heden geen studies die specifiek onderzoek hebben uitgevoerd naar het voorkomen van *C. concisus* bij varkens. Deze studies zijn wel uitgevoerd bij de hond en de kat. Onderzoek naar andere campylobacters dan *C. jejuni* en *C. coli* bij varkens en ruminantia is wel uitgevoerd, maar *C. concisus* werd hierbij niet teruggevonden bij het varken (Oporto and Hurtado, 2011).

5.3 *Escherichia albertii*

5.3.1 Taxonomie

Escherichia albertii zijn Gram-negatieve, niet-motiele, niet-sporenvormende, facultatief anaerobe, staafvormige bacteriën die behoren tot het genus *Escherichia*. Bacteriën behorend tot het genus *Escherichia* zijn middellange tot lange staven die goed kunnen groeien op een MacConkey agar, zowel aerobisch als anaerobisch. Ze kunnen beweeglijk of onbeweeglijk zijn. Wanneer ze beweeglijk zijn, hebben ze flagellen die zich rond de cel bevinden. Ze zijn chemoorganotrofisch met zowel een oxidatief als een fermentatief metabolisme, zijn cytochrom oxidase-negatief en catalase-positief en kunnen gas en zuur produceren uit D-glucose. (Huys et al., 2003; Muchaamba et al., 2022a) Binnen het genus *Escherichia* zijn er naast *E. albertii* nog 5 andere species gekend: *E. blattae*, *E. coli*, *E. fergusonii*, *E. hermannii* en *E. vulneris*. Er wordt voorgesteld om *E. albertii* op te delen in biogroepen. Momenteel zijn er 3 biogroepen beschreven: Biogroep 1 die indole-negatief is en lysine-positief, biogroep 2 die indole-positief is en lysine-negatief en biogroep 3 die zowel indole- als lysine positief zijn. (Gomes et al., 2020) Het kan zijn dat sommige *E. albertii* stammen niet in een biogroep passen.

E. albertii werd voor het eerst beschreven als een atypische stam van *Hafnia alvei* die het eae-gen, dat voor intimine codeert, bezit. Dit gen wordt geassocieerd met het attaching en effacing fenotype van enteropathogene *E. coli* (EPEC) en enterohaemorrhagische *E. coli* (EHEC) stammen. Verschillende studies door de jaren heen wijzen erop dat deze *H. alvei*-achtige stam niet behoort tot het genus *Hafnia*, maar wel tot het species *Escherichia*. Dit werd gedaan op basis van DNA-DNA hybridisatie en 16S rRNA gen sequencing data. (Konno et al., 2012) Ook de aanwezigheid van het outer membrane protein gen (*phoE*) en de aanwezigheid van het cytolethal distending toxin gen (*cdt*) gaven aan dat de species niet behoorde tot *H. alvei*. (Nimri, 2013)

Hoewel er gezegd wordt dat *E. albertii* niet motiel is en geen flagellen heeft, kan *E. albertii* in bepaalde omstandigheden toch flagellen ontwikkelen. De benodigde genen zijn hiervoor aanwezig. Flagellen worden ontwikkeld bij 20°C en in een medium met een lage osmotische druk. Ook glutamine bevordert de motiliteit. (Ikeda et al., 2020) Temperaturen lager dan lichaamstemperatuur zijn een belangrijke factor om flagellen te ontwikkelen. Een tekort aan bepaalde substraten, zoals nutriënten, kunnen een verhoogde motiliteit veroorzaken. (Murakami et al., 2020) De flagellen en de motiliteit lijken te verdwijnen bij een osmotische druk die even hoog is als in het plasma bij mensen. Dit wil zeggen dat de ontwikkeling van flagellen in de darmen onderdrukt worden, wat het invaderen van de intestinale cellen kan bevorderen. (Ikeda et al., 2020) Een theorie is dat het verdwijnen van de flagellen is voortgekomen door de immunreactie van de gastheer. Het behoud en de expressie zou gedreven worden doordat de genen geïntegreerd zijn in alternatieve regulatorische pathways. (Bhatt et al., 2019)

In Tabel 2 worden de biochemische eigenschappen van *E. albertii* weergegeven. Ze kunnen zuur produceren door de fermentatie van D-glucose, L- en D-arabinose, D-fructose, D-galactose, D-mannose, D-manitol en trehalose. Bij de fermentatie van D-glucose is er

gasvorming. Ook vele niet vaak voorkomende suikers kunnen niet gefermenteerd worden. *Escherichia albertii* kan ook nitraat reduceren. (Abbott et al., 2003; Bhatt et al., 2019; Muchaamba et al., 2022a)

Tabel 2: Een overzicht van de biochemische eigenschappen van *E. albertii*.

	Positief	Negatief	
Enzyme	Lysine	Indole	Chitinase
	Ornithinedecarboxylase	Arginine dihydrolase	Hydroxyproline deaminase
	β -galactosidase	Voges-Proskauer	Tripeptidase
	Methyl rood	Oxidase	Proline deaminase
	Catalase	Cytochroom oxidase	
	Ja	Nee	
Fermentatie/afbraak	D-glucose	Sucrose	Xylose
	L- en D-arabinose	Lactose	Methylumbelliferyl glucuronide (MUG)
	D-fructose	Cellobiose	Raffinose
	D-galactose	Adonitol	
	D-mannose	2-ketogluconaat	
	D-manitol	Citraat	
	Threhalose	Rhamanose	

Alle stammen van *E. albertii* lijken fenotypisch op elkaar, maar er zijn wel een paar reacties die verschillen. Dit is onder andere het geval bij de fermentatie van lactulose, maltose, threhalose en esculine hydrolyse. Alle drie de stammen die maltose fermenteren, kunnen ook threhalose fermenteren. Dit kan er op wijzen dat biotypes bestaan binnen het species *E. albertii*. (Abbott et al., 2003)

Fermentatie van D-sorbitol is een eigenschap die enkel *E. coli* vertoont. Dit kan helpen om deze te onderscheiden van andere leden binnen het genus *Escherichia*. Ze kunnen ook onderscheiden worden door verschillende andere testen, zoals het niet groeien in KCN (cyanide) bouillon, het benutten van malonaat en weinig tot geen zuurproductie uit D-xylose, D-arabitol, melbiose en cellobiose. De zwakke tot milde werking van L-prolineaminopeptidase in *E. albertii* kan helpen om deze te onderscheiden van *H. alvei* die een sterke werking van dit enzym vertonen. (Abbott et al., 2003)

Escherichia albertii zijn fylogenetisch verwant aan stammen van *Shigella boydii* serotype 13 (*Shigella* B13). Deze zijn ook fylogenetisch verwant aan *E. coli*. Na analyse van intimine blijkt dat het centrale bewaarde domein gelijk is aan deze van *E. albertii* en *Shigella* B13 en afkomstig zijn van deze eae varianten die gevonden worden in pathogene *E. coli*. Sequentie analyse van het cytolethal distending toxin (cdt) gen heeft aan het licht gebracht dat er 3

groepen allelen overeenkomen met deze van *E. albertii* en *Shigella* B13. *E. albertii* en *Shigella* B13 zouden zo'n 28 miljoen jaar geleden afgesplitst zijn van een *E. coli*-achtige voorouder en een nieuwe tak gevormd hebben (Hyma et al., 2005).

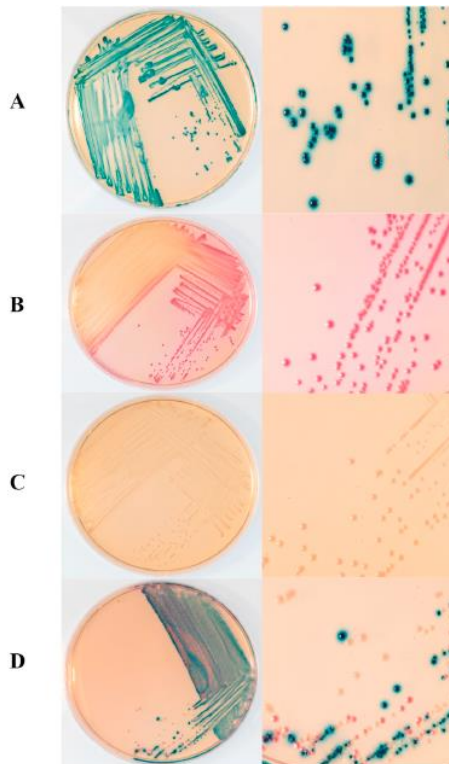
5.3.2 Identificatie

Escherichia albertii is sterk gerelateerd aan de enteropathogene *E. coli*, vooral aan de atypische stammen. Enteropathogene *E. coli* kan attaching en effacing letsels veroorzaken aan de mucosa van de darmen, waardoor diarree ontstaat. Het eae (*E. coli* attaching and effacing) gen codeert voor intimine. Dit bevordert de aanhechting aan de epitheliale cellen in de darmen. *Escherichia albertii* beschikt ook over dit gen. Daarnaast beschikt *E. albertii* ook over cdt genen die coderen voor het cytolethal distending toxine (cdt). Hier zijn 3 subtypes van: CdtA, CdtB en CdtC. Het cdt wordt gelinkt aan de kolonisatie en invasie. Dit heeft een effect op de graad van de ziekteverschijnselen. Enterohaemorrhagische *E. coli* beschikken ook over dit gen (Hatanaka et al., 2020). Sommige *E. albertii* hebben genen die coderen voor het Shiga-toxine 2 of varianten ervan (Stx2a en Stx2f). Deze genen worden beschouwd als virulentiefactoren van Shiga-toxine-producerende *E. coli*. (Hinenoya et al., 2019) Al deze genen worden gebruikt bij het opsporen en het identificeren van *E. albertii*. Hierdoor wordt *E. albertii* vaak foutief geïdentificeerd als *E. coli*. Daardoor is er een onderschatting van de werkelijke hoeveelheid besmettingen met *E. albertii* (Hyma et al., 2005). Omdat *E. albertii* opkomend is, en er nog niet veel onderzoek naar gebeurt, zijn er nog geen standaard isolatie- en identificatieprocedures beschikbaar. Hieronder volgt een overzicht van beschreven isolatie- en identificatiemethoden in de literatuur.

Bij de detectie van *E. albertii* met een multiplex PCR wordt vaak gebruik gemaakt van de aanwezigheid van de genen clpX, lysP en mdh, maar hierbij worden niet alle *E. albertii* gedetecteerd. Naast PCR is het sequencen van het genoom ook een optie, maar dit is tijdrovend. Lindsey et al. (2017) hebben een multiplex PCR ontwikkeld om *E. coli*, *E. albertii* en *E. fergusonii* te detecteren en te differentiëren en dit via specifiek ontwikkelde primers. Deze werden ontwikkeld door data van sequencerings van *Escherichia spp.* en met behulp van software programma's. De sequenties die gebruikt werden om deze primers te ontwikkelen waren afkomstig van humane en kippen isolaten. Uit het onderzoek bleek dat deze multiplex PCR met deze specifieke primers een sensitiviteit en specificiteit heeft van 100%. Dit kan dus een snelle en precieze manier zijn om *E. albertii* te detecteren, te identificeren en te onderscheiden van onder andere *E. coli*.

Omdat in het verleden *E. albertii* beschreven werd als een bacterie die geen lactose kan fermenteren, werden isolatiemethoden hier vaak op gebaseerd. Recente studies hebben aangetoond dat er ook *E. albertii* stammen zijn die lactose kunnen fermenteren. Dit geeft aan dat er een onderschatting is in het voorkomen van *E. albertii* bij het gebruik van deze isolatiemethodes. Maheux et al. (2018) hebben een isolatiemethode ontwikkeld die zowel lactose fermenterende als niet-lactose fermenterende *E. albertii* kunnen isoleren. Dit gebeurt door isolatie op mEA agar, een indole test en de *E. albertii* specifieke rapid multiplex PCR test die ontwikkeld werd door Lindsey et al. (2017). Alle indole (geproduceerd vanuit tryptofaan) positieve witte kolonies werden getest met deze PCR test. Hiervan waren er een paar die niet *E. albertii* waren, deze gaven negatieve resultaten bij de PCR test. Dit geeft aan dat een combinatie van deze methoden een sensitiviteit en een specificiteit van 100% hebben. De werking van het mEA medium (*E. albertii* medium) is gebaseerd op de capaciteit van *E. albertii* en *E. coli* om te groeien bij 44,5°C, de capaciteit om cellobiose te fermenteren en het feit dat *E. albertii* geen β -D-glucuronide kan fermenteren. Omdat *E. coli* wel β -D-glucuronide kan fermenteren, kleuren de kolonies blauw op de mEA agar. Bij de fermentatie van cellobiose

wordt er een zuur geproduceerd die de pH doet dalen. Onder een pH van 6,8 kleuren kolonies die cellobiose kunnen fermenteren roze. Bacteriën die geen cellobiose kunnen fermenteren, zoals *E. coli* en *E. albertii*, zullen peptone gebruiken als eiwitbron. Bij de afbraak komt er ammoniak vrij, wat de pH doet stijgen. Dit leidt tot witte of kleurloze kolonies. *Escherichia albertii* zal dus witte kolonies vormen op de mEA agar. Figuur 20 geeft een visueel beeld van de gevormde kolonies.



Figuur 20: A) De blauwe kolonies zijn een veruiterlijking van *E. coli*, B) De roze kolonies worden gevormd door *E. fergusonii*, C) De witte kolonies worden gevormd door *E. albertii*, D) *E. coli*, *E. fergusonii* en *E. albertii* werden op eenzelfde mEA plaat uitgesmeerd. (Maheux et al., 2018)

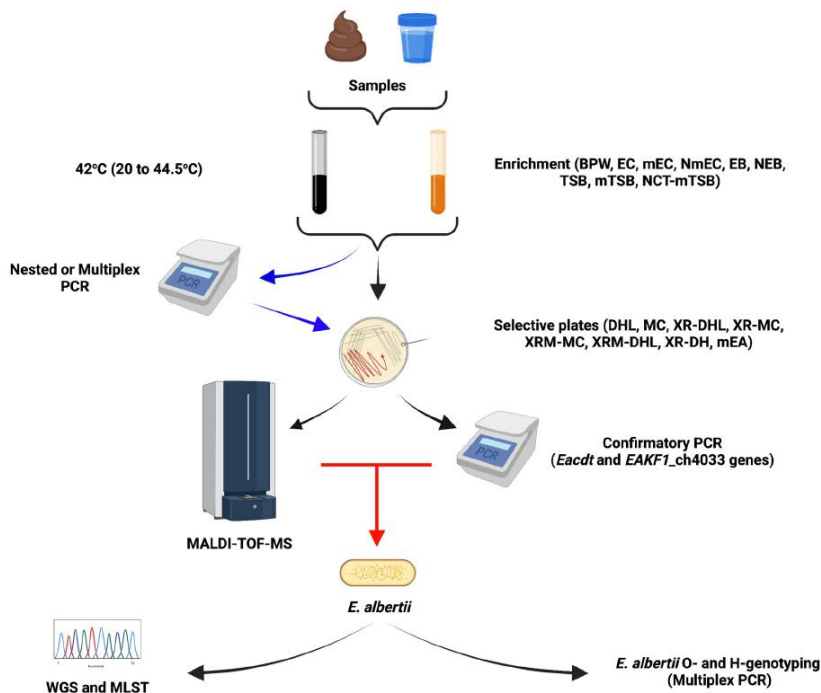
Er zijn ook verschillende intieme subtypes waarvan niet alle gekend zijn. Deze kunnen niet mee in rekening gebracht worden bij de identificatie van *E. albertii* waardoor de exacte prevalentie weer een onderschatting wordt. (Bhatt et al., 2019; Ooka et al., 2012)

Er zijn bepaalde genen, die coderen voor furamaat reductase en voor een cytochroom c-type proteïne, die op een *E. albertii*- specifieke locus gelegen zijn. Dit kan een extra middel zijn om *E. albertii* van EPEC en EHEC te kunnen onderscheiden. (Bhatt et al., 2019)

Whole genome sequencing wordt beschouwd als een gouden standaard voor de identificatie en verdere karakterisatie en zou telkens overwogen moeten worden (Muchaamba et al., 2022a).

Een algemeen protocol kan als volgt verlopen. De stalen worden 1 keer verrijkt waarbij verschillende soorten bouillon mogelijk zijn. Dit kan met gebufferd peptone water (BPW), *E. coli* (EC) bouillon, gemodificeerd EC (mEC), novobiocin-mEC (NmEC), *Enterobacteriaceae* enrichment bouillon (EB), novobiocin supplement EB (NEB), gemodificeerd tryptic soja bouillon (mTSB) of novobiocin-cefixime-telluriet gesupplementeerde mTSB (NCT-mTSB). De temperatuur waarbij dit gebeurt varieert tussen de 20 en 44,5°C. Bij sommige protocollen wordt hierna een *E. albertii* specifieke PCR test uitgevoerd en worden enkel positieve PCR resultaten op een plaat uitgezet. Bij andere protocollen wordt het verrijkte staal direct op een plaat gecultiveerd. De verschillende media staan op figuur 21 vermeld. Geselecteerde witte kolonies

kunnen geïdentificeerd worden door MALDI-TOF-MS of door een *E. albertii* specifieke PCR test. Bij het gebruik van MALDI-TOF-MS is een lokale *E. albertii* specifieke databank vereist. Verder onderzoek kan gebeuren door whole genome sequencing, multilocus sequence typing (MLST), H- en O-genotypering. (Muchaamba et al., 2022a)



Figuur 21: Een schematische voorstelling van protocollen voor de isolatie en identificatie van *E. albertii*. (Muchaamba et al., 2022a)

5.3.3 Klinisch belang voor de mens

Escherichia albertii wordt beschouwd als opkomend zoönotisch voedselpathogeen. De kiem kan bij de mens infectie veroorzaken met symptomen als waterige diarree, abdominale pijn, braken en koorts. (Bhatt et al., 2019). Misselijkheid werd ook als symptoom beschreven (Ooka et al., 2013). Infecties zijn echter vaak zelflimiterend waardoor patiënten kunnen genezen met weinig medicatie of zelfs zonder behandeling (Muchaamba et al., 2022a). De geschatte incubatieperiode bedraagt 12 tot 14 uur. (Gomes et al., 2020)

Echte uitbraken waarvan *E. albertii* het oorzakelijke agens is, zijn niet bekend. De pathogene rol van *E. albertii* kan daarom in vraag gesteld worden. Maar wanneer uitbraken van gastro-intestinale problemen door consumptie van voedsel besmet met eae-positieve *E. coli* grondiger onderzocht worden, en dan specifiek op *E. albertii*, kan deze wel terug gevonden worden. In een studie van Ooka et al. (2013) bleken er meerdere personen met klinische symptomen besmet te zijn met *E. albertii*. Er waren minder subklinische gevallen bij mensen die enkel met *E. albertii* besmet waren. (Ooka et al., 2013)

Escherichia albertii kan geïsoleerd worden bij patiënten met symptomen van een gastro-intestinale infectie, maar of dit dan ook echt de symptomen veroorzaakt, moet verder onderzocht worden. Ook is het niet geweten of *E. albertii* die Stx2f produceren ziekte veroorzaken. (Ooka et al., 2012) Er is wel beschreven dat bepaalde *E. albertii* die het Stx2a allel bezitten bloederige diarree kan veroorzaken (Bhatt et al., 2019).

Er zijn al verschillende stammen van *E. albertii* gevonden die resistentie vertonen tegen verschillende kritische antibiotica zoals tetracycline en macroliden. Er zijn zelfs al

multiresistente stammen gevonden die resistentie vertonen tegen verschillende antibiotica. (Muchaamba et al., 2022a) Dit kan eventuele behandelingen bemoeilijken en de verdere verspreiding van antibioticaresistentie bevorderen. Net als de virulentiegenen bevinden deze resistentiegenen zich op plasmiden. Sommige van deze plasmiden kunnen overgedragen worden door bijvoorbeeld conjugatie. (Gomes et al., 2020)

Omdat *E. albertii* en *E. coli* op elkaar gelijken, op verschillende vlakken, zoals virulentie en stress tolerantie, zouden voor beide dezelfde maatregelen genomen kunnen worden. (Muchaamba et al., 2022a) Dit zou zeer praktisch zijn omdat er dan weinig extra maatregelen genomen moeten worden aangezien er al maatregelen genomen worden om infectie met *E. coli* te vermijden.

5.3.4 Voorkomen bij het varken

Bij een studie naar het voorkomen van cytolethal distending toxine (cdt)-producerende *E. coli* (CTEC) bij gezonde voedselproducerende dieren werd bij 1 stoelgangstaal van een varken *E. albertii* gevonden (Hinenoya et al., 2014a). Omdat er maar 1 staal positief was van de 45 en deze studie zich toespitste op het voorkomen van CTEC, kan er weinig geconcludeerd worden over deze vondst. Het zou er op kunnen wijzen dat *E. albertii* kan voorkomen in de darmen van gezonde varkens, maar verder onderzoek hiernaar is vereist.

Een klinische veruiterlijking bij dieren is nog niet beschreven. Dit kan zijn omdat infecties subklinisch verlopen of door acute sterfte van het dier zonder dat er symptomen zijn kunnen ontstaan. Daarbij komt dat *E. albertii* vaak foutief geïdentificeerd wordt als *E. coli*. Het zou dus kunnen zijn dat er een foutieve diagnose is gesteld. (Muchaamba et al., 2022a)

Omdat er nog maar zeer weinig onderzoek is gebeurd naar het voorkomen bij dieren, kan er zo goed als niets geconcludeerd worden. Maar omdat humane en dierlijke *E. albertii* isolaten vrij homogeen zijn en niet gastheerspecifiek lijken te zijn, kan er vanuit gegaan worden dat dierlijke isolaten een zoönotisch potentieel hebben. (Muchaamba et al., 2022a)

6 Wat is MALDI-TOF-MS?

MALDI-TOF-MS staat voor Matrix assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. Het is een middel om op een snelle, accurate en kosten effectieve manier micro-organismen te identificeren en te typeren. (Muchaamba et al., 2022a) Deze techniek is interessant omdat dit minder duur is dan andere moleculaire en immunologische detectiemethoden en er is ook geen nood aan getraind labopersoneel. Enkel de aankoopprijs van het toestel zelf kan een limiterende factor zijn aangezien het toestel wel heel duur is. Een ander voordeel is dat cultuurcondities en de tijd die nodig is voor cultuur geen effect hebben op de identificatie. (Singhal et al., 2015)

6.1 Werking

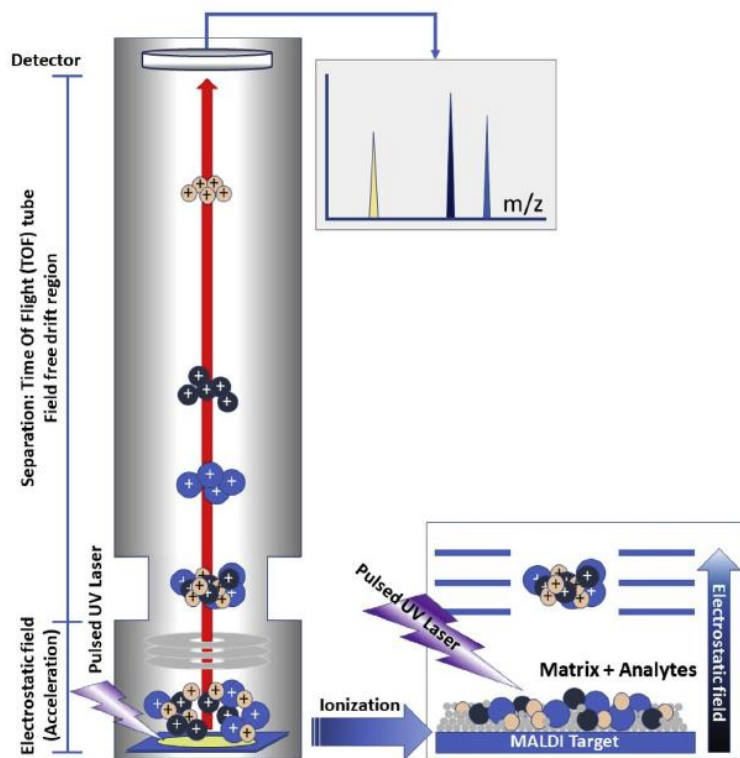
Massa spectrometrie is een analytische methode waarbij chemische verbindingen worden geïoniseerd tot geladen moleculen en waarbij de verhouding van hun massa om opgeladen te worden (m/z) wordt gemeten (Singhal et al., 2015). Het kan gebruikt worden om te achterhalen uit welke moleculen een staal bestaat. Dit kan op basis van het massa spectrum dat de ionen creëren. Ook het aantal moleculen kunnen bepaald worden door de massa tot opladen verhoudingen te analyseren. (Hou et al., 2019)

In het begin van de 20^{ste} eeuw, wanneer deze techniek werd uitgevonden, was er op microbiologisch vlak nog niet veel mogelijk. Het was pas in de jaren 80, wanneer elektron spray ionisation (ESI) en matrix assisted laser desorption ionisation (MALDI) ontwikkelt werden, dat grote biologische moleculen zoals eiwitten konden geïoniseerd worden. (Singhal et al., 2015) MALDI is een ionisatiemethode waarbij ionen gecreëerd worden doordat de matrix de energie van de ultraviolet lasers absorbeert. Hierbij is er weinig fragmentatie van de eiwitten. (Hou et al., 2019) In beide technieken worden de peptiden geïoniseerd door het toevoegen of het weghalen van 1 of meer protonen. Beide technieken zijn gebaseerd op “soft ionisation” methoden waar de vorming van ionen niet leidt tot een verminderde betrouwbaarheid van het staal. MALDI-TOF MS heeft enkele voordelen tegenover ESI-MS. Bij MALDI-TOF MS worden er enkelvoudig geladen ionen gemaakt. Dit zorgt dat de data gemakkelijk te interpreteren zijn. Bij het gebruik van ESI-MS is voor analyse eerst een scheiding nodig via chromatografie, wat niet nodig is bij MALDI-TOF MS. (Singhal et al., 2015)

Het staal wordt gemixt of gecoat met een oplossing die energie absorbeert. Deze organische oplossing wordt de matrix genoemd. Wanneer deze matrix kristalliseert bij het drogen, wordt het staal, dat vast zit in de matrix, mee gekristalliseerd. Het staal wordt via een laserstraal geïoniseerd. De geprotoneerde ionen worden vervolgens op een vast potentiaal versneld waarbij ze gescheiden worden op basis van massa-lading (m/z). Daarna worden de geprotoneerde ionen gedetecteerd en gemeten. Dit gebeurt door middel van verschillende soorten massa-analysatoren zoals quadropole mass analyser, iontrap analyzers en time of flight (TOF) analyzers. Voor microbiologische doeleinden wordt de time of flight analyzer het meest gebruikt. De m/z ratio wordt gemeten door de tijd te bepalen die nodig is om tot het einde van de buis te reizen. In sommige TOF-toestellen zit er op het einde van die gang een spiegel waardoor de ionen terug gereflecteerd worden naar de detector. Niet alleen wordt de afstand hierdoor groter, maar worden ook kleine verschillen in energie tussen de ionen gecorrigeerd. Op basis van de bekomen data wordt er een peptide mass fingerprint (PMF) opgesteld voor de componenten in het staal. (Singhal et al., 2015) Figuur 22 toont wat er in een MALDI-TOF MS toestel gebeurt. Op het einde van de buis is er een detector en geen spiegel.

Er zijn al verschillende organische materialen gebruikt, maar α -cyano-4-hydroxycinnaminezuur (CHCA), 2,3-dihydroxybenzoëzuur (DHB) en 3,5-dimethoxy-4-hydroxycinnaminezuur (sinapinic acid) zijn het meest bruikbaar gebleken. De matrix oplossing bestaat uit water en een mix van de organische materialen met ethanol en methanol of acetonitril en een sterk zuur zoals trifluorozuur (TFA) die in de oplossing oplossen. De gehele oplossing dringt door de celwand van het micro-organisme en extraheert de intracellulaire proteïnen. Als de oplossing dan verdampt, worden de proteïnen gekristalliseerd. (Singhal et al., 2015)

Het voorbereiden van het staal is afhankelijk van hoe het is geïsoleerd of van de chemische structuur van de celwand. Bepaalde micro-organismen kunnen direct geïdentificeerd worden (directe celproliferatie) terwijl bij andere micro-organismen eerst hele cellysaten of ruwe celextracten moeten bereid worden. Bij directe celproliferatie, ook wel whole cell MS (WCMS) genoemd, worden enkele kolonies van micro-organismen direct op een plaat geënt en onmiddellijk bedekt met de matrix. Dit wordt vooral gedaan bij Gram-negatieve bacteriën. Voor Gram-positieve bacteriën is het maken van een extract noodzakelijk en het wordt ook gebruikt om bacteriën te identificeren die geen suiker kunnen fermenteren. Hetzelfde geldt voor bacteriën die een glycocalyx of een capsule laag bezitten. (Hou et al., 2019; Singhal et al., 2015)



Figuur 22: Een voorstelling van de processen in een MALDI-TOF MS toestel. (Hou et al., 2019)

De identificatie van micro-organismen gebeurt door het vergelijken van de PMF's van ongekende organismen met de PMF's in de databank of door het vergelijken van massa's van biomarkers van de ongekende organismen met de peptone databank. Bij het vergelijken van de PMF's wordt het MS spectrum van het onbekend organisme vergeleken met het MS spectrum van gekende micro-organismen die in een databank vervat zitten. Om te identificeren op speciesniveau, wordt een massa range m/z van 2-20kDa toegepast. Dit komt overeen met voornamelijk ribosomale proteïnen en een paar huishoudproteïnen. Ribosomale eiwitten vertegenwoordigen ongeveer 60-70% van het droge gewicht van de microbiële cellen. Het karakteristieke patroon van deze ribosomale eiwitten, die overvloedig aanwezig zijn, in het bereik van 2-20kDa wordt gebruikt om specifieke micro-organismen te identificeren door het PMF-patroon te vergelijken met de PFM-patronen van de ribosomale eiwitten in een uitgebreide databank. Hierdoor kunnen micro-organismen tot genus- en vaak ook tot species- en stamniveau geïdentificeerd worden. Deze manier wordt zeer vaak gebruikt om micro-organismen te identificeren omdat het gemakkelijk is en in elk diagnostisch labo kan toegepast worden omdat er vele databanken beschikbaar zijn. De andere methode die de massa's van biomarkers vergelijkt met deze van proteïnen voorspeld uit de genomsequentie, wordt niet veel gebruikt omdat hiervoor het gehele genoom van een micro-organisme moet gekend zijn en opgenomen moet zijn in een databank. De databanken zijn zeer belangrijk en worden regelmatig geüpdatet door de fabrikanten. (Singhal et al., 2015)

6.2 MALDI-TOF MS in de klinische bacteriologie

De diagnose van een infectie bij diarree wordt vooral gesteld door cultuur en identificatie van de eventuele bacteriën in stoelgang. Dit is relatief duur en neemt vooral veel tijd in beslag. Algemeen genomen duurt dit 3-5 dagen. Met MALDI-TOF MS kan in sommige gevallen binnen de 30 minuten de bacterie al geïdentificeerd worden. (Singhal et al., 2015)

De klassieke classificatie van bacteriën kan gebeuren op basis van biochemische eigenschappen, metabolisme en antigene eigenschappen. Tegenwoordig worden bacteriën geïdentificeerd op basis van informatie die gehaald wordt uit het genoom. 16S rDNA sequencing wordt beschouwd als de gouden standaard omdat dit in alle prokaryote cellen aanwezig is. De meeste DNA fingerprinting methoden correleren fylogenetisch niet en geven ook geen informatie omtrent de evolutionaire relaties tussen verschillende soorten. Amplified fragment length polymorphism (AFLP), pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) en multilocus sequencetyping (MLST) zijn genomische methoden die gebruikt worden om bacteriën te subtyperen voor epidemiologische doeleinden. Hoewel 16S rDNA sequencing voldoende is om het geslacht en de soort te bepalen, is dit in veel gevallen niet verfijnt genoeg. PFGE kan bijvoorbeeld gebruikt worden voor high resolution typing, maar is dan weer niet geschikt om geslachten en soorten te bepalen. (Singhal et al., 2015)

MALDI-TOF MS is een snelle en betrouwbare techniek voor de identificatie van bacteriën, maar heeft wel een paar nadelen. Een goede identificatie is enkel mogelijk wanneer er een databank is die informatie bevat over specifieke genen zoals het prokaryoot 16S rDNA, gyrB, rpoB of hsp60 of species of stammen van een bepaald genus. De databank moet ook lokaal gemaakt zijn voor bepaalde taxa omdat geografische verschillen variaties in het genotype en fenotype kunnen geven. (Singhal et al., 2015)

7 Doelstellingen

Het doel is om na te gaan of deze niet-thermofiele campylobacters, *Proteus mirabilis* en *Escherichia albertii* aanwezig zijn op varkensvlees op consumentenniveau. En zo ja, in welke hoeveelheden. Daarnaast zullen ook een paar algemene analyses uitgevoerd worden en zal er gezocht worden naar gekende pathogenen, *Salmonella* en thermofiele campylobacters. Bij de algemene analyses zal het anaeroob kiemgetal bepaald worden, het voorkomen van *E. coli* en *Pseudomonas* spp. De stalen zullen geanalyseerd worden door een combinatie van verschillende isolatiemethoden die gekoppeld zullen worden aan high-through put MALDI-TOF MS voor identificatie. Het is de bedoeling om een idee te krijgen welke pathogenen er aanwezig zijn en in welke hoeveelheden.

8 Materiaal en methoden

8.1 Staalname, verrijking van de bouillon en homogenisatie

De verrijkingsbouillons worden in een warmwaterbad gelegd van 25°C. De gebruikte bouillons zijn:

- Bufferd peptone water (BPW)
- *Campylobacter* thioglycolate broth (CAT)
- *Enterobacteriaceae* broth (EB)
- Preston Broth (PB)
- Tryptic Soy Broth-*albertii* (TSB-A)

Per staal worden er 6 filter stomacher zakken klaargelegd en geïdentificeerd met een unieke code gevolgd door het type bouillon. Er zijn twee BPW (BPW-1 en BPW-2) filter stomacher zakken, één voor de PB, één voor de EB, één voor de CAT bouillon en één voor de TSB-*albertii* bouillon. Voor de stalen verdeeld worden, worden ze eerst geïdentificeerd met een unieke code. Er wordt 6 keer 25g, die steriel genomen wordt en van minstens 3 verschillende plaatsen op het staal afkomstig zijn, in de zakken gestoken. Daarna wordt in elk van de zakken 225ml van het voorbestemde bouillon toegevoegd. Dit geeft een 1/10 verdunning. De zakken gaan dan 1 minuut in de stomacher (stomacher 400 circulator en stomacher 2: masticator).

BPW-1 wordt bij kamertemperatuur gelaten, dit maximaal voor 2 uur. Daarna wordt het geïncubeerd bij 37°C voor 22-26 uur onder aerobe omstandigheden. Na deze periode wordt de inhoud verdeeld over 3 buisjes die elk een unieke identificatiecode krijgen. Twee buisjes (BPW-1-1 en BPW-1-2) bevatten elk 100ml. BPW-1-1 wordt gebruikt voor de directe isolatie en BPW-1-2 wordt gebruikt voor de incubatie van *Proteus*. BPW-1-1 (d) is 10 keer verdund en wordt gevortext. Hierna wordt 1,5ml in een cryoviaal buisje overgebracht. Dit wordt gelabeld en bewaard bij -80°C voor cultuur onafhankelijke analyse. Van de rest van deze oplossing worden subdiluties gemaakt. Er wordt 40µl van de oplossing toegevoegd aan 40ml fysiologisch water (Pw). Dit geeft een verdunning van 1/100. Er wordt een 1/1.000 verdunning (x) gemaakt en daarvan een 1/100.000 oplossing (xx). Deze zullen gebruikt worden tijdens de algemene analyse.

BPW-2 wordt geïncubeerd bij 37°C voor 16-20 uur onder aerobe omstandigheden. De zakken PB en CAT worden beide net boven het vloeistof niveau afgesloten. PB wordt geïncubeerd bij 41,5°C voor 22-26 uur (volgens ISO 20272-1). CAT wordt geïncubeerd bij 37°C in een jar voor 48 uur onder micro-aerobe samenstelling AM1 (80%N₂, 10%CO₂, 10%H₂ (P3802 ALPHAGAZ MIX) (Air Liquide)). De atmosfeer wordt gecreëerd door eerst de jar tot 80% vacuüm te trekken

en dan te vullen met het gasmengsel. Daarna wordt de jar nog eens tot 80% vacuüm getrokken en wordt er terug gasmengsel toegevoegd. Door het onvolledig vacuüm trekken blijft er nog wat O₂ in de jar. De EB zak wordt geïncubeerd bij 37°C voor 22-26 uur onder aerobe omstandigheden. De TSB-A zak wordt geïncubeerd bij 41,5°C voor 16-20 uur onder aerobe omstandigheden.

8.2 Algemene analyse

Er zullen algemene analyses uitgevoerd worden om de algemene bacteriële contaminatie in kaart te brengen. Het totaal aerobisch kiemgetal, het aantal *E. coli* en het aantal vermoedelijk aanwezige *Pseudomonas* species worden bepaald. Dit zijn respectievelijk de indicatoren voor de bacteriële contaminatie, de fecale contaminatie en het voorkomen van bacteriën die bederf veroorzaken.

8.2.1 Totaal aerobisch kiemgetal

Het totaal aerobisch kiemgetal is een maat voor de algemene bacteriële contaminatie.

Op dag 1 worden van BPW-1-1-d, BPW-1-1-x en BPW-1-1-xx 100µl op een plate count agar (PCA) plaat spiraalsgewijs geënt. Dit gebeurt machinaal met de Eddy jet 2. Dit gebeurt voor elk in duplo. Er zijn dus 6 platen in totaal voor elk staal. Deze worden geïncubeerd bij 30°C onder aerobe omstandigheden voor 48 uur.

Op dag 3 worden alle kolonies geteld op de PCA plaat en genoteerd. Dit per sector en verdunning. Daarna worden de platen in de koelkast bewaard tot dag 5.

8.2.2 *E. coli* telling

Het *E. coli* getal is een risico-indicator. Hoe meer er aanwezig zijn, hoe groter de kans op het vinden van andere pathogenen. Deze hoeven niet gekoppeld te zijn aan elkaar. Wanneer geen *E. coli* gevonden wordt, is de kans op het vinden van andere pathogenen laag en is er vrijwel geen risico.

Van BPW-1-1-d wordt op dag 1 100µl op een tryptone bile X-glucuronide (TBX) plaat spiraalsgewijs geënt. Dit gebeurt in duplo. De platen worden bij 44°C geïncubeerd onder aerobe omstandigheden voor 24 uur.

Op dag 2 worden enkel de blauwe kolonies geteld en genoteerd. Dit per sector en verdunning. Daarna worden de platen in de koelkast bewaard tot dag 5.

8.2.3 Telling vermoedelijke *Pseudomonas* species

Het voorkomen van *Pseudomonas* moet een beeld geven over de graad van bederf. Er zijn geen specifieke methoden om andere bacteriën op te sporen die ook bederf veroorzaken. Is dit getal hoog, dan wil dit zeggen dat het karkas niet proper is uitgeslacht of dat het staal ouder is dan wordt verteld. *Pseudomonas* kan in de koelkast groeien.

Van BPW-1-1-d en BPW-1-1-x wordt op dag 1 100µl op een cephaloridine fucidine cetrimide (CFC) plaat geënt. Dit gebeurt in duplo. De platen worden geïncubeerd bij 25°C onder aerobe omstandigheden voor 48 uur.

Op dag 3 wordt groei op de CFC platen bevestigd door oxidase. Van 1% n-tetra-methyl-*p*-phenylenediamine dihydrochloride wordt 0,20ml in 20ml water opgelost. Daarna wordt dit over

de plaat gegoten. Na een minuut zullen de kolonies verkleuren. Enkel de blauwe kolonies worden geteld en genoteerd. Dit per sector en verdunning. Daarna worden de platen in de koelkast bewaard tot dag 5.

8.3 Pathogenen

8.3.1 Detectie van thermofiele campylobacters

Op dag 1 wordt 100µl van BPW-1-1-d spiraalsgewijs aangebracht op een charcoal cefoperozone deoxycholate agar (CCDA) plaat en geïncubeerd in een jar bij 41,5°C onder micro-aerobe samenstelling AM1 voor 48 uur.

Op dag 2 wordt 100µl van de verrijkte PB over een CCDA-agar plaat spiraalsgewijs geënt en geïncubeerd in een jar bij 41,5°C onder micro-aerobe samenstelling AM1 voor 48 uur. De PB is verrijkt door het supplement op te lossen in 2ml water. Dit supplement, Modified Preston *Campylobacter* Selective Supplement SR0204E (Oxoid), bevat: 2.500 UI polymixine B, 5,0mg rifampicine, 5,0mg trimethoprim en 5,0mg amphotericine B. Bij 500ml van de PB is 25ml van het opgeloste supplement toegevoegd en 25ml gelyseerd bloed. De CCDA plaat van BPW-1-1-d van dag 1 wordt in de incubator gelaten.

Op dag 3 wordt de CCDA-agar plaat die op de 1^{ste} dag is gemaakt van BPW1-1-d, beoordeeld. Er wordt eerst gekeken of er typische kolonies aanwezig zijn. Indien er geen zijn, mag de plaat weg. Indien er typische kolonies aanwezig zijn, worden alle typische kolonies geteld en overgebracht naar een bloed agar plaat (BA). Deze wordt geïncubeerd in een jar bij 41,5°C onder micro-aerobe samenstelling AM1 voor 24-48 uur. De CCDA agar plaat van de PB die gemaakt is op dag 2 wordt in de incubator gelaten.

Op dag 4 wordt de CCDA-agar plaat die op dag 2 is gemaakt van de PB gecontroleerd op typische kolonies. Er worden maximaal 2 typische kolonies overgebracht op een bloed agar plaat. Deze wordt geïncubeerd in een jar bij 41,5°C onder micro-aerobe samenstelling AM1 voor 24-48 uur. De BA plaat van BPW-1-1-d die gemaakt is op dag 3 blijft in de incubator.

Op dag 5 wordt de BA plaat van BPW-1-1-d, gemaakt op dag 3, gebruikt voor MALDI-ID. Daarna worden er zoveel mogelijk van de overgebleven kolonies in tubes overgebracht met 1ml bloed. Deze worden genoteerd en bewaard bij -80°C. De BA plaat van de PB die gemaakt is op dag 4, blijft in de incubator.

Op dag 5 wordt de BA plaat van PB, gemaakt op dag 4, gebruikt voor MALDI-ID. Daarna worden er zoveel mogelijk van de overgebleven kolonies in tubes overgebracht met 1ml bloed. Deze worden genoteerd en bewaard bij -80°C.

8.3.2 Detectie van *Salmonella*

Op dag 2 wordt de stomacher zak met BPW-2 uitgehaald. Er worden 3 druppels geënt op een modified semi-solid rappaport vassiliadis agar (MSRV) plaat. Dit wordt geïncubeerd bij 41,5°C onder aerobe omstandigheden. Plaats de plaat op de juiste manier in de incubator, met de bodem naar beneden.

Op dag 3 wordt de MSRV plaat gecontroleerd op zwermen. Bij afwezigheid van zwermen is het resultaat negatief voor *Salmonella*. Bij aanwezigheid van zwermende kolonies wordt een loop vol met bacteriën van de buitenste uiteinden op een xylose lysine deoxycholate (XLD) plaat geënt. De plaat wordt geïncubeerd bij 37°C onder aerobe omstandigheden voor 24 uur.

Op dag 4 wordt de XLD plaat gecontroleerd op de aanwezigheid van zwarte kolonies met een witte halo op de violetkleurige agar. Bij afwezigheid van kolonies, is het resultaat negatief voor *Salmonella*. Bij aanwezigheid wordt een loop vol met bacteriën van het buitenste uiteinde op een trypticase soy agar (TSA) plaat geënt. De plaat wordt geïncubeerd bij 37°C onder aerobe omstandigheden voor 24 uur.

Op dag 5 wordt een deel van de bacteriële groei gebruikt voor MALDI-ID. De rest wordt overgebracht naar een tube met TSB/glycerol en bewaard bij -20°C.

8.4 Targetpathogenen

8.4.1 Detectie van niet-thermofiele campylobacters

Een supplement wordt opgelost in 4ml water. Dit supplement, C.A.T. Selective Supplement SR0174E (Oxoid), bestaat uit 4,0mg cefoperazone, 2,0mg teicoplanin en 5,0mg amphotericine B. Bij 500ml CAT bouillon wordt 4ml van deze oplossing toegevoegd en 25ml vers bloed.

Op dag 2 wordt de verrijkte CAT bouillon uit de incubator gehaald. Zes druppels worden op een poly-carbonaat (PC) filter gebracht op een BA plaat en voor 1 uur geïncubeerd onder micro-aerobe samenstelling AM1 in een jar. Daarna wordt de filter verwijderd. Van de verrijkte CAT bouillon wordt ook 100µl spiraalsgewijs op een CAT-agar plaat geënt. Beide platen worden geïncubeerd in een jar bij 37°C onder micro-aerobe samenstelling AM1 voor 48-120 uur.

Op dag 3 worden beide platen in de incubator gelaten.

Op dag 4 worden de platen gecontroleerd op typische kolonies. Wanneer er geen aanwezig zijn, worden de platen terug in de incubator gelegd tot dag 5. Indien er typische kolonies aanwezig zijn, worden deze per plaat overgebracht naar een BA plaat en geïncubeerd bij 37°C onder micro-aerobe samenstelling AM1 voor 48-72 uur. Op dag 6-8 wordt een deel van de groei gebruikt voor MALDI-ID. Er worden zoveel als mogelijk van de overgebleven kolonies in een tube met 1ml bloed gebracht. De tubes met TSB/glycerol worden genoteerd en bewaard bij -80°C.

Op dag 5 worden de platen gecontroleerd op typische kolonies. Wanneer er geen aanwezig zijn, mogen de platen weg. Indien er typische kolonies aanwezig zijn, worden deze per plaat overgebracht naar een BA plaat en geïncubeerd bij 37°C onder micro-aerobe samenstelling AM1 voor 48 uur. Op dag 8 wordt een deel van de groei gebruikt voor MALDI-ID. Breng zoveel als mogelijk van elke kolonie in een tube met 1ml bloed. De tubes met TSB/glycerol worden genoteerd en bewaard bij -80°C.

Op dag 5 worden de platen gecontroleerd op typische kolonies. Wanneer er geen aanwezig zijn, mogen de platen weg. Indien er typische kolonies aanwezig zijn, worden deze per plaat overgebracht naar een BA plaat en geïncubeerd bij 35°C onder micro-aerobe samenstelling AM1 voor 48 uur. Op dag 8 wordt een deel van de groei gebruikt voor MALDI-ID. Breng zoveel als mogelijk van de overgebleven kolonies in een tube met 1ml bloed. De tubes met TSB/glycerol worden genoteerd en bewaard bij -80°C.

8.4.2 Detectie en telling van *Proteus mirabilis*

Op dag 1 worden van BPW-1-1-d en BPW-1-1-x 100µl spiraalsgewijs op een BA plaat, een XLD plaat en een violet red bile glucose (VRBG) agar plaat geënt. Deze worden geïncubeerd bij 30°C onder aerobe omstandigheden voor 18-20 uur.

Op dag 2 worden de platen van dag 1 gecontroleerd op de aanwezigheid van typische kolonies. Wanneer er geen aanwezig zijn, moeten de platen 12 uur in de incubator. Indien er dan nog steeds geen groei is, is het resultaat negatief. Wanneer er wel typische kolonies aanwezig zijn, worden deze overgebracht naar een TSA plaat. Maximaal 5 kolonies worden overgebracht naar elk één plaat. De platen worden geïncubeerd bij 37°C onder aerobe omstandigheden voor 24 uur.

De BPW-1-2 bouillon wordt met 4µl/40ml Pw verdund (x). Deze verdunding wordt verder verdund met 4µl/4ml Pw (xx). Dit wordt weer verdund met 4µl/4ml Pw (xxx). Van BPW-1-2-xx en BPW-1-2-xxx wordt 100µl spiraalsgewijs geënt op een BA plaat, een XDL agar plaat en VRBG agar plaat. De platen worden geïncubeerd bij 30°C onder aerobe omstandigheden voor 18-20 uur. Wanneer er geen zwermende kolonies zijn, moeten de platen nog eens 12 uur geïncubeerd worden.

Op dag 3 worden van alle TSA platen alle isolaten van de bacteriële groei verzameld en klaargemaakt voor MALDI-ID en opgeslagen in TSB/glyceroltubes bij -20°C. De platen gemaakt met de BPW-1-2-xx en BPW-1-2-xxx worden gecontroleerd op de aanwezigheid van typische kolonies. Wanneer er geen kolonies aanwezig zijn, is het resultaat negatief en mag de plaat weg. Bij aanwezigheid van typische kolonies, worden er 2 kolonies op aparte TSA platen geënt en geïncubeerd bij 37°C onder aerobe omstandigheden voor 24 uur.

Op dag 4 worden van alle TSA platen alle isolaten van de bacteriële groei verzameld en klaargemaakt voor MALDI-ID en opgeslagen in TSB/glyceroltubes bij -20°C.

8.4.3 Detectie en telling van *Escherichia albertii*

Op dag 1 wordt van het BPW-1-1-d homogenaat 3 keer 500µl op 3 *albertii* TSA-agar platen geënt. Dit is de directe isolatie. De platen worden bij 41,5°C geïncubeerd onder aerobe omstandigheden voor 24 uur.

Op dag 2 worden op de platen de witte transparante kolonies geteld. Er wordt ook gezocht naar rode zwermende kolonies. Dit zijn *Proteus* kolonies. Van de transparante witte kolonies worden er maximaal 10 per plaat naar een individuele *albertii* TSA plaat overgebracht. Dit zijn maximaal 5 kolonies per plaat. De platen worden elk geïdentificeerd en daarna geïncubeerd bij 37°C onder aerobe omstandigheden voor 24 uur. Van de TSB-A bouillon wordt een verdunding gemaakt van 4µl/4ml Pw (xx). Een deel hiervan wordt uitgeënt op een *albertii* TSA-agar plaat. Van de eerste verdunding wordt er nog een verdunding gemaakt van 4µl/4ml Pw (xxx). Ook hier wordt een deel van uitgeënt op een *albertii* TSA-agar plaat. Beide platen worden geïncubeerd bij 41,5°C onder aerobe omstandigheden voor 24 uur.

Op dag 3 worden de *albertii* TSA platen gecontroleerd op groei en reinheid. De kolonies worden voor een 2^{de} keer op een *albertii* TSA plaat geënt en geïncubeerd bij 37°C onder aerobe omstandigheden voor 24 uur.

De *albertii* TSA-agar platen, gemaakt van de verdunningen, worden gecontroleerd op witte transparante kolonies en rode zwermende kolonies. Dit zijn *Proteus* kolonies. Van de transparante witte kolonies worden er maximaal 5 per plaat naar een individuele *albertii* TSA plaat overgebracht. Dit zijn maximaal 5 kolonies per plaat. De platen worden elk geïdentificeerd en daarna geïncubeerd bij 37°C onder aerobe omstandigheden voor 24 uur.

Op dag 4 wordt van een deel van de bacteriële groei van de *albertii* TSA platen gebruikt voor MALDI-ID. De overige bacteriën worden in TSA/glycerol tubes opgeslagen bij -20°C. De andere *albertii* TSA platen worden gecontroleerd op groei en reinheid. De kolonies worden

voor een 2^{de} keer overgebracht op *albertii* TSA platen en geïncubeerd bij 37°C onder aerobe omstandigheden voor 24 uur.

Op dag 5 wordt na MALDI-ID *E. albertii* opgeslagen bij -20°C, net als *Proteus* of *Klebsiella*. Andere bacteriën worden niet gebruikt. Alle resultaten worden opgeslagen. Van de TSA platen wordt een deel van de bacteriële groei gebruikt voor MALDI-ID. De overige bacteriën worden in TSB/glycerol tubes opgeslagen bij -20°C.

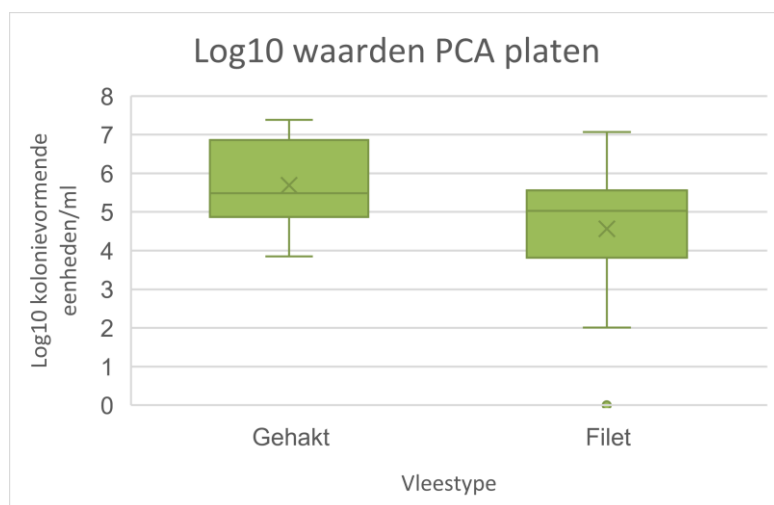
9 Resultaten

Van 1 september 2022 tot 8 april 2023 zijn er 16 stalen gehakt en 12 stalen varkensfilet onderzocht.

9.1 Algemene analyse

9.1.1 Totaal aerob kiemgetal

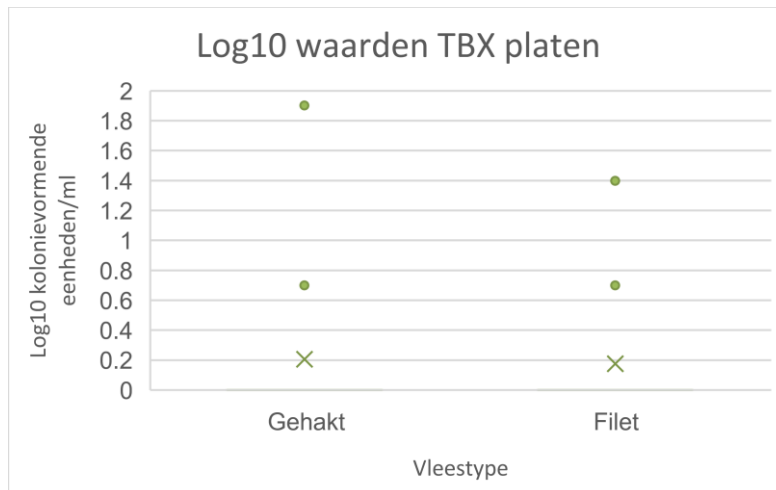
Het totaal aerob kiemgetal bedroeg gemiddeld 5,69 log₁₀ kve/ml voor gehakt en 4,56 log₁₀ kve/ml voor varkensfilets. Als er naar de mediaan gekeken wordt, is te zien dat de waarden niet veel van elkaar verschillen. De mediaan van gehakt bedraagt 5,48 log₁₀ kve/ml en deze voor varkensfilets 5,02 log₁₀ kve/ml. Ook de maximale waarden verschillen niet veel. De maximale waarde van gehakt ligt op 7,38 log₁₀ kve/ml en deze voor varkensfilets op 7,07 log₁₀ kve/ml. De minimale waarden liggen wat meer uit elkaar. Voor gehakt ligt de minimale waarde op 2,85 log₁₀ kve/ml, voor varkensfilets ligt deze op 2,01 log₁₀ kve/ml. De interkwartielafstanden verschillen wat. De interkwartielafstand voor gehakt is iets langer dan deze voor varkensfilets. De waarden zijn meer verspreid. De waarde van het bovenste kwartiel voor gehakt bedraagt 6,86 log₁₀ kve/ml. Dit is hoger dan deze voor varkensfilets. Die bedraagt 5,56 log₁₀ kve/ml. Hetzelfde kan gezien worden bij de onderste kwartielen. De waarde voor gehakt ligt met 3,85 log₁₀ kve/ml hoger dan de waarde voor varkensfilets. Deze bedraagt 3,81 log₁₀ kve/ml. De waarden van gehakt zijn eerder positief verdeeld, die van varkensfilets eerder negatief. Enkel bij varkensfilets was er een uitschieter. Deze bedroeg 0. De resultaten worden weergegeven op grafiek 1.



Grafiek 1: De bekomen waarden van de tellingen op PCA platen voor het aerob kiemgetal worden weergegeven via een boxplot. De waarden worden weergegeven in log₁₀ kve/ml.

9.1.2 *E. coli* telling

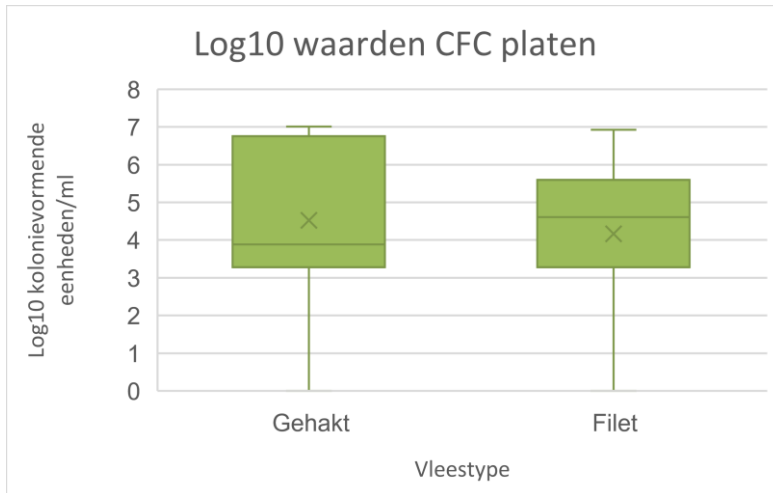
Er werden bijna geen *E. coli* gevonden op beide type stalen. Er zijn enkel enkele uitschieters. De hoogste uitschieter voor gehakt bedraagt 1,90 log₁₀ kve/ml, deze voor varkensfilets 1,40 log₁₀ kve/ml. Het gemiddeld aantal *E. coli* dat gevonden werd op gehakt bedraagt 0,21 log₁₀ kve/ml. Op varkensfilets werden gemiddeld 0,17 log₁₀ kve/ml *E. coli* gevonden. De resultaten worden weergegeven op grafiek 2.



Grafiek 2: De bekomen waarden van de tellingen op TBX platen voor het aantal *E. coli* worden weergegeven via een boxplot. De waarden worden weergegeven in log₁₀ kve/ml.

9.1.3 Telling vermoedelijke *Pseudomonas* species

Het aantal gevonden *Pseudomonas* spp. bedroeg gemiddeld 5,52 log₁₀ kve/ml voor gehakt en 4,17 log₁₀ kve/ml voor varkensfilets. Als er naar de mediaan gekeken wordt, is te zien dat de waarden niet veel van elkaar verschillen. De mediaan van gehakt bedraagt 3,89 log₁₀ kve/ml en deze van varkensfilets 4,61 log₁₀ kve/ml. De maximale waarden verschillen zo goed als niet. Deze bedragen 7,01 log₁₀ kve/ml voor gehakt en 6,92 log₁₀ kve/ml voor varkensfilets. De minimale waarde ligt voor beide vleestypes op 0. De interkwartielafstanden verschillen wat. De interkwartielafstand voor gehakt is iets langer dan deze voor varkensfilets. Dit wil zeggen dat de waarden meer verspreid zijn. De waarde van het bovenste kwartiel voor gehakt bedraagt 6,76 log₁₀ kve/ml. Dit is hoger dan deze voor varkensfilets. Die bedraagt 5,59 log₁₀ kve/ml. De onderste kwartielen verschillen eveneens zo goed als niet. De waarde ligt voor beide vleestypes op 3,28 log₁₀ kve/ml. De waarden van gehakt zijn eerder positief verdeeld, die van varkensfilets eerder negatief. Er waren geen uitschieters. De resultaten worden weergegeven op grafiek 3.



Grafiek 3: De bekomen waarden van de tellingen op CFC platen voor *Pseudomonas* spp. worden weergegeven via een boxplot. De waarden worden weergegeven in log₁₀ kve/ml

9.2 Thermofiele campylobacters

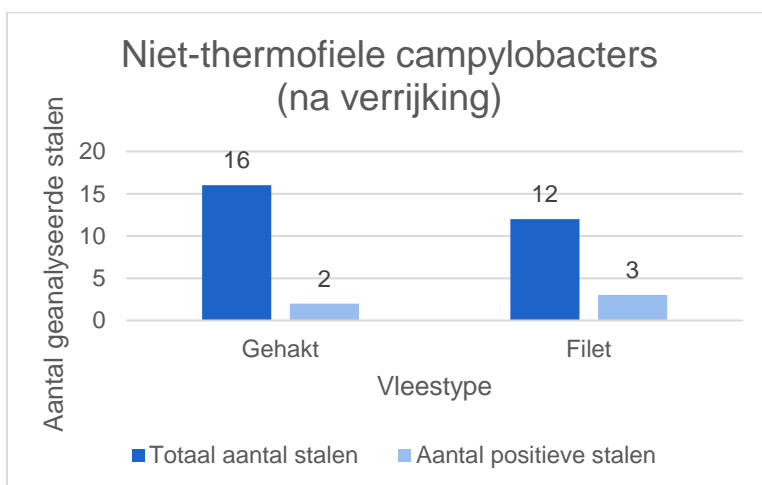
Er werden geen thermofiele campylobacters geïsoleerd van de onderzochte stalen.

9.3 *Salmonella*

Er werden geen *Salmonella* geïsoleerd van de onderzochte stalen.

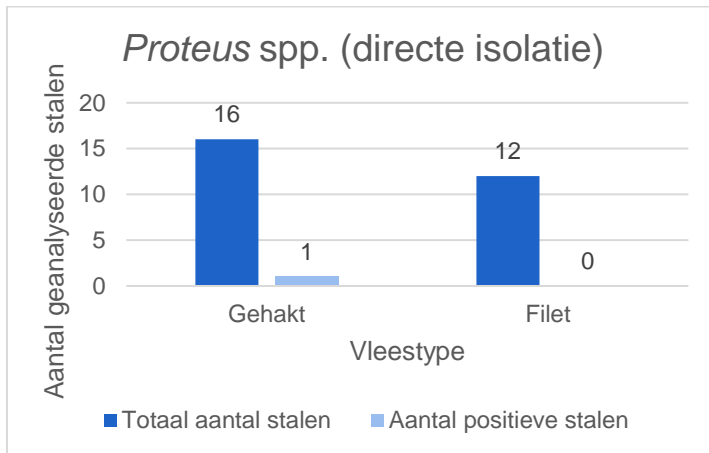
9.4 Targetpathogenen

Na verrijking zijn op 2 van de 16 stalen gehakt en op 3 van de 12 stalen varkensfilet niet-thermofiele campylobacters gevonden. Dit staat weergegeven op grafiek 4. Na identificatie met MALTI-TOF MS werd bevestigd dat dit *C. concisus* was. Allen werden afgenomen van bloed agar platen. Een directe isolatie werd niet uitgevoerd. *Campylobacter curvus* en *C. rectus* zijn niet gevonden.

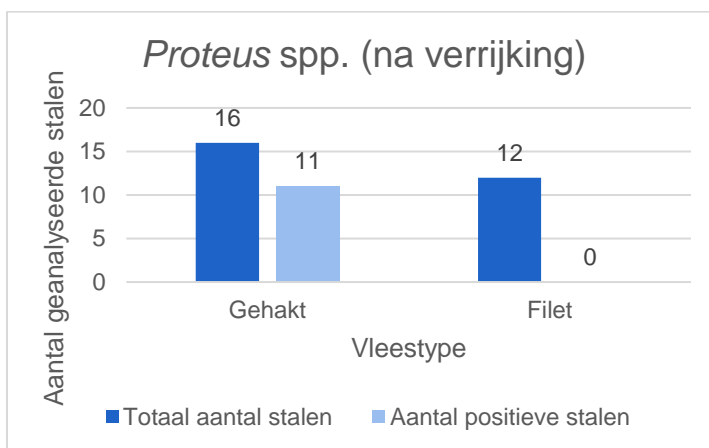


Grafiek 4: Het totaal aantal stalen (donker blauw) en het aantal positieve stalen voor niet-thermofiele *Campylobacter* spp. (licht blauw) worden weergegeven door de balken. De waarden worden weergegeven per vleestype.

Na directe isolatie werden *Proteus* spp. teruggevonden op 1 staal gehakt. Op de stalen varkensfilet werden geen *Proteus* spp. teruggevonden. Dit staat geïllustreerd op grafiek 5. Na verrijking waren 11 stalen gehakt positief voor *Proteus* spp. De stalen varkensfilet bleven negatief. Grafiek 6 geeft deze resultaten weer.

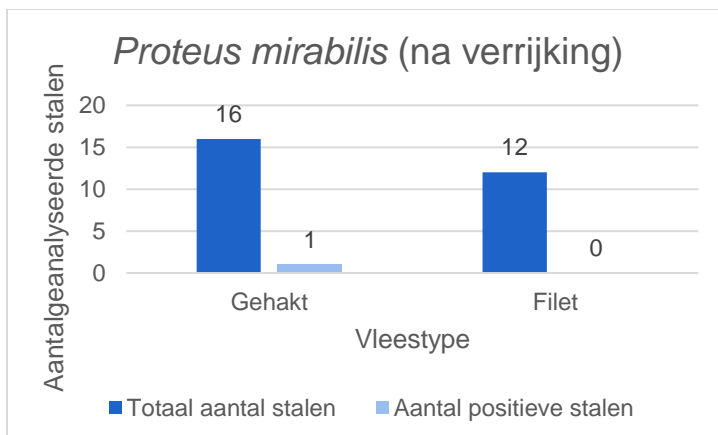


Grafiek 5: Het totaal aantal stalen (donker blauw) en het aantal positieve stalen na directe isolatie voor *Proteus* spp. (licht blauw) worden weergegeven door de balken. De waarden worden weergegeven per vleestype.



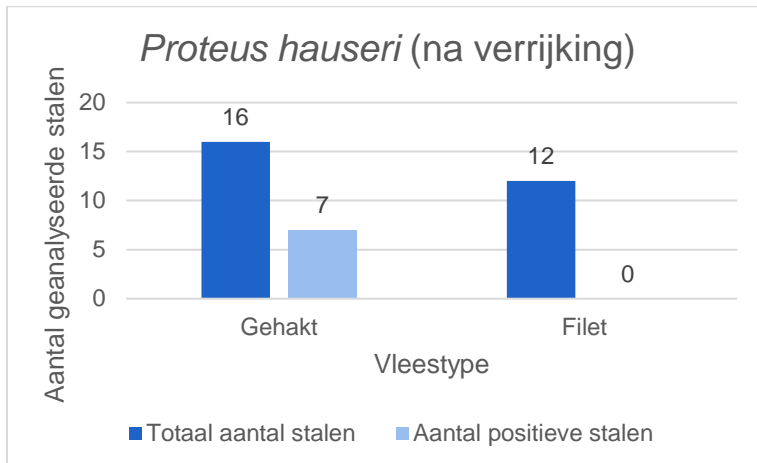
Grafiek 6: Het totaal aantal stalen (donker blauw) en het aantal positieve stalen na verrijking voor *Proteus* spp. (licht blauw) worden weergegeven door de balken. De waarden worden weergegeven per vleestype.

Proteus mirabilis werd niet gevonden na directe isolatie. Na verrijking was 1 staal gehakt positief. De stalen varkensfilet bleven negatief. Grafiek 7 geeft de resultaten weer.



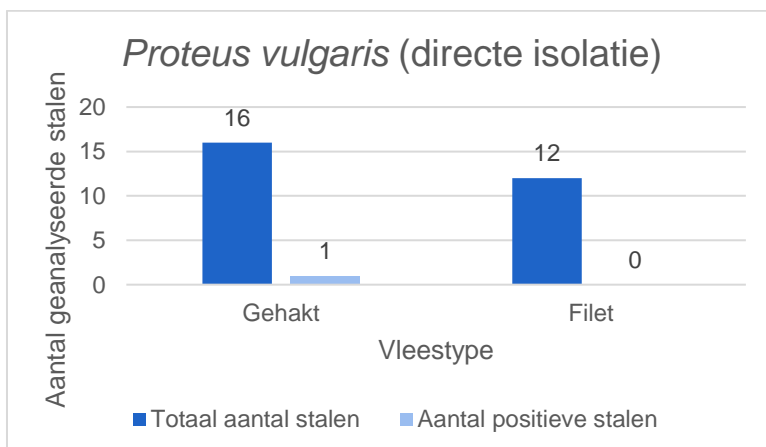
Grafiek 7: Het totaal aantal stalen (donker blauw) en het aantal positieve stalen na verrijking voor *P. mirabilis* (licht blauw) worden weergegeven door de balken. De waarden worden weergegeven per vleestype.

Proteus hauseri kon niet gevonden worden na directe isolatie. Na verrijking waren 7 stalen gehakt positief. De stalen varkensfilet bleven negatief. Dit wordt weergegeven op grafiek 8.

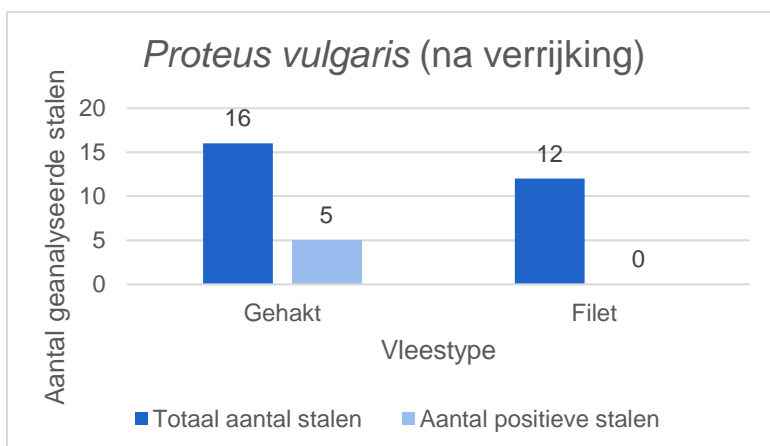


Grafiek 8: Het totaal aantal stalen (donker blauw) en het aantal positieve stalen na verrijking voor *P. hauseri* (licht blauw) worden weergegeven door de balken. De waarden worden weergegeven per vleestype.

Proteus vulgaris kon na directe isolatie teruggevonden worden op 1 staal gehakt. Dit is weergegeven in grafiek 9. Na verrijking waren 5 stalen gehakt positief. De stalen varkensfilet bleven negatief. De resultaten worden weergegeven op grafiek 10.

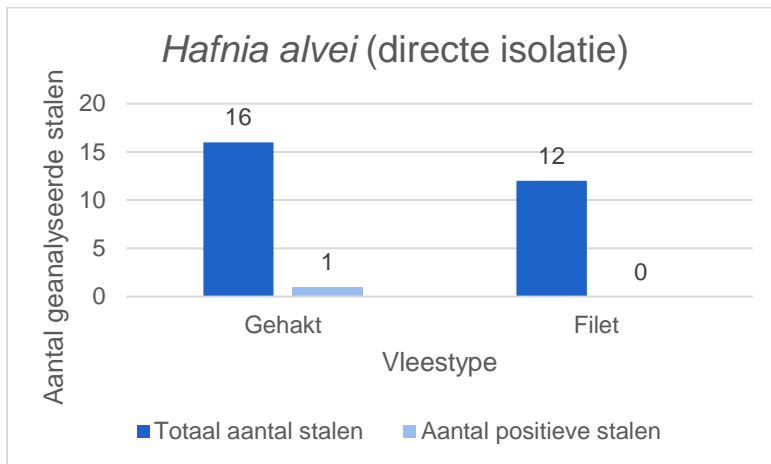


Grafiek 9: Het totaal aantal stalen (donker blauw) en het aantal positieve stalen na directe isolatie voor *P. vulgaris* (licht blauw) worden weergegeven door de balken. De waarden worden weergegeven per vleestype.

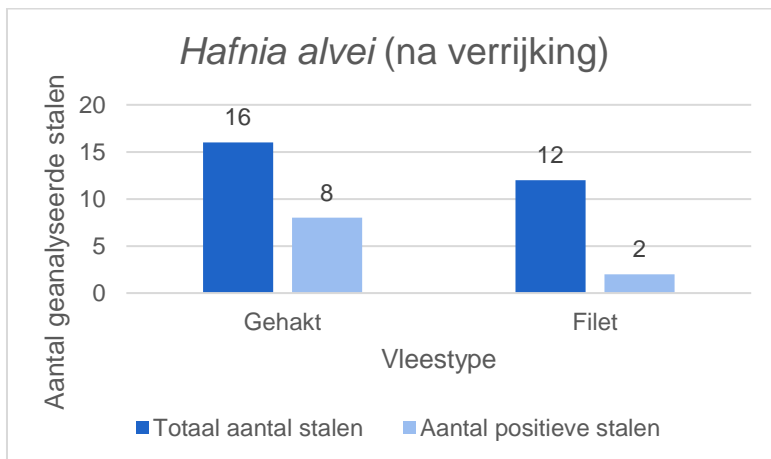


Grafiek 10: Het totaal aantal stalen (donker blauw) en het aantal positieve stalen na verrijking voor *P. vulgaris* (licht blauw) worden weergegeven door de balken. De waarden worden weergegeven per vleestype.

Na directe isolatie kon op 1 staal gehakt *H. alvei* gevonden worden. De stalen varkensfilets waren negatief. Dit is weergegeven op grafiek 11. Na verrijking waren 8 stalen gehakt en 2 stalen varkensfilets positief voor *H. alvei*. Deze resultaten worden weergegeven op grafiek 12.



Grafiek 11: Het totaal aantal stalen (donker blauw) en het aantal positieve stalen na directe isolatie voor *H. alvei* (licht blauw) worden weergegeven door de balken. De waarden worden weergegeven per vleestype.



Grafiek 12: Het totaal aantal stalen (donker blauw) en het aantal positieve stalen na verrijking voor *H. alvei* (licht blauw) worden weergegeven door de balken. De waarden worden weergegeven per vleestype.

10 Discussie

10.1 Resultaten

10.1.1 Algemene analyse

Het totaal aerobisch kiemgetal is gemiddeld hoger voor gehakt dan voor varkensfilets. Gezien de medianen in elkaars box liggen, verschillen de waarden niet veel van elkaar. Toch liggen de waarden die gevonden zijn voor gehakt hoger. Dit is goed te zien aan de minimale waarde. Deze is voor gehakt hoger dan deze voor varkensfilet. Er zijn geen richtwaarden voor vlees op consumentenniveau om de bekomen resultaten mee te vergelijken. Hiervoor zijn er nog geen of weinig studies uitgevoerd. Er kan wel gesteld worden dat waarden boven $10E6$ hoog zijn en niet aanvaard worden.

Er zijn bijna geen *E. coli* teruggevonden op beide vleestypes. Dit is geruststellend aangezien dit een indicator is voor de faecale contaminatie. De resultaten geven dus aan dat er zo goed

als geen faecale contaminatie is opgetreden. De hoogste uitschieter was bij gehakt. Ook hier zijn er geen richtwaarden beschikbaar voor de retail en wordt gesteld dat waarden boven de 10E6 niet aanvaard worden.

Waarden vanaf 10E6-10E7 zijn significant voor bederf. De gemiddelde waarden voor het voorkomen van *Pseudomonas* spp. van beide vleestypes liggen onder deze waarden. De waarden van beide vleestypes verschillen, gezien de medianen in elkaars box liggen, niet veel. De mediaan van gehakt is lager dan deze van varkensfilets. De waarden voor gehakt zijn ook wat meer gespreid. Toch zijn de waarden algemeen hoger dan deze voor varkensfilets. Het bovenste kwartiel ligt voor gehakt hoger dan voor varkensfilets.

Wanneer er gekeken wordt naar het type vlees, blijkt varkensgehakt meer gecontamineerd dan varkensfilet. Dit kan te verklaren zijn aan het productieproces. Varkensfilet is puur spiervlees en is minder bewerkt geweest. Gehakt is samengesteld uit verschillende stukken vlees en vet en wordt gemalen in een gehaktmolen. Hierbij zijn er meer bewerkingen waarbij het vlees gecontamineerd kan worden. De gehaktmolen is een complexe machine met verschillende onderdelen die moeilijker gereinigd kunnen worden.

Omdat de aantallen onderzochte stalen te laag zijn, kunnen er voorlopig nog geen statistisch onderbouwde conclusies getrokken worden.

10.1.2 Thermofiele *Campylobacter* spp.

In The European Union On Health 2021 Zoonoses report, opgemaakt door de European Food Safety Authority (EFSA) in samenwerking met het European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) ("The European Union One Health 2021 Zoonoses Report," 2022), wordt vermeld dat 10,9% van de voedselwaren die gecategoriseerd worden in de 'non-ready-to-eat' categorie positief was voor *Campylobacter*. In deze categorie waren vooral de vlees en vleesproducten het vaakst positief (11,9%). *Campylobacter* werd enkel op vleeswaren van de "vers vlees" categorie gevonden. De categorie "vlees en vleesproducten" bevat karkassen, vers vlees of ready to eat (RTE), gekookte en gefermenteerde producten. Sinds 2019 werden er meer rapporteringen gemaakt voor het voorkomen op vlees en vleesproducten. Dit kan het gevolg zijn van de implementatie van de regulatie (EU)2019/627. In 2021 zijn 3.220 stalen genomen van voedselwaren in de categorie "RTE". Binnen deze categorie waren 13,1% van de vlees en vleesproducten. In totaal waren er 10 van de TRE stalen positief, waarvan 1 staal van de vlees en vleesproducten. Het percentage op vers varkensvlees was laag, namelijk 2,5%. Er werden 239 stalen onderzocht en 9 waren positief voor *Campylobacter*.

In Europa zijn er verschillende onderzoeken gebeurd naar het voorkomen van *Campylobacter* op varkensvlees. Wiczorek et al. (n.d.) hebben onderzoek gedaan naar onder andere de prevalentie van *Campylobacter* op varkensvlees in Polen. Van de 558 stalen waren er 85 stalen varkensvlees. Deze waren allemaal negatief. Dit komt overeen met de resultaten in deze masterproef. Lynch et al. (2011) heeft in Ierland de prevalentie van *Campylobacter* onderzocht op verse vleeswaren die verkocht werden in supermarkten en slagerijen met een aangepast isolatieprotocol. Er werden 550 stalen onderzocht waarvan 179 stalen varkensvlees. Daarvan was 22% positief en konden tot 4 verschillende species *Campylobacter* teruggevonden worden. Vleeswaren die onverpakt verkocht werden, waren meer gecontamineerd met *Campylobacter* dan vleeswaren die verkocht werden in verpakking met gemodificeerde atmosfeer. Gehakt was ook meer gecontamineerd dan andere producten, net als in deze masterproef. Het feit dat er zoveel *Campylobacter* kon teruggevonden worden, kan te verklaren zijn aan het alternatieve isolatieprotocol dat werd gebruikt. Met dit protocol kon er een bredere waaier aan species geïsoleerd worden. Deze studie toonde aan dat er naast een

hogere prevalentie ook een grotere verscheidenheid is aan *Campylobacter* spp. op varkensvlees en dat deze vooral gevonden worden wanneer er niet-routinematige methoden gebruikt worden. Ook Whyte et al. (2004) heeft in Ierland onderzoek uitgevoerd naar het voorkomen van *Campylobacter* op etenswaren. Van de 2.391 stalen die genomen werden waren er 197 stalen varkensvlees. Hiervan waren 10 stalen (5,1%) positief voor *Campylobacter*. Voor 90% van de stalen was dit *C. coli*. Voor de andere 10% was dit *C. jejuni*. In België is er over een periode van 7 jaar een onderzoek gebeurd naar de contaminatie met *Campylobacter* van vlees in verschillende productiefasen. Varkensvlees vertoonde een lage prevalentie. Bij onderzoek van stalen van 1g gehakt was 0,7% positief, bij stalen van 0,1g was dit 1,4%. Dit was in de eerste fase van het onderzoek. Tijdens de tweede fase bedroeg de prevalentie op gehakt 2,5% bij stalen van 25g. De prevalentie was iets hoger in de retail dan in andere fasen van de productie. Een mogelijke verklaring hiervoor zou kruiscontaminatie kunnen zijn. *Campylobacter coli* en *C. jejuni* waren de meest geïsoleerde species. (Ghafir et al., (2007) Pezzotti et al. (n.d.) onderzocht in 2000 en 2001 onder andere de prevalentie van *C. jejuni* en *C. coli* in dieren en vlees in het Noordoosten van Italië. Op 10,3% van de stalen varkensvlees konden deze *Campylobacter* spp. teruggevonden worden. In een andere studie in Italië heeft Zanetti et al. (1996) de prevalentie van *Campylobacter* spp. onderzocht. Hier bleken 2,4% van de varkensworsten gecontamineerd.

Ondanks dat er in de onderzochte stalen geen *Campylobacter* zijn teruggevonden en de studie van Wiczorek et al. (n.d.) dezelfde resultaten bekwam, geven de meeste andere studies aan dat er toch een bepaalde graad van besmetting zou zijn. De mate van contaminatie varieert wel. Verschillende factoren zoals staalname, gebruikte media en omstandigheden waarin de *Campylobacter* spp. gecultiveerd worden, spelen een belangrijke rol in de kans op het vinden van deze species. Deze factoren moeten in gedachten gehouden worden bij het vergelijken van de verschillende studies. Naast deze studies geeft ook het laatste rapport van het EFSA aan dat thermofiele *Campylobacters* voorkomen op varkensvlees. Ook hier moet met een aantal zaken rekening gehouden worden. Zo hebben verschillende landen verschillende manieren van rapporteren en gelden er verschillende criteria voor er onderzoek gebeurd. Ook niet alle lidstaten rapporteren. Daarnaast kan het zijn dat er geen thermofiele *campylobacters* gevonden zijn doordat er maar een beperkt aantal stalen is onderzocht in het kader van deze masterproef.

10.1.3 *Salmonella*

In The European Union On Health 2021 Zoonoses report ("The European Union One Health 2021 Zoonoses Report," 2022) wordt vermeld dat vlees en vleesproducten van varkens, met 0,82% positieve stalen, het meest positief waren op *Salmonella*. Dit was bij de "ready to eat" (RTE) categorie. In 2021 werden er 8.014 stalen onderzocht. Daarvan waren er 66 stalen positief. *Salmonella typhimurium* kwam hierbij het meest voor.

Hansen et al. (2010) heeft in Denemarken in 2002 en in 2006 de prevalentie van *Salmonella* op varkensvlees onderzocht. In 2002 zijn 4.498 stalen onderzocht. Hiervan was 1,2% positief. In 2006 werden 887 stalen onderzocht. Hiervan was 4,2% positief. Het onderzoek stelde ook een verband vast tussen het voorkomen van hoge aantallen *Enterobacteriaceae* en het voorkomen van *Salmonella*. In een andere studie van Hansen et al. (2016) werd het potentieel van Enterococconen als indicator voor *Salmonella* in gehakt onderzocht. Er zijn 2.187 stalen genomen van varkensgehakt. Hiervan waren er 46 (2,1%) positief op *Salmonella*. Van de 1.955 stalen die onderzocht werden op het voorkomen van Enterococconen was 23% positief. Vooral in de stalen die meer dan 100CFU/g (colony forming units) vertoonden, was de prevalentie van *Salmonella* significant hoger. In België is er door Delhalle et al. (2009) een

studie uitgevoerd naar het voorkomen van *Salmonella* na het slachten van varkens. In de retail werden enkel stalen genomen van gehakt. Het aantal positieve stalen varieerde van 0,3% tot 4,3%. De data zijn vooral afkomstig van de autocontrole die de bedrijven toepassen. In Ierland heeft Prendergast et al. (2009) 500 stalen varkensvlees onderzocht. Op 13 stalen (2,6%) werd *Salmonella* teruggevonden in aantallen die varieerden tussen <0,03 en 2,10MPN/g (most probable number). Ook hier was er een directe associatie tussen het voorkomen van *Salmonella* en het aantal *Enterobacteriaceae*. Opvallend is dat van 5 van de 13 positieve stalen (38,5%) kon aangetoond worden dat dit het gevolg was van kruiscontaminatie. Boughton et al. (2004) onderzocht de prevalentie van *Salmonella* op varkensworsten in Ierland. Tijdens het eerste deel waren 20 van de 455 stalen (4,4%) positief. Tijdens het tweede deel waren er maar 7 van de 466 stalen (1,5%) positief. Jordan et al. (2006) heeft de data van de Department of Agriculture and Food (DAF) in Ierland over het voorkomen van *Salmonella* over de periode 2002 tot 2004 geanalyseerd. Van alle onderzochte stalen werden er 21.144 stalen varkensvlees onderzocht. Hiervan waren er 454 (2,1%) positief. In Italië onderzocht Busani et al. (2005) de prevalentie van *Salmonella enterica* en *Listeria monocytogenes* op etenswaren van dierlijke oorsprong. De data waren afkomstig van routinetesten op etenswaren die onderzocht werden voor officiële controles tijdens de periode van 2001 en 2002. Er zijn toen 3.182 stalen varkensvlees geanalyseerd. Hiervan waren 155 stalen (4,9%) positief voor *Salmonella*.

Net als bij de studies over thermofiele campylobacters, waren vleeswaren die onverpakt verkocht werden meer gecontamineerd dan wanneer deze verpakt waren in een verpakking met gemodificeerde atmosfeer. Ook gehakt was meer gecontamineerd dan andere vleesproducten. Dit is deels te verklaren doordat er tijdens de bereiding verschillende stukken vlees gemengd worden. Niet alle stukken zijn besmet of besmet in dezelfde mate. Door het mengen is er een verdere verspreiding van *Salmonella*, maar kan er ook verdunning optreden.

De mate van contaminatie in de retail is sterk afhankelijk van de kwaliteit van de ruwe producten en de hygiëne van voorgaande schakels in de keten. Karkassen zijn de grootste bron van besmetting. Dus als er besmetting optreedt in het slachthuis, zullen alle volgende schakels ook besmet zijn. Ook personeel heeft een grote verantwoordelijkheid naar hygiëne toe. (Delhalle et al., 2009) Hygiëne is zoals bij vele andere zaken, één van de belangrijkste factoren.

Bij deze masterproef is er geen *Salmonella* teruggevonden. Dit is opmerkelijk aangezien de literatuur en het rapport van het EFSA aangeven dat er *Salmonella* kan teruggevonden worden. Het gehalte aan *Salmonella* verschilt. Het feit dat er bij deze masterproef geen *Salmonella* gevonden werd, klopt wel met het gegeven dat er ook bijna geen *E. coli* werd gevonden. Het aantal *E. coli* is gelinkt aan het voorkomen van *Salmonella*. *Salmonella* wordt uitgescheiden in de mest. Wanneer vlees gecontamineerd wordt met mest, kunnen deze samen met *E. coli* gevonden worden. Als het gehalte aan *E. coli* laag is, is de kans op het vinden van andere pathogenen ook laag. Er zijn ook maar een beperkt aantal stalen geanalyseerd in deze masterproef. Dit kan ook een reden zijn waarom er geen *Salmonella* gevonden werd.

10.1.4 Targetpathogenen

Uit de resultaten blijkt dat wanneer er effectief gezocht wordt naar *C. concisus* en *P. mirabilis*, dat deze teruggevonden kunnen worden.

Proteus mirabilis is een paar keer geïdentificeerd, maar *P. vulgaris* en *P. hauseri* lijken vaker voor te komen. Opvallend is dat enkel gehakt positief is en varkensfilets negatief blijven

ongeacht verrijking. Waarom dit zo is, is niet geweten. Het feit dat gehakt meer bewerkingen en handelingen ondergaat dan filets kan hierbij een rol spelen. Het zou dus interessant zijn om deze mee verder te onderzoeken. *Escherichia albertii* is niet gevonden. Omdat *E. albertii* geregeld verkeerdelijk geïdentificeerd wordt als een andere verwante bacterie is het mogelijk dat de prevalentie hoger ligt dan dat de resultaten weergeven. Dit kan bijvoorbeeld het geval zijn voor *Hafnia alvei*. Die is in totaal 11 keer gevonden, vooral na verrijking. De literatuur geeft aan dat *E. albertii* geregeld verkeerdelijk als *H. alvei* wordt geïdentificeerd. Daarnaast wordt *E. albertii* ook geregeld geïdentificeerd als *E. coli*. Diepgaander onderzoek naar deze bacteriën zou nuttig zijn.

Campylobacter concisus is op 5 stalen teruggevonden. Dit is te weinig om te concluderen dat *C. concisus* algemeen zou voorkomen op varkensvlees. Hiervoor moeten meer stalen onderzocht worden en zou de isolatiemethode eventueel wat aangepast moeten worden. Het is geweten dat *Campylobacter* spp. moeilijk groeien in laboratorium omstandigheden. Een langere incubatieperiode kan een optie zijn. Toch geven de data duidelijk aan dat *C. concisus* voorkomt op varkensvlees dat verkocht wordt op consumentenniveau.

10.2 Literatuur

In de literatuur is er weinig tot niets te vinden over het voorkomen van de targetpathogenen. Vooral niet in Europa. De casereports die te vinden zijn, spelen zich veelal af in Azië en dan vooral in China. In veel gevallen is er geen direct verband met het eten van varkensvlees en de voedselinfectie. Indien het vlees de oorzaak is, is dit vaak doordat het vlees besmet is geraakt door gebrekkige hygiëne van personen. Indien er artikelen zijn waar de targetbacteriën aangetoond worden, gaan deze niet specifiek over de prevalentie. Deze artikelen gaan over andere onderwerpen waarbij het aantonen van deze bacteriën noodzakelijk is in het proces, maar niet het doel is. Bij andere artikelen wordt er dan weer gezocht naar een zeer brede waaier aan bacteriën, waarvan de targetpathogenen deel uitmaken of gevonden worden. Deze onderzoeken zijn ook op verschillende soorten voedingsmiddelen en niet enkel op vleeswaren.

Proteus mirabilis is een pathogeen die vaak in verband wordt gebracht met urineweginfecties. Sanches et al. (2021b) vergeleek *P. mirabilis* die gevonden werden bij patiënten met urineweginfecties en deze gevonden op vleeswaren aangekocht op consumentenniveau. Hierbij werd wel specifiek gezocht naar *P. mirabilis* op vleeswaren. Artikelen over het verband van de prevalentie op vleeswaren of andere voedselwaren en gastro-intestinale problemen zijn er niet ondanks het feit dat verschillende onderzoeken hebben aangewezen dat *P. mirabilis* een rol speelt in het ontwikkelen van gastro-intestinale problemen.

In Ierland zijn er twee studies gebeurd naar het voorkomen van *Campylobacter* spp. op varkensvlees. Zo onderzocht Lynch et al. (2011) het voorkomen van verschillende *Campylobacter* spp. op varkensvlees. Varkensvlees vertoonde één van de hoogste prevalenties. Scanlon et al. (2013) onderzocht specifiek het voorkomen van niet-thermofiele campylobacters op varkensvlees en varkensvlees op consumentenniveau. *Campylobacter concisus* was hier de tweede meest geïsoleerde species.

De studie van Wang et al. (2016) naar het voorkomen van *E. albertii* op rauw vlees is de enige studie die gevonden kon worden wat betreft *E. albertii*.

Hoewel er zeer weinig onderzoek is gebeurd naar het voorkomen van deze bacteriën op vleeswaren, kan er toch wel uit geconcludeerd worden dat voor onder andere *C. concisus* en *P. mirabilis* vleeswaren een potentiële besmettingsbron kunnen vormen.

10.3 Klinisch belang bij de mens

Zowel *C. concisus*, *P. mirabilis* als *E. albertii* hebben enige betekenis voor de mens. Voor *E. albertii* zijn deze het minst duidelijk. Er zijn geen uitbraken van gastro-intestinale problemen waarbij *E. albertii* als oorzakelijk agens kon aangetoond worden. Wanneer uitbraken van gastro-intestinale problemen door voedselconsumptie veroorzaakt door eae-positieve *E. coli* verder onderzocht werden, kon *E. albertii* teruggevonden worden. Of dat *E. albertii* dan ook echt de symptomen veroorzaakte, is niet duidelijk. Het is wel aangetoond dat bepaalde *E. albertii* die stx2a produceren, bloederige diarree kunnen veroorzaken. Problemen die *E. albertii* zou kunnen veroorzaken, zijn beperkt en zijn vaak zelflimiterend. Er zijn geen chronische aandoeningen gekend waarbij *E. albertii* een rol zou hebben. Daarbij hebben *E. coli* en *E. albertii* gelijkende eigenschappen waardoor voor beiden dezelfde maatregelen genomen kunnen worden. Dit is praktisch aangezien er weinig extra maatregelen zouden moeten genomen worden omdat er al vele maatregelen zijn om besmetting met *E. coli* te beperken.

Proteus mirabilis en *C. concisus* zijn daarentegen wel betrokken bij verschillende aandoeningen. Zo zijn beiden betrokken in de pathogenese van inflammatoire bowel disease en meer specifiek bij de ziekte van Crohn. Verhoogde aantallen van beide zijn terug te vinden bij patiënten. Zhang et al. (2021) heeft aangetoond dat *P. mirabilis* de progressie van de ziekte versterkt door een dysbiose te veroorzaken, specifieke pathways te activeren en pro-inflammatoire cytokines vrij te stellen. Daarbij leken isolaten uit stoelgangstalen erg op de isolaten uit patiënten met een urineweginfectie. Ook *C. concisus* wordt vaker gevonden bij patiënten met de ziekte van Crohn. Hierbij is er een dysregulatie in de immunrespons op het microbiom in de darm. Die reactie wordt mogelijks getriggerd door *C. concisus*. Hoewel *C. concisus* de darm niet altijd koloniseert zouden de omstandigheden die door de dysbiose gecreëerd worden de kolonisatie wel bevorderen. Een actieve periode of een periode van herval tredt meestal op nadat de permeabiliteit van de darm verhoogd was. Zot producerende *C. concisus* tast de tight junctions aan en kan dus een oorzaak zijn dat de ziekte (her)opflakert. Er is een vermoeden dat mensen natuurlijke gastheren zijn van *C. concisus* in de mondholte. Er is dan een constante aanvoer naar het gastro-intestinale stelsel.

De mens zou een natuurlijke gastheer zijn voor *C. concisus* in de mondholte. Transmissie kan via speeksel, maar ook via besmet voedsel en drinken. Daarnaast kan *C. concisus* betrokken zijn bij bepaalde orale ziekten zoals parodontitis en gingivitis. Er is geen consensus of *C. concisus* nu echt een pathogeen is in de mondholte of niet. Er werden enkel patiënten onderzocht. Bij studies van gevallen van gastro-enteritis is aangetoond dat *C. concisus* bijna even vaak voorkomt als *C. jejuni* en *C. coli* en het hele jaar door gevonden kan worden. Wat toch wel zorgwekkend is, is dat *C. concisus* vaak teruggevonden wordt bij kinderen jonger dan een jaar en ouderen ouder dan 65 jaar. Dit zijn groepen waarvan de immuniteit niet optimaal functioneert. Of *C. concisus* ook echt een rol speelt is niet duidelijk. Bij deze onderzoeken waren er meestal geen controlegroepen en wanneer deze wel betrokken werden, waren de resultaten onbetrouwbaar. *Campylobacter concisus* wordt ook geregeld gevonden in maagsap zonder dat er ziekte is. Daarnaast worden er grotere hoeveelheden *C. concisus* en *C. rectus* gevonden bij Barret's disease en bij oesophageale reflux.

Proteus mirabilis kan ook betrokken zijn bij cholanchitis, leverabcessen, sepsis, gastro-enteritis (zowel spontaan als voedselgerelateerd), ziekenhuisinfecties en appendicitis. Er zou ook een link zijn met diarree, maar het is niet geweten of *P. mirabilis* daar een primaire rol speelt.

Gezien de ziektebeelden die de targetpathogenen kunnen veroorzaken, is verder onderzoek naar hun betrokkenheid noodzakelijk. Vele mechanismen zijn nog niet gekend en hoe besmetting gebeurt is meestal niet geweten. Aangezien *P. mirabilis* ook duidelijk een rol heeft

in problemen met het gastro-intestinale stelsel zou verder diepgaander onderzoek nuttig zijn. In tegenstelling tot zijn betrokkenheid bij urinaire infecties, is er nog maar weinig onderzoek naar zijn betrokkenheid bij gastro-intestinale problemen. Ook verder onderzoek naar het voorkomen van *C. concisus* bij deze gastro-intestinale problemen is nodig. Vooral omdat deze vaak lijkt voor te komen bij kwetsbare groepen zoals zeer jonge kinderen en ouderen. Voor beiden is het dan ook nuttig om transmissieroutes te bestuderen. Verder onderzoek naar het voorkomen op varkensvlees, zoals er in deze masterproef is gebeurd, kan een indicatie geven of dit een risico vormt op een besmetting en het ontwikkelen van eventuele ziekte.

10.4 Voorkomen bij varkens

Over het voorkomen van de targetpathogenen bij varkens is er zo goed als niets gekend. Er is nog geen onderzoek naar gebeurd. Onderzoek naar het voorkomen bij andere diersoorten is wel al uitgevoerd. Zo zijn er voor *C. concisus* al studies uitgevoerd naar het voorkomen bij onder andere de kat en de hond. *Escherichia albertii* is toevallig gevonden bij een varken tijdens een onderzoek naar het voorkomen van cytolethal distending toxin (cdt) producerende *E. coli* (Hinenoya et al., 2014b). Hier kunnen geen conclusies uit getrokken worden. Het zou wel mogelijk kunnen zijn dat *E. albertii* vaker voorkomt bij varkens aangezien deze vaak foutief worden geïdentificeerd als *E. coli*, maar verder onderzoek zal dit moeten uitwijzen. Indien dit het geval zou zijn, zou dit een potentieel zoönotisch risico inhouden aangezien humane en dierlijke isolaten erg op elkaar gelijken (Muchaamba et al., 2022b). Voor elk van de targetpathogenen zou verder onderzoek naar het voorkomen bij varkens nuttig zijn. Dit vooral voor *C. concisus* omdat deze al geïsoleerd werd uit stalen varkensvlees. Dit geldt ook voor *Proteus* spp.

11 Conclusie

Voor wat het aerobisch kiemgetal betreft en het aantal *E. coli* zijn er geen richtwaarden waarmee de resultaten vergeleken kunnen worden. Wel kan gesteld worden dat waarden boven de 10E6 te hoog zijn en niet aanvaard worden. De resultaten kunnen wel met elkaar vergeleken worden. Gehakt is meer gecontamineerd dan varkensfilets.

Voor deze masterproef zijn er maar een beperkt aantal stalen onderzocht. Dit kan deels verklaren waarom er bijvoorbeeld geen thermofiele campylobacters en *Salmonella* zijn gevonden.

Het aantal stalen dat bemonsterd werd en de bekomen resultaten zijn te weinig om een representatief beeld te geven van de prevalentie van de targetpathogenen op varkensvlees op consumentenniveau. Hiervoor dient verder onderzoek te gebeuren. Wel kan er geconcludeerd worden dat de targetpathogenen *P. mirabilis* en *C. concisus* wel degelijk aanwezig zijn. Daarnaast blijkt ook dat andere *Proteus* spp. zoals *P. hauseri* en *P. vulgaris* meer voorkomen dan gedacht. Hier dient zeker extra aandacht aan gegeven te worden. *Escherichia albertii* is niet geïsoleerd, maar *H. alvei* wel. Gezien *E. albertii* geregeld foutief geïdentificeerd wordt als *H. alvei*, zou het interessant zijn om dit verder te onderzoeken. Over het risico op de volksgezondheid van het vinden van deze pathogenen kan niet veel gezegd worden op basis van deze resultaten.

In het algemeen is er nog weinig gekend over het voorkomen van deze pathogenen op voedselwaren zoals varkensvlees. Er is hierover beperkt onderzoek beschikbaar. De beperkte literatuur toont wel aan dat deze pathogenen voorkomen op voedselwaren en dus ook op

varkensvlees op consumentenniveau en dat vooral voor *P. mirabilis* en *C. concisus*. Wat de exacte prevalentie van deze pathogenen bedraagt, is niet geweten. Hiervoor dient verder onderzoek te gebeuren. In het kader van *E. albertii* zou het nuttig zijn om cases waarbij *E. coli* de oorzaak is van een voedselbesmetting te heronderzoeken en specifiek op zoek te gaan naar *E. albertii* aangezien deze vaak foutief als *E. coli* wordt geïdentificeerd. Hetzelfde geldt voor *H. alvei*. De prevalentie van *E. albertii* zal waarschijnlijk veel hoger zijn dan dat onderzoek tot nog toe heeft aangetoond.

Of er een verband is tussen het eten van besmette voedselwaren en ziekte is niet geweten. Ook voor *E. albertii* is het niet duidelijk of die de symptomen na een voedselinfectie heeft veroorzaakt. *Proteus mirabilis* en *C. concisus* hebben een rol in bepaalde ziekten zoals bijvoorbeeld de ziekte van Crohn. Daarnaast is aangetoond dat *C. concisus* vaak voorkomt bij kinderen jonger dan 1 jaar en ouderen ouder dan 65 jaar. Dit is zorgwekkend gezien de kwetsbaarheid van deze individuen. Verder onderzoek naar deze pathogenen, hun voorkomen bij mensen en hun rol bij deze ziekten is noodzakelijk. Omdat er vermoed wordt dat de mens een natuurlijke gastheer zou zijn voor *C. concisus* in de mondholte, moet er onderzoek gebeuren naar hoe de mondholte gekoloniseerd kan worden en in hoeverre opname van besmet voedsel hierin belangrijk zou zijn.

Gezien de targetpathogenen gevonden worden op varkensvlees op consumentenniveau kan de vraag gesteld worden hoe deze contaminatie optreedt. Gebeurt dit vanuit de omgeving tijdens de verwerking van het vlees of is er contaminatie vanuit het maag-darmstelsel in het slachthuis? Over het voorkomen van de targetpathogenen bij varkens is geen literatuur te vinden. Onderzoek hiernaar lijkt nuttig te zijn gezien *C. concisus* al op varkensskarkassen is teruggevonden.

12 Referentielijst

- Aabenhus, R., Permin, H., Andersen, L.P., 2005. Characterization and subgrouping of *Campylobacter concisus* strains using protein profiles, conventional biochemical testing and antibiotic susceptibility, *European Journal of Gastroenterology & Hepatology*. Lippincott Williams & Wilkins.
- Abbott, S.L., O'Connor, J., Robin, T., Zimmer, B.L., Janda, J.M., 2003. Biochemical properties of a newly described *Escherichia* species, *Escherichia albertii*. *J Clin Microbiol* 41, 4852–4854. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.10.4852-4854.2003>
- Akutko, K., Matusiewicz, K., 2017. *Campylobacter concisus* as the etiologic agent of gastrointestinal diseases. *Advances in Clinical and Experimental Medicine*. <https://doi.org/10.17219/acem/61428>
- Bastyns, K., Chapelle, S., Vandamme, P., Goossens, H., De Wachter, R., 1995. Specific detection of *Campylobacter concisus* by PCR amplification of 23S rDNA areas, *Molecular and Cellular Probes*.
- Berends, B.R., Knapen, F. Van, Mossel, D.A.A., Burt, S.A., Snijders, J.M.A., 1998. *Salmonella* spp. on pork at cutting plants and at the retail level and the influence of particular risk factors, *International Journal of Food Microbiology*.
- Bhatt, S., Egan, M., Critelli, B., Kouse, A., Kalman, D., Upreti, C., 2019. The evasive enemy: Insights into the virulence and epidemiology of the emerging attaching and effacing pathogen *Escherichia albertii*. *Infect Immun*. <https://doi.org/10.1128/IAI.00254-18>
- Boughton, C., Leonard, F.C., Egan, J., Kelly, G., O'mahony, P., Markey, B.K., Griffin, A.M., 2004. Prevalence and Number of *Salmonella* in Irish Retail Pork Sausages †, *Journal of Food Protection*.

- Busani, L., Cigliano, A., Taioli, E., Caligiuri, V., Chiavacci, L., Di Bella, C., Battisti, A., Duranti, A., Gianfranceschi, M., Nardella, M.C., Ricci, A., Rolesu, S., Tamba, M., Marabelli, R., Caprioli, A.A., 2005. Prevalence of *Salmonella enterica* and *Listeria monocytogenes* Contamination in Foods of Animal Origin in Italy, *Journal of Food Protection*.
- Cornelius, A.J., Huq, M., On, S.L.W., French, N.P., Vandenberg, O., Miller, W.G., Lastovica, A.J., Istivan, T., Biggs, P.J., 2021. Genetic characterisation of *Campylobacter concisus*: Strategies for improved genomospecies discrimination. *Syst Appl Microbiol* 44. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2021.126187>
- Costa, D., Iraola, G., 2019a. Pathogenomics of emerging *Campylobacter* species. *Clin Microbiol Rev* 32. <https://doi.org/10.1128/CMR.00072-18>
- Costa, D., Iraola, G., 2019b. Pathogenomics of emerging *Campylobacter* species. *Clin Microbiol Rev* 32. <https://doi.org/10.1128/CMR.00072-18>
- Delhalle, L., Saegerman, C., Farnir, F., Korsak, N., Maes, D., Messens, W., De Sadeleer, L., De Zutter, L., Daube, G., 2009. *Salmonella* surveillance and control at post-harvest in the Belgian pork meat chain. *Food Microbiol* 26, 265–271. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2008.12.009>
- Engberg, J., Bang, D.D., Aabenhus, R., Aarestrup, F.M., Fussing, V., Gerner-Smidt, P., 2005. *Campylobacter concisus*: An evaluation of certain phenotypic and genotypic characteristics. *Clinical Microbiology and Infection* 11, 288–295. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2005.01111.x>
- Farmer Iii, J.J., Davis, B.R., Hickman-Brenner, F.W., Mcwhorter, A., Huntley-Carter, G.P., Asbury, M.A., Riddle, C., Wathen-Grady, H.G., Elias, C., Fanning, G.R., Steigerwalt, A.G., O'hara, C.M., Morris, G.K., Smith, P.B., Brenner, D.J., 1985. Biochemical Identification of New Species and Biogroups of Enterobacteriaceae Isolated from Clinical Specimenstt, *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY*.
- Ferreira, E.O., Lagacé-Wiens, P., Klein, J., 2022. *Campylobacter concisus* gastritis masquerading as *Helicobacter pylori* on gastric biopsy. *Helicobacter* 27. <https://doi.org/10.1111/hel.12864>
- Fitzgerald C. en Nachamkin I.,(2015). *Escherichia*, *Shigella* and *Salmonella*. In: Jorgensen J. H en Pfaller M. A., *Manual of clinical microbiology*, eleventh edn. ASM Press, Washington, DC, USA, pp 998.
- Ghafir, Y., China, B., Dierick, K., De Zutter, L., Daube, G., 2007. A seven-year survey of *Campylobacter* contamination in meat at different production stages in Belgium. *Int J Food Microbiol* 116, 111–120. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.12.012>
- Gomes, T.A.T., Ooka, T., Hernandez, R.T., Yamamoto, D., Hayashi, T., 2020. *Escherichia albertii* Pathogenesis . *EcoSal Plus* 9. <https://doi.org/10.1128/ecosalplus.esp-0015-2019>
- Hamilton, A.L., Kamm, M.A., Ng, S.C., Morrison, M., 2018a. *Proteus* spp. as Putative Gastrointestinal Pathogens. <https://doi.org/10.1128/CMR>
- Hamilton, A.L., Kamm, M.A., Ng, S.C., Morrison, M., 2018b. *Proteus* spp. as Putative Gastrointestinal Pathogens. <https://doi.org/10.1128/CMR>
- Hamilton, A.L., Kamm, M.A., Ng, S.C., Morrison, M., 2018c. *Proteus* spp. as Putative Gastrointestinal Pathogens. <https://doi.org/10.1128/CMR>
- Hansen, T.B., Christensen, B.B., Aabo, S., 2010. *Salmonella* in pork cuttings in supermarkets and butchers' shops in Denmark in 2002 and 2006. *Zoonoses Public Health* 57, 23–29. <https://doi.org/10.1111/j.1863-2378.2010.01360.x>
- Hansen, T.B., Nielsen, N.L., Christensen, B.B., Aabo, S., 2016. Enterococci as indicator of potential growth of *Salmonella* in fresh minced meat at retail. *Food Microbiol* 59, 92–96. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2016.05.010>

- Hatanaka, N., Awasthi, S.P., Hinenoya, A., Ueda, O., Yamasaki, S., 2020. Accurate identification of *Escherichia albertii* by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Microbiol Methods* 173. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2020.105916>
- Hess, D.L.J., Pettersson, A.M., Rijnsburger, M.C., Herbrink, P., van den Berg, H.P., Ang, C.W., 2012. Gastroenteritis caused by *Campylobacter concisus*. *J Med Microbiol* 61, 746–749. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.032466-0>
- Hinenoya, A., Ichimura, H., Yasuda, N., Harada, S., Yamada, K., Suzuki, M., Iijima, Y., Nagita, A., Albert, M.J., Hatanaka, N., Awasthi, S.P., Yamasaki, S., 2019. Development of a specific cytolethal distending toxin (cdt) gene (Eacdt)-based PCR assay for the detection of *Escherichia albertii*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 95, 119–124. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2019.04.018>
- Hinenoya, A., Shima, K., Asakura, M., Nishimura, K., Tsukamoto, T., Ooka, T., Hayashi, T., Ramamurthy, T., Faruque, S.M., Yamasaki, S., 2014a. Molecular characterization of cytolethal distending toxin gene-positive *Escherichia coli* from healthy cattle and swine in Nara, Japan.
- Hinenoya, A., Shima, K., Asakura, M., Nishimura, K., Tsukamoto, T., Ooka, T., Hayashi, T., Ramamurthy, T., Faruque, S.M., Yamasaki, S., 2014b. Molecular characterization of cytolethal distending toxin gene-positive *Escherichia coli* from healthy cattle and swine in Nara, Japan.
- Hou, T.Y., Chiang-Ni, C., Teng, S.H., 2019. Current status of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical microbiology. *J Food Drug Anal.* <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2019.01.001>
- Humphries, R.M., Linscott, A.J., 2015. Laboratory diagnosis of bacterial gastroenteritis. *Clin Microbiol Rev* 28, 3–31. <https://doi.org/10.1128/CMR.00073-14>
- Huys, G., Cnockaert, M., Janda, J.M., Swings, J., 2003. *Escherichia albertii* sp. nov., a diarrhoeagenic species isolated from stool specimens of Bangladeshi children. *Int J Syst Evol Microbiol* 53, 807–810. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.02475-0>
- Hyma, K.E., Lacher, D.W., Nelson, A.M., Bumbaugh, A.C., Janda, J.M., Strockbine, N.A., Young, V.B., Whittam, T.S., 2005. Evolutionary genetics of a new pathogenic *Escherichia* species: *Escherichia albertii* and related *Shigella boydii* strains. *J Bacteriol* 187, 619–628. <https://doi.org/10.1128/JB.187.2.619-628.2005>
- Ikeda, T., Shinagawa, T., Ito, T., Ohno, Y., Kubo, A., Nishi, J., Gotoh, Y., Ogura, Y., Ooka, T., Hayashi, T., 2020. Hypoosmotic stress induces flagellar biosynthesis and swimming motility in *Escherichia albertii*. *Commun Biol* 3. <https://doi.org/10.1038/s42003-020-0816-5>
- Jordan, E., Egan, J., Dullea, C., Ward, J., McGillicuddy, K., Murray, G., Murphy, A., Bradshaw, B., Leonard, N., Rafter, P., McDowell, S., 2006. Salmonella surveillance in raw and cooked meat and meat products in the Republic of Ireland from 2002 to 2004. *Int J Food Microbiol* 112, 66–70. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.05.013>
- Kaakoush, N.O., Deshpande, N.P., Wilkins, M.R., Tan, C.G., Burgos-Portugal, J.A., Raftery, M.J., Day, A.S., Lemberg, D.A., Mitchell, H., 2011. The pathogenic potential of *campylobacter concisus* strains associated with chronic intestinal diseases. *PLoS One* 6. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029045>
- Kaakoush, N.O., Mitchell, H.M., 2012. *Campylobacter concisus* - A new player in intestinal disease. *Front Cell Infect Microbiol.* <https://doi.org/10.3389/fcimb.2012.00004>
- Kaakoush, N.O., Mitchell, H.M., Man, S.M., 2014. Role of emerging *campylobacter* species in inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis.* <https://doi.org/10.1097/MIB.0000000000000074>
- Keisam, S., Tuikhar, N., Ahmed, G., Jeyaram, K., 2019. Toxigenic and pathogenic potential of enteric bacterial pathogens prevalent in the traditional fermented foods marketed in the Northeast region of India. *Int J Food Microbiol* 296, 21–30. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.02.012>

- Konno, T., Yatsuyanagi, J., Takahashi, S., Kumagai, Y., Wada, E., Chiba, M., Saito, S., 2012. Isolation and Identification of *Escherichia albertii* from a Patient in an Outbreak of Gastroenteritis, *Jpn. J. Infect. Dis.*
- Lei, C.W., Zhang, A.Y., Liu, B.H., Wang, H.N., Yang, L.Q., Guan, Z. bin, Xu, C.W., Zhang, D.D., Yang, Y.Q., 2015. Two novel *Salmonella* genomic island 1 variants in *Proteus mirabilis* isolates from swine farms in China. *Antimicrob Agents Chemother* 59, 4336–4338. <https://doi.org/10.1128/AAC.00120-15>
- Lindsey, R.L., Garcia-Toledo, L., Fasulo, D., Gladney, L.M., Strockbine, N., 2017. Multiplex polymerase chain reaction for identification of *Escherichia coli*, *Escherichia albertii* and *Escherichia fergusonii*. *J Microbiol Methods* 140, 1–4. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2017.06.005>
- Liu, F., Ma, R., Wang, Y., Zhang, L., 2018. The clinical importance of campylobacter concisus and other human hosted *Campylobacter* species. *Front Cell Infect Microbiol.* <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00243>
- Lynch, Ó.A., Cagney, C., McDowell, D.A., Duffy, G., 2011. Occurrence of fastidious *Campylobacter* spp. in fresh meat and poultry using an adapted cultural protocol. *Int J Food Microbiol* 150, 171–177. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.07.037>
- Maheux, A.F., Brodeur, S., Bérubé, È., Boudreau, D.K., Abed, J.Y., Boissinot, M., Bissonnette, L., Bergeron, M.G., 2018. Method for isolation of both lactose-fermenting and – non-fermenting *Escherichia albertii* strains from stool samples. *J Microbiol Methods* 154, 134–140. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2018.09.008>
- Miljković-Selimović, B., Babić, T., Kocić, B., Aleksić, E., Malešević, A., Tambur, Z., 2021. *Campylobacter concisus*. *J Infect Dev Ctries.* <https://doi.org/10.3855/jidc.14530>
- Miller, W.G., Chapman, M.H., Yee, E., On, S.L.W., McNulty, D.K., Lastovica, A.J., Carroll, A.M., McNamara, E.B., Duffy, G., Mandrell, R.E., 2012. Multilocus sequence typing methods for the emerging *Campylobacter* Species *C. hyointestinalis*, *C. lanienae*, *C. sputorum*, *C. concisus*, and *C. curvus*. *Front Cell Infect Microbiol* 2, 45. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2012.00045>
- Mobley, H.L.T., 2021. *Proteus mirabilis* overview, In: Pearson, M.M., *Proteus mirabilis* methods and protocols, Humanapress, New York, New York, USA, pp. 1-4.
- Mohr O'hara, C., Brenner, F.W., Miller, J.M., 2000. Classification, Identification, and Clinical Significance of *Proteus*, *Providencia*, and *Morganella*.
- Muchaamba, F., Barmettler, K., Treier, A., Houf, K., Stephan, R., 2022a. Microbiology and Epidemiology of *Escherichia albertii*—An Emerging Elusive Foodborne Pathogen. *Microorganisms.* <https://doi.org/10.3390/microorganisms10050875>
- Muchaamba, F., Barmettler, K., Treier, A., Houf, K., Stephan, R., 2022b. Microbiology and Epidemiology of *Escherichia albertii*—An Emerging Elusive Foodborne Pathogen. *Microorganisms.* <https://doi.org/10.3390/microorganisms10050875>
- Murakami, K., Kimura, S., Nagafuchi, O., Sekizuka, T., Onozuka, D., Mizukoshi, F., Tsukagoshi, H., Ishioka, T., Asai, T., Hirai, S., Musashi, M., Suzuki, M., Ohnishi, M., Oishi, K., Saruki, N., Kimura, H., Iyoda, S., Kuroda, M., Fujimoto, S., 2020. Flagellum expression and swimming activity by the zoonotic pathogen *Escherichia albertii*. *Environ Microbiol Rep* 12, 92–96. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12818>
- Newell, D.G., 2005. *Campylobacter concisus*: an emerging pathogen?, *European Journal of Gastroenterology & Hepatology.*
- Nielsen, H.L., Ejlersen, T., Engberg, J., Nielsen, H., 2013. High incidence of *Campylobacter concisus* in gastroenteritis in North Jutland, Denmark: A population-based study. *Clinical Microbiology and Infection* 19, 445–450. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2012.03852.x>
- Nimri, L.F., 2013. *Escherichia albertii*, a newly emerging enteric pathogen with poorly defined properties. *Diagn Microbiol Infect Dis* 77, 91–95. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2013.06.028>

- Ooka, T., Seto, K., Kawano, K., Kobayashi, H., Etoh, Y., Ichihara, S., Kaneko, A., Isobe, J., Yamaguchi, K., Horikawa, K., Gomes, T.A., Linden, A., Bardiau, M., Mainil, J.G., Beutin, L., Ogura, Y., Hayashi, T., 2012. Clinical significance of *Escherichia albertii*. *Emerg Infect Dis* 18, 488–492. <https://doi.org/10.3201/eid1803.111401>
- Ooka, T., Tokuoka, E., Furukawa, M., Nagamura, T., Ogura, Y., Arisawa, K., Harada, S., Hayashi, T., 2013. Human gastroenteritis outbreak associated with *Escherichia albertii*, Japan. *Emerg Infect Dis* 19, 144–146. <https://doi.org/10.3201/eid1901.120646>
- Oporto, B., Hurtado, A., 2011. Emerging thermotolerant campylobacter species in healthy ruminants and swine. *Foodborne Pathog Dis* 8, 807–813. <https://doi.org/10.1089/fpd.2010.0803>
- Pearson, M.M., 2021. Culture methods for *Proteus mirabilis*, In *Proteus mirabilis* methods and protocols, Humanapress, New York, New York, USA, pp.5-13.
- Pezzotti, G., Serafin, A., Luzzi, I., Mioni, R., Milan, M., Perin, R., n.d. Occurrence and resistance to antibiotics of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in animals and meat in northeastern Italy.
- Prendergast, D.M., Duggan, S.J., Gonzales-Barron, U., Fanning, S., Butler, F., Cormican, M., Duffy, G., 2009. Prevalence, numbers and characteristics of *Salmonella* spp. on Irish retail pork. *Int J Food Microbiol* 131, 233–239. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.03.003>
- Sanches, M.S., Rodrigues da Silva, C., Silva, L.C., Montini, V.H., Lopes Barboza, M.G., Migliorini Guidone, G.H., Dias de Oliva, B.H., Nishio, E.K., Faccin Galhardi, L.C., Vespero, E.C., Lelles Nogueira, M.C., Dejato Rocha, S.P., 2021a. *Proteus mirabilis* from community-acquired urinary tract infections (UTI-CA) shares genetic similarity and virulence factors with isolates from chicken, beef and pork meat. *Microb Pathog* 158. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2021.105098>
- Sanches, M.S., Rodrigues da Silva, C., Silva, L.C., Montini, V.H., Lopes Barboza, M.G., Migliorini Guidone, G.H., Dias de Oliva, B.H., Nishio, E.K., Faccin Galhardi, L.C., Vespero, E.C., Lelles Nogueira, M.C., Dejato Rocha, S.P., 2021b. *Proteus mirabilis* from community-acquired urinary tract infections (UTI-CA) shares genetic similarity and virulence factors with isolates from chicken, beef and pork meat. *Microb Pathog* 158. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2021.105098>
- Scanlon, K.A., Cagney, C., Walsh, D., McNulty, D., Carroll, A., McNamara, E.B., McDowell, D.A., Duffy, G., 2013. Occurrence and characteristics of fastidious *Campylobacteraceae* species in porcine samples. *Int J Food Microbiol* 163, 6–13. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.02.004>
- Singhal, N., Kumar, M., Kanaujia, P.K., Viridi, J.S., 2015. MALDI-TOF mass spectrometry: An emerging technology for microbial identification and diagnosis. *Front Microbiol*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00791>
- Strockbine N. A., Bopp C. A., Fields P. I., Kaper J. B., en Narato J. P., (2015). *Escherichia*, *Shigella* and *Salmonella*. In: Jorgensen J. H en Pfaller M. A., *Manual of clinical microbiology*, eleventh edn. ASM Press, Washington, DC, USA, pp 685-686.
- The European Union One Health 2021 Zoonoses Report, 2022. . *EFSA Journal* 20. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2022.7666>
- Underwood, A.P., Kaakoush, N.O., Sodhi, N., Merif, J., Lee, W.S., Riordan, S.M., Rawlinson, W.D., Mitchell, H.M., 2016. *Campylobacter concisus* pathotypes are present at significant levels in patients with gastroenteritis. *J Med Microbiol* 65, 219–226. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000216>
- Uzeh, R.E., Adewumi, F., Odumosu, B.T., 2021. Antibiotic resistance and plasmid analysis of *Enterobacteriaceae* isolated from retail meat in Lagos Nigeria. *One Health Outlook* 3. <https://doi.org/10.1186/s42522-021-00042-x>
- Wang, H., Li, Q., Bai, X., Xu, Y., Zhao, A., Sun, H., Deng, J., Xiao, B., Liu, X., Sun, S., Zhou, Y., Wang, B., Fan, Z., Chen, X., Zhang, Z., Xu, J., Xiong, Y., 2016. Prevalence of *eae*-positive, lactose non-fermenting *Escherichia albertii* from retail raw meat in China. *Epidemiol Infect* 144, 45–52. <https://doi.org/10.1017/S0950268815001120>

- Wang, Y., Zhang, S., Yu, J., Zhang, H., Yuan, Z., Sun, Y., Zhang, L., Zhu, Y., Song, H., 2010. An outbreak of *Proteus mirabilis* food poisoning associated with eating stewed pork balls in brown sauce, Beijing. *Food Control* 21, 302–305. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2009.06.009>
- Whyte, P., McGill, K., Cowley, D., Madden, R.H., Moran, L., Scates, P., Carroll, C., O'Leary, A., Fanning, S., Collins, J.D., McNamara, E., Moore, J.E., Cormican, M., 2004. Occurrence of *Campylobacter* in retail foods in Ireland. *Int J Food Microbiol* 95, 111–118. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2003.10.018>
- Wieczorek, K., Szewczyk, R., Osek, J., n.d. Prevalence, antimicrobial resistance, and molecular characterization of *Campylobacter jejuni* and *C. coli* isolated from retail raw meat in Poland, *Veterinarni Medicina*.
- Yu, Z., Assessment of the bacterial contamination on broiler carcasses at retail. Doctoraatsthesis, departement veterinaire volksgezondheid en voedselveiligheid, Faculteit Diergeneeskunde, Universiteit Gent, België.
- Yu, Z., Joossens, M., Van den Abeele, A.M., Kerkhof, P.J., Houf, K., 2021. Isolation, characterization and antibiotic resistance of *Proteus mirabilis* from Belgian broiler carcasses at retail and human stool. *Food Microbiol* 96. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2020.103724>
- Zanetti, F., Varol, O., Stampi, S., De Luca, G., 1996. Prevalence of thermophilic *Campylobacter* and *Arcobacter butzleri* in food of animal origin, *International Journal of Food Microbiology*.
- Zhang, J., Hoedt, E.C., Liu, Q., Berendsen, E., Teh, J.J., Hamilton, A., O' Brien, A.W., Ching, J.Y.L., Wei, H., Yang, K., Xu, Z., Wong, S.H., Mak, J.W.Y., Sung, J.J.Y., Morrison, M., Yu, J., Kamm, M.A., Ng, S.C., 2021. Elucidation of *Proteus mirabilis* as a Key Bacterium in Crohn's Disease Inflammation. *Gastroenterology* 160, 317-330.e11. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2020.09.036>
- Zhang, L., Lee, H., Grimm, M.C., Riordan, S.M., Day, A.S., Lemberg, D.A., 2014. *Campylobacter concisus* and inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 20, 1259–1267. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i5.1259>