

## **Genetic variability of Escherichia coli strains producing Shiga toxin**

**Liesbet DE BAETS**

### **Nederlandse samenvatting:**

Shiga toxine-producerende *E. coli* (STEC) werden voor het eerst herkend als humane pathogenen in 1982. Een op dat ogenblik zeldzaam *E. coli* serotype, O157:H7, was geassocieerd met twee uitbraken van hemorragische colitis (HC) in de Verenigde Staten. Op heden zijn er meer dan 100 STEC serotypes geassocieerd met ziekte bij de mens en deze subgroep van STEC worden enterohemorragische *E. coli* (EHEC) genoemd. Klinische symptomen omvatten initieel abdominale pijn en diarree, maar uiteindelijk kan hemolytisch uremisch syndroom (HUS) en dood optreden. In de Verenigde Staten en het Verenigd Koninkrijk werden runderen onomstotelijk herkend als bron van EHEC infecties waarbij meestal gezonde dieren drager zijn van de kiem. In België daarentegen is er minder geweten over het voorkomen van STEC bij runderen en andere landbouwdieren. Een eerste doelstelling van dit proefschrift was daarom de genetische typering van STEC en EHEC stammen om aldus de menselijke isolaten te vergelijken met verwante, bij dieren aangetroffen kiemen en het reservoir voor menselijke infecties te onderzoeken.

De Shiga toxines (Stx) zijn de belangrijkste virulentiefactor van STEC en worden onderverdeeld in twee immunologisch verschillende groepen, Stx1 en Stx2. De toxines bestaan uit één enzymatische A subeenheid en 5 receptor-bindende B subeenheden. Stx1 is geconserveerd, maar van Stx2 zijn verschillende varianten beschreven. Een tweede doelstelling van dit proefschrift was daarom een beter inzicht te verwerven in het pathogeen potentieel van de natuurlijk voorkomende Stx2 varianten.

Voor de genetische typering van STEC en EHEC stammen hebben we een PCR-RFLP typeringssysteem voor stx2 genen van STEC stammen ontwikkeld. Het systeem overstijgt beschreven typeringssystemen in discriminerend vermogen en houdt een rationele nomenclatuur voor Stx2 varianten in (PHIA). Bovendien laat het de identificatie van nieuwe stx2 varianten toe en van STEC/EHEC isolaten die meer dan één stx2 gen dragen. Typering van de stx2 genen van een willekeurige selectie van 36 boviene en 27 humane isolaten, behorend tot serogroepen die frequent geïsoleerd worden bij de mens, leverde een groter aantal PHIA patronen op voor de boviene isolaten in vergelijking met humane isolaten. We stelden daarom de hypothese voorop dat de Stx2 varianten die voorkomen in menselijke isolaten slechts een subgroep zijn van deze die gevonden worden in boviene isolaten. In een tweede fase werd de typering uitgebreid naar andere serotypes en dierlijke isolaten van andere oorsprong: schapen, wilde dieren... We concludeerden dat drie varianten vooral voorkomen in *E. coli* isolaten geassocieerd met ernstige ziekte. Het reservoir voor STEC die deze varianten dragen is het rund. Eén variant werd vaak aangetroffen in *E. coli* isolaten van asymptomatische patiënten. Het reservoir is hier vooral schapen en wilde dieren. De overige Stx2 varianten werden niet frequent aangetroffen in de Belgische STEC/EHEC collectie in onze studie.

In de studie naar het pathogeen potentieel van de Stx2 varianten werden 14 natuurlijke varianten, waaronder vijf die als nieuw geïdentificeerd werden, geëvalueerd voor hun cytotoxiciteit voor Verocellen. Tien Stx2 varianten vertoonden gelijke CD50 titers. We vonden geen hogere cytotoxiciteit voor de varianten Stx2EDL933, Stx2c en Stx2OX3b, die vaker geassocieerd zijn met ernstige ziekte, noch een lagere cytotoxiciteit voor vier nieuwe varianten die zelden geassocieerd zijn met HC en HUS. Drie varianten waren minder toxisch en één variant was meer toxisch dan Stx2EDL933. Analyse van de aminozuurvariaties en de kristalstructuur van Stx2EDL933 toonde twee 'hot spots' van variatie in de A subeenheid. Deze zijn gelegen enerzijds ter hoogte van posities belangrijk voor de structuur aan de furine(klievingsplaats en anderzijds in het C(terminaal peptide waar de A subeenheid uitsteekt uit de centrale porie gevormd door de B pentameer.

De epidemiologie en de pathogenese van EHEC infecties is duidelijk nog niet volledig opgehelderd. De incidentie van ziekte kan immers niet alleen verklaard worden door eigenschappen van de pathogeen alleen, maar een complexe interactie tussen gastheer, pathogeen en omgevingsfactoren speelt een belangrijke rol.