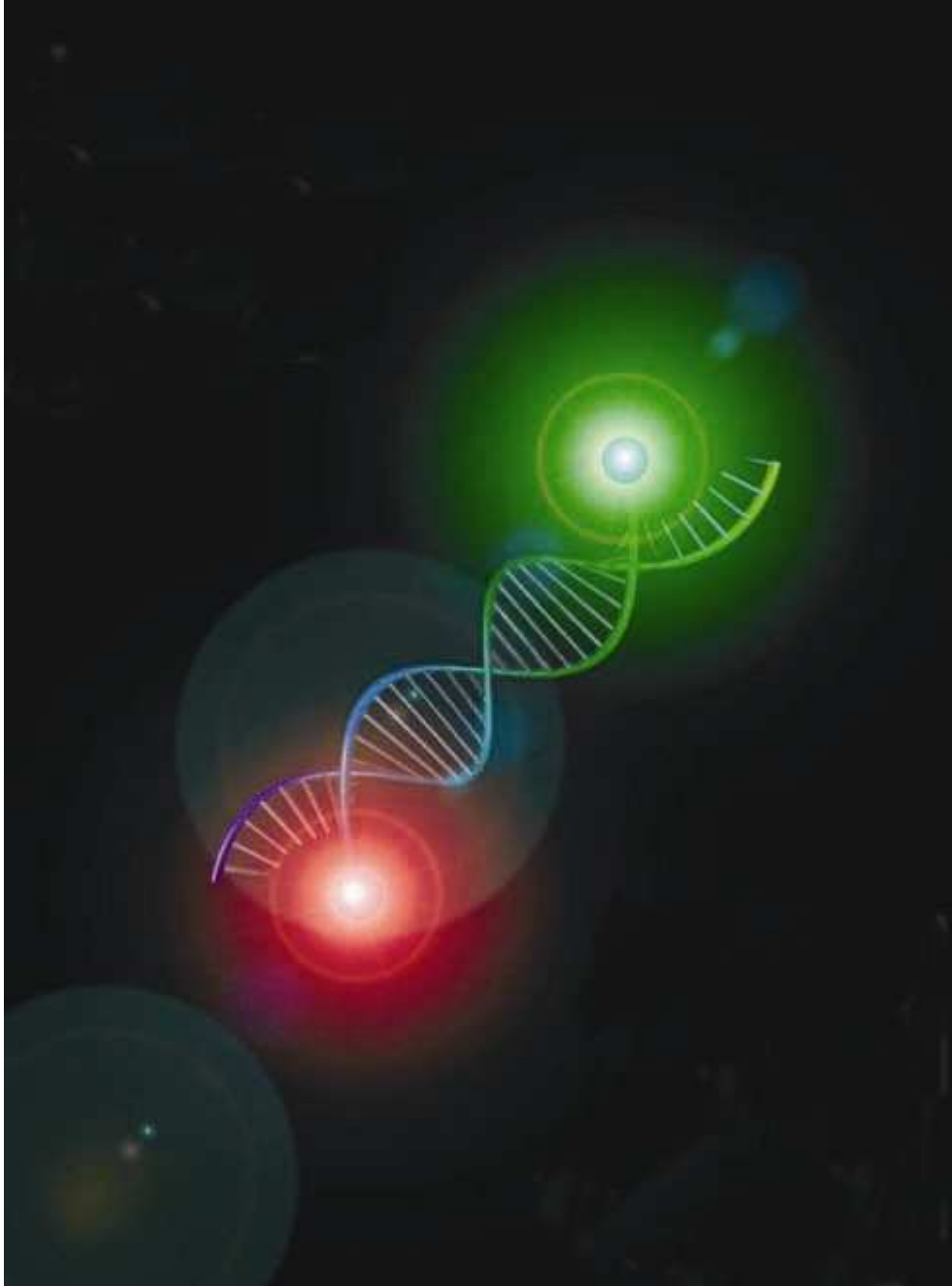


Real-time PCR for *Clostridium difficile* and Shiga toxin-producing *Escherichia coli*



Marianne de Kruijf - van Bommel
Sint Antonius Ziekenhuis
December 2012

Real-time PCR voor *Clostridium difficile* en Shigatoxineproducerende *Escherichia coli*

Naam:	Marianne de Kruijf - van Bommel
Studentennummer:	1609595
Opleiding:	Life Sciences
Afstudeerrichting:	Medische Microbiologie
Onderwijsinstelling:	Hogeschool Utrecht, Faculteit Natuur en Techniek
Afstudeerinstelling:	Sint Antonius Ziekenhuis te Nieuwegein
Afdeling:	Medische Microbiologie en Immunologie
Stagebegeleider:	Erik van Hannen
Afstudeerbegeleider:	Marie-Monique Immink
Periode:	September 2012 - januari 2013

Afbeelding voorkant: een fluorescerende probe, met aan het ene uiteinde een reporter en aan het andere uiteinde een quencher, bindt aan enkelstrengs DNA.

Bron:

<http://conway.ucd.ie/CoreTech/perspective/xsitebuild.php?xsiteconfig=zsiteconfigConwayCTS&BuildCategoryGrid=yes&CategoryContext=CoreTechTechnologies&xrowreplace=yes>

Voorwoord

Dit verslag is onderdeel van mijn afstudeerstage voor de opleiding Life Sciences, richting Medische Microbiologie. Deze stage heb ik gedaan bij de afdeling Medische Microbiologie en Immunologie in het Sint Antonius Ziekenhuis te Nieuwegein. Dit verslag beschrijft het opzetten en valideren van een PCR voor *Clostridium difficile* en het valideren van een PCR voor Shigatoxineproducerende *Escherichia coli*.

In de eerste plaats wil ik Erik bedanken voor het begeleiden van mijn onderzoek en de verslaglegging daarvan. Verder gaat mijn dank uit naar mijn collega's van de moleculaire biologie voor de behulpzaamheid bij mijn praktische werkzaamheden. Ook ben ik Ger en Heleen dankbaar dat ik gebruik kon maken van hun kantoor.

Samenvatting

Clostridium difficile is de belangrijkste veroorzaker van antibiotica-geassocieerde diarree in ziekenhuizen. De virulentiefactoren van *C. difficile* zijn toxine A (tcdA) en toxine B (tcdB). Shigatoxineproducerende *Escherichia coli* (STEC) veroorzaakt uitbraken van voedselvergiftiging en kan leiden tot het ernstige hemolytisch uremisch syndroom. De virulentiefactoren van STEC zijn Shigatoxine 1 (Stx1), Shigatoxine 2 (Stx2) en het membraanewit intimine, gecodeerd door *eae*. Om de diagnostiek van deze twee toxineproducerende darmpathogenen te verbeteren, is voor beide een real-time polymerase chain reaction (PCR) ontwikkeld. In dit verslag is het opzetten van de *Clostridium*-PCR beschreven en de validatie van zowel de *Clostridium*- als de STEC-PCR.

Het target voor de *Clostridium*-PCR was *tcdA* en als gouden standaard werd de ImmunoCard Toxins A&B test gebruikt. De targets voor de STEC-PCR waren *Stx1*, *Stx2* en *eae*, en als gouden standaard werd CHROMagar *E. coli* O157 of PCR elders gebruikt. Voor DNA-isolatie werd gebruik gemaakt van de MagNA Pure LC en de MagNA Pure Compact. Voor PCR werd het ABI StepOne Real-Time PCR System gebruikt. Cyanobacterie diende als interne controle. Beide PCR's zijn voldoende efficiënt bevonden. Rekening houdend met de hierboven genoemde gouden standaards, zijn de selectiviteit en specificiteit van de *Clostridium*-PCR respectievelijk 82% en 96%, en van de STEC-PCR 64% en 100%.

Summary

Clostridium difficile is the most important cause of nosocomial antibiotic-associated diarrhea. Toxin A (tcdA) and toxin B (tcdB) are the virulence factors of *C. difficile*. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) causes food poison outbreaks and may lead to the severe hemolytic uremic syndrome. Shiga toxin 1 (Stx1), Shiga toxin 2 (Stx2) and the membrane protein intimin, which is coded by *eae*, are the virulence factors of STEC. To improve diagnostics of these two toxin-producing pathogens of the intestine, for both a real-time polymerase chain reaction (PCR) was developed. In this report, the design of the *Clostridium* PCR is described, as well as the validation of both *Clostridium* and STEC PCR.

TcdA was the target for *Clostridium* PCR and the ImmunoCard Toxins A&B test was used as the gold standard. *Stx1*, *Stx2* and *eae* were the targets for STEC-PCR and CHROMagar *E. coli* O157 was used as the gold standard. The MagNA Pure LC and the MagNA Pure Compact were used for DNA isolation. The ABI StepOne Real-Time PCR System was used for PCR. Cyanobacterium served as the internal control.

Both PCRs are found to be sufficient. Taking into account above gold standards, selectivity and specificity were 82% and 96% respectively for *Clostridium* PCR, and 64% and 100% for STEC PCR.

Inhoudsopgave

Voorwoord	3
Samenvatting.....	4
Summary	5
Afkortingenlijst	8
1. Inleiding	9
1.1 Darmflora en darmpathogenen	9
1.2 <i>Clostridium difficile</i>	9
1.2.1 Symptomen	10
1.2.2 Pathogenese	10
1.2.3 Diagnostiek	10
1.3 Shigatoxineproducerende <i>Escherichia coli</i>	11
1.3.1 Symptomen	11
1.3.2 Uitbraken	12
1.3.3 Pathogenese	12
1.3.4 Diagnostiek	12
1.4 Real-time PCR	13
1.5 Doel van het onderzoek	14
2. Materiaal en methoden	15
2.1 Bacteriestammen en klinische monsters	15
2.1.1 Kweek	15
2.1.2 Gekwantificeerde stock <i>C. difficile</i>	15
2.1.3 Gekwantificeerde verdunningsreeks <i>C. difficile</i> in Sigmawater	16
2.1.4 Gekwantificeerde verdunningsreeks <i>C. difficile</i> in feces	16
2.1.5 Gekwantificeerde stock STEC	16
2.1.6 Gekwantificeerde verdunningsreeks STEC in Sigmawater	16
2.1.7 Gekwantificeerde verdunningsreeks STEC in feces	16
2.2 Moleculaire ruimten	16
2.2.1 Ruimte 1	16
2.2.2 Ruimte 2	17
2.2.3 Ruimte 3	17
2.3 PCR-reagentia	17
2.3.1 Voormix	17
2.3.2 Mastermix	17
2.4 Primers en probes	17
2.5 Interne controle	18
2.6 DNA-isolatie	19
2.7 Real-time PCR	19
2.8 PCR-validatie	20
2.8.1 Analytische validatie	20
2.8.2 Klinische validatie	20
3. Resultaten	21
3.1 <i>C. difficile</i>	21
3.1.1 Optimaliseren primerconcentraties	21
3.1.2 Optimaliseren probeconcentratie	22
3.1.3 Invriesstap	22

3.1.4 Analytische validatie: juistheid.....	23
3.1.5 Analytische validatie: intratestvariatie	23
3.1.6 Analytische validatie: intertestvariatie	23
3.1.7 Analytische validatie: specificiteit	24
3.1.8 Analytische validatie: technische detectiegrens	25
3.1.9 Analytische validatie: klinische detectiegrens	25
3.1.10 Klinische validatie: sensitiviteit	25
3.1.11 Klinische validatie: specificiteit	25
3.2 STEC	26
3.2.1 Analytische validatie: juistheid.....	26
3.2.2 Analytische validatie: intratestvariatie	26
3.2.3 Analytische validatie: intertestvariatie	27
3.2.4 Analytische validatie: specificiteit	28
3.2.5 Analytische validatie: technische detectiegrens	29
3.2.6 Analytische validatie: klinische detectiegrens	29
3.2.7 Klinische validatie: sensitiviteit	30
3.2.8 Klinische validatie: specificiteit	30
3.2.9 Detectie in ongekoelde feces	30
3.3 Interne controle	31
4. Discussie en conclusie	32
4.1 <i>C. difficile</i>	32
4.1.1 Gouden standaard.....	32
4.1.2 <i>TcdA</i> en/of <i>tcdB</i> als target.....	32
4.1.3 Asymptotisch dragerschap.....	32
4.1.4 Toepassing.....	33
4.2 STEC	33
4.2.1 Gouden standaard.....	33
4.2.2 Juistheid diepvriesstammen.....	33
4.2.3 Variatiecoëfficiënt intertestvariatie	33
4.2.4 Technische en klinische detectiegrens.....	34
4.2.5 Klinische monsters Lvl	34
4.2.6 Toepassing.....	34
4.3 Interne controle	35
4.4 Conclusie	35
Bronnen	36
Bijlage 1: monsternummers	39

Afkortingenlijst

ABI	Applied Biosystems
AZN	Antonius Ziekenhuis Nieuwegein
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BSA	bovine serum albumine
CDI	<i>Clostridium difficile</i> infectie
<i>C. difficile</i>	<i>Clostridium difficile</i>
CFU	colony forming unit
COS-agar	Columbia-agar
Ct-waarde	cycle threshold-waarde
Diak	Diakonessenhuis
DNA	deoxyribonucleic acid
dNTP	deoxynucleoside triphosphate
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EIA	enzyme immuno assay
EMBL	European Molecular Biology Laboratory
HUS	hemolytisch uremisch syndroom
IC	interne controle
Lvi	Laboratorium voor Infectieziekten
MMI	Medische Microbiologie en Immunologie
nM	nanomolair
PCR	polymerase chain reaction
PMC	pseudomembraneuze colitis
ppm	parts per million
RNA	ribonucleic acid
rpm	revolutions per minute
STAR	stool transfer and recovery
STEC	Shigatoxineproducerende <i>Escherichia coli</i>
Stx	Shigatoxine
tcdA	toxine A
tcdB	toxine B
UMCG	Universitair Medisch Centrum Groningen

1. Inleiding

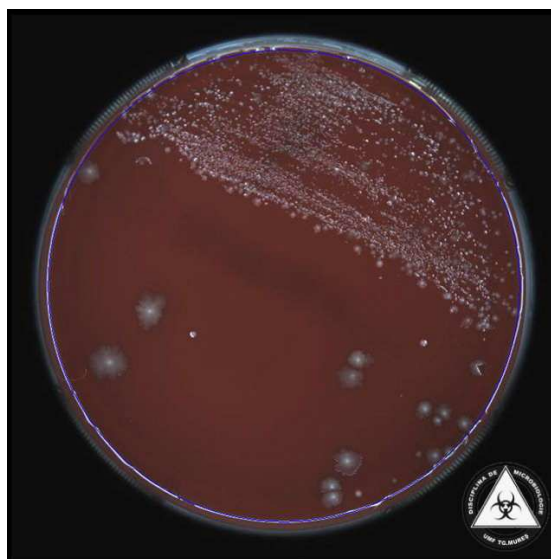
1.1 Darmflora en darmpathogenen

De darmflora, voornamelijk bestaand uit bacteriën, maakt een belangrijk deel uit van het menselijke darmkanaal. In het colon beslaan bacteriën ongeveer de helft van het gewicht van de darminhoud. De darmflora bestaat uit 500 tot 1000 verschillende bacteriesoorten; hiervan is 99% of meer strikt anaeroob (Sears, 2005). Darmbacteriën breken stoffen af die voor het lichaam onafbreekbaar zijn en leveren zo voedingsstoffen aan het lichaam. Ook vormt de darmflora een barrière tegen pathogene bacteriën, zodat deze niet kunnen koloniseren in de darm (Guarner *et al.*, 2003). Steeds meer gunstige invloeden van darmbacteriën worden beschreven, waardoor we eerder kunnen spreken van mutualisme dan van gewoon commensalisme.

Door fysiek toedoen, bijvoorbeeld een chirurgische ingreep, kan de barrière van de darmflora (tijdelijk) verdwijnen. Ook antibiotische behandelingen hebben invloed op de darmflora; het evenwicht tussen verschillende bacteriën kan drastisch verschuiven. Hierdoor hebben niet alleen exogene pathogenen meer kans om zich te koloniseren, maar ook opportunistische bacteriën die behoren tot de flora kunnen buitensporig gaan groeien.

1.2 *Clostridium difficile*

Clostridium is een Grampositieve, sporevormende staaf. Clostridia zijn over het algemeen obligaat anaeroob, maar enkele stammen zijn aerotolerant. Sommige subsoorten behoren tot de darmflora, andere komen verspreid in de natuur voor. *C. difficile*, die deel uitmaakt van de darmflora, is normaal gesproken ongevaarlijk. Als het evenwicht van de darmflora echter wordt verstoord, kan deze bacterie schadelijk worden voor zijn gastheer. De voornaamste oorzaak is antibioticagebruik en daardoor is *C. difficile* één van de belangrijkste veroorzakers van ziekenhuisinfecties (Versalovic *et al.*, 2011). De sporen die de bacterie vormt kunnen maanden overleven buiten het lichaam, wat overleving en verspreiding eenvoudig maakt.



Figuur 1.1 *C. difficile* op cycloserine-cefoxitine-fructose-agar.

1.2.1 Symptomen

C. difficile is verantwoordelijk voor 25% van de gevallen van antibiotica-geassocieerde diarree in ziekenhuizen en is de voornaamste veroorzaker van antibiotica-geassocieerde darmontsteking (colitis) (Versalovic *et al.*, 2011). De symptomen van *C. difficile* infectie (CDI) verschillen van milde diarree of diarree met bloed en slijm (*C. difficile*-geassocieerde diarree) tot ontwikkeling van pseudomembraneuze colitis (PMC). CDI kan leiden tot PMC, waarbij een exsudaat van ontstekingscellen, fibrine, en bacteriële en cellulaire componenten vanuit het darmslijmvlies pseudomembranen vormt (website Emedicine).

Verschillende risicofactoren spelen een rol, zoals leeftijd, ziekenhuisopname, darmchirurgie, gebruik van antibiotica en protonpompremmers, en kolonisatie met een toxineproducerende *C. difficile*-stam (Versalovic *et al.*, 2011). Alle antibiotica kunnen het risico op CDI verhogen. Dit geldt ook voor metronidazol en vancomycine, de antibiotica die juist gebruikt worden voor behandeling van CDI (website Emedicine).

1.2.2 Pathogenese

De virulentiefactoren van *C. difficile* zijn de productie van toxine A (tcdA) en toxine B (tcdB). TcdA is een enterotoxine die zorgt voor vochtophoping in de darm. TcdB heeft een cytopathogeen effect. Volgens een onderzoek van Lyerly *et al.* (1985) is alleen tcdA verantwoordelijk voor de symptomen van CDI, en heeft tcdB alleen effect na toevoeging van toxine A of als het darmslijmvlies al is beschadigd. Een recenter onderzoek van Kuehne *et al.* (2011) laat echter zien dat zowel tcdA als tcdB afzonderlijk schade kunnen aanrichten.

1.2.3 Diagnostiek

Voor de diagnostiek van toxineproducerende *C. difficile* wordt in het Sint Antonius Ziekenhuis (AZN) gebruik gemaakt van de ImmunoCard Toxins A&B test (Meridian Bioscience, Cincinnati, Ohio, Verenigde Staten) (figuur 1.2). Dit is een sneltest waarmee de aanwezigheid van tcdA en/of tcdB in feces kan worden aangetoond. De sensitiviteit van deze test is echter laag: Sloan *et al.* (2008) vergeleek de sneltest met toxigene celkweek en kwam uit op een sensitiviteit van 48%. Alcalá *et al.* (2008) en Bruins *et al.* (2012) deden hetzelfde en kwamen uit op een sensitiviteit van respectievelijk 66,7% en 41,1%. Omdat een *Clostridium*-kweek pas wordt ingezet als de sneltest positief is, wordt de bacterie over het hoofd gezien bij een foutnegatieve uitslag van de sneltest. Een andere methode om toxinen aan te tonen is toxigene celkweek: het testen van de cytotoxiciteit op een cellijn. Celkweek is echter duur en arbeidsintensief.



Figuur 1.2 ImmunoCard Toxins A&B test voor *C. difficile*.

Moleculaire technieken, zoals PCR (zie 1.4), worden steeds vaker gebruikt voor de diagnostiek van *C. difficile*. PCR kan direct worden toegepast op patiëntenmateriaal en spaart dus de tijd voor een kweek uit. Voor moleculaire diagnostiek van *C. difficile* kan zowel het *tcdA*-gen (*tcdA*) als het *tcdB*-gen (*tcdB*) gebruikt worden als target. Van den Berg *et al.* (2006) maakt bijvoorbeeld gebruik van *tcdB*, terwijl Bélanger *et al.* (2003) zowel *tcdA* als *tcdB* als target gebruikt (multiplex PCR).

1.3 Shigatoxineproducerende *Escherichia coli*

Escherichia coli (*E. coli*), een Gramnegatieve, facultatief anaerobe staaf, maakt een belangrijk deel uit van de darmflora. Deze bacterie is normaal gesproken niet pathogeen en is zelfs belangrijk voor de gezondheid van het spijsverteringskanaal. Bepaalde stammen zijn echter wel pathogeen en kunnen ziekte veroorzaken, zowel binnen als buiten het spijsverteringskanaal. *E. coli*-stammen die diarree veroorzaken kunnen worden opgelopen via besmet voedsel of water, of via andere mensen of dieren. Pathogene *E. coli*-stammen zijn onderverdeeld in zes pathotypen:

- Enterotoxigene *E. coli* (ETEC)
- Enteropathogene *E. coli* (EPEC)
- Enteroaggregatieve *E. coli* (EAEC)
- Enteroinvasieve *E. coli* (EIEC)
- Diffuus adherente *E. coli* (DAEC)
- Shigatoxineproducerende *E. coli* (STEC), ook wel bekend als enterohemorragische *E. coli* (EHEC) of Verocytotoxineproducerende *E. coli* (VTEC) (website CDC).

Wereldwijd worden meer dan 60 STEC-serotypen geassocieerd met ziekte bij de mens (Jaeger *et al.*, 2000).



Figuur 1.3 *E. coli* op bloedagar.

1.3.1 Symptomen

Infectie met STEC, met name serotype O157, kan leiden tot diarree, buikkamp en braken, veelal zonder koorts. Na één tot drie dagen wordt de diarree mogelijk bloederig (hemorragische colitis). De klachten verdwijnen doorgaans na gemiddeld vier dagen. STEC-infecties kunnen echter ook ernstiger gevolgen hebben. STEC is de belangrijkste veroorzaker van het hemolytisch uremisch syndroom (HUS). Dit levensbedreigende syndroom is verantwoordelijk voor afbraak van rode bloedcellen (hemolytische anemie), acuut nierfalen

en vermindering van het aantal bloedplaatjes (thrombocytopenie). Van de STEC-geïnfekteerde personen ontwikkelt 2 tot 7% HUS. Bij kinderen onder de 5 jaar kan dit oplopen tot 15%. 2 tot 9% van de patiënten overlijdt. Het merendeel herstelt volledig, maar 25% van de overlevenden loopt een chronische nieraandoening op. Ook is de kans op ontwikkeling van diabetes mellitus verhoogd. Kinderen onder de 5 jaar, ouderen boven de 65 jaar en mensen met een verzwakte afweer hebben een verhoogd risico op infectie met STEC (website RIVM).

1.3.2 Uitbraken

Uitbraken zijn niet seizoensgebonden. Een bekende recente STEC-uitbraak is die in Duitsland in 2011. In Duitsland raakten 4321 personen besmet, waarvan 852 personen HUS ontwikkelden en 50 zelfs overleden. In Nederland liep het aantal geïnfekteerden op tot 11 en hiervan ontwikkelden 4 patiënten HUS. De bacterie werd aangetroffen in kiemgroenten (website Rijksoverheid).

1.3.3 Pathogenese

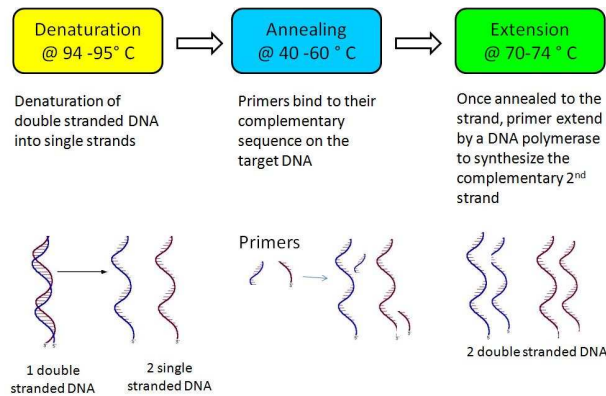
Eén van de belangrijkste virulentiefactoren van STEC is de productie van Shigatoxinen (Stx). Deze exotoxinen zijn onderverdeeld in Shigatoxine 1 (Stx1) en Shigatoxine 2 (Stx2) (Boerlin *et al.*, 1999). Ook het membraanewit intimine, gecodeerd door het gen *eae*, lijkt een belangrijke rol te spelen in de pathogenese. De meeste STEC-serotypen beschikken over dit gen. Intimine bindt aan een receptor die door de bacterie zelf in de buitenmembraan van darmepitheelcellen wordt geplaatst. Binding van intimine aan zijn receptor leidt uiteindelijk tot beschadiging van de brush border in de dikke en dunne darm. Door verzwakking van deze barrière kan Stx in de bloedbaan terechtkomen en binden aan een receptor op het nierendotheel. Na internalisatie veroorzaakt Stx celdood middels beschadiging van het ribosomaal RNA. Beschadiging van het nierendotheel leidt uiteindelijk tot HUS (website RIVM).

Volgens Caprioli *et al.* (2005) heeft Stx2 een grotere associatie met ernstige ziekte bij de mens dan Stx1. Ook intimine speelt een belangrijke rol in de pathogenese; hemorragische colitis en HUS zijn nauw geassocieerd met STEC-stammen die in het bezit zijn van het *eae*-gen (Blanco *et al.*, 2004). Volgens Loukiadis *et al.* (2006) zijn er echter ook *eae*-negatieve stammen gevonden die bloederige diarree en HUS veroorzaken.

1.3.4 Diagnostiek

Momenteel wordt in het AZN voor de diagnostiek van STEC gebruik gemaakt van kweek op chroom-agar voor serotype O157. Dit is echter niet het enige STEC-serotype dat infectie kan veroorzaken. Ook zegt de kweek niets over de eventuele toxineproductie van de *E. coli*.

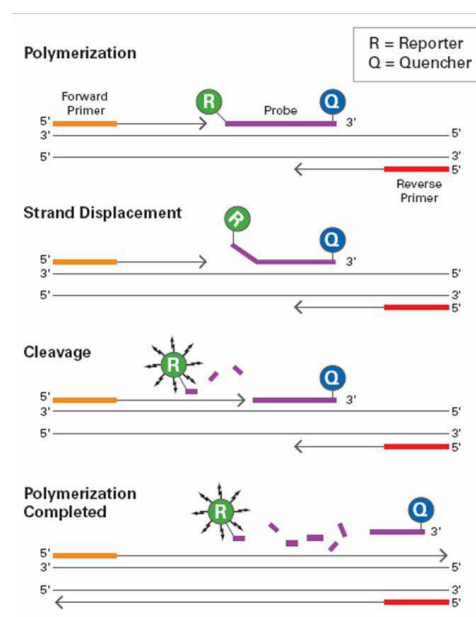
Er zijn verschillende methoden om Stx aan te tonen: er wordt bijvoorbeeld gekeken naar het cytotoxische effect van Stx op een Verocellijn. Ook kan serologisch onderzoek worden gedaan naar de aanwezigheid van Stx-antistoffen. Celkweek is echter arbeidsintensief en Stx-serologie is niet gevoelig genoeg gebleken (website RIVM 1).



Figuur 1.4 Basisprincipe van DNA-amplificatie.

1.4 Real-time PCR

Polymerase chain reaction (PCR) is een techniek waarmee DNA van een specifiek organisme kan worden aangetoond. Met behulp van specifieke forward en reverse primers, dNTP's en een polymerase-enzym wordt het betreffende DNA in temperatuurgereguleerde cycli geamplificeerd tot een aantoonbare hoeveelheid (figuur 1.4). Na PCR kan het DNA worden aangetoond middels een immunoblot. Bij real-time PCR is post-analyse niet nodig: DNA-replicatie en detectie vinden tegelijkertijd plaats. Naast specifieke primers wordt bij real-time PCR gebruik gemaakt van specifieke probes. Dit is een stukje DNA dat aan het ene uiteinde een quencher bevat en aan de andere kant een fluorescerende reporter. Zolang deze twee moleculen aan de probe zitten, dooft de quencher het signaal van de reporter uit. Wanneer de dubbele DNA-strengen onder invloed van temperatuur van elkaar worden gescheiden, binden de primers en de probe aan het enkelstrengs DNA. Zodra het DNA wordt geamplificeerd, zal de 5'-exonuclease-activiteit van het polymerase-enzym ervoor zorgen dat de probe wordt afgebroken. De afstand tussen de reporter en de quencher wordt vergroot en de reporter zendt zijn signaal uit (figuur 1.5). Als het fluorescente signaal boven een bepaalde drempelwaarde komt, is de PCR positief. Het nummer van de cyclus waarbij het signaal boven de threshold komt, is de Ct-waarde.



Figuur 1.5 Afbraak van de probe door DNA-polymerase.

1.5 Doel van het onderzoek

Bij infecties met zowel *C. difficile* als STEC is een snelle diagnose gewenst, vanwege de gemakkelijke verspreiding van de bacterie en/of de ernstige gevolgen van de infectie. Bij *C. difficile* is het van belang om de toxinen aan te tonen, omdat alleen de schadelijke stammen verantwoordelijk zijn voor de productie van toxinen. Ook in het geval van STEC kan beter worden ingespeeld op de toxineproductie, omdat er zoveel verschillende STEC-serotypen zijn dat diagnostiek op de bacterie zelf lastig is. Celkweek voor cytotoxiciteitstesten kost veel tijd en werk en serologische testen zijn niet altijd even betrouwbaar. Voor de diagnostiek van zowel toxineproducerende *C. difficile* als STEC biedt real-time PCR een goede mogelijkheid.

Het doel van dit onderzoek is het opzetten en valideren van een *Clostridium*-PCR met als target *tcdA*. Tevens zal de STEC-PCR worden gevalideerd, die al wel is opgezet maar nog niet voor diagnostiek wordt gebruikt. De targets van STEC zijn *eae*, het Stx1-gen (*Stx1*) en het Stx2-gen (*Stx2*).

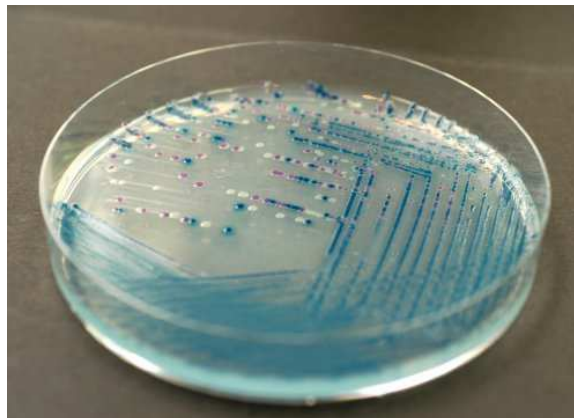
2. Materiaal en methoden

2.1 Bacteriestammen en klinische monsters

Ingevroren *C. difficile*- en STEC-stammen werden opgezocht via het programma Revco. Klinische fecesmonsters voor *Clostridium*-PCR werden aangeleverd door de afdeling Medische Microbiologie en Immunologie (MMI) van het AZN, de afdeling Medische Microbiologie van het Diaconessenhuis te Utrecht en de afdeling Medische Microbiologie van het Zuwe Hofpoort Ziekenhuis te Woerden. Klinische fecesmonsters voor STEC-PCR werden aangeleverd door de afdeling MMI van het AZN en de afdeling Research & Development van het Laboratorium voor Infectieziekten (LVI) te Groningen.

2.1.1 Kweek

Het kweken van *C. difficile* gebeurde met CLO-agar, een selectieve cycloserine-cefoxitine-fructose-agar (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Frankrijk). CLO-platen werden anaeroob geïncubeerd bij 37°C. Voor het kweken van STEC werd gebruik gemaakt van CHROMagar O157, een agar die selectief is voor *E. coli* O157 (CHROMagar, Parijs, Frankrijk). Serotype O157 kleurt op deze plaat roze (figuur 2.1). O157-platen werden aeroob geïncubeerd bij 37°C.



Figuur 2.1 *E. coli* O157 groeit roze op CHROMagar O157.

2.1.2 Gekwantificeerde stock *C. difficile*

Om een gekwantificeerde bacteriestock te maken, werd een tienvoudige verdunning gemaakt van een suspensie met *C. difficile* (Revco CG98). Van een verse *C. difficile*-kweek werd een aantal kolonies gesuspenderd in fysiologisch zout tot een dichtheid van 0,3 McFarland. Het fysiologisch zout was van tevoren op temperatuur gebracht door het ongeveer 30 minuten in de 37°C-stoof te zetten. De suspensie werd tienvoudig doorverdund in fysiologisch zout tot 10^{-7} . Van elke verdunning werd met behulp van een öse 1 µl op een COS-plaat uitgestreken. De verdunningen werden ingevroren bij -20°C en de kweekplaten werden twee dagen anaeroob geïncubeerd bij 37°C. Daarna kon aan de hand van kolonietelling op de platen voor elke verdunning het aantal colony-forming units (CFU) per ml worden berekend.

2.1.3 Gekwantificeerde verdunningsreeks *C. difficile* in Sigmawater

Met behulp van de gekwantificeerde stock werd een verdunning gemaakt van 10.000 DNA-kopieën per reactie (5 µl eluaat). De bacteriestock werd met Sigmawater verdund tot 90 µl en er werd 10 µl bovine serum albumine (BSA) aan toegevoegd. De BSA was nodig om de isolatie goed te laten verlopen. De verdunning werd geïsoleerd en tienvoudig verdund met Sigmawater tot 1.000, 100, 10 en 1 kopie per reactie.

2.1.4 Gekwantificeerde verdunningsreeks *C. difficile* in feces

Met behulp van de gekwantificeerde *Clostridium*-stock werd een verdunning gemaakt van 100 kopieën per reactie in vloeibare feces. Deze verdunning werd doorverdund in feces tot 10, 5 en 1 kopie per reactie. Alle verdunningen werden op de gebruikelijke manier geïsoleerd.

2.1.5 Gekwantificeerde stock STEC

Om een gekwantificeerde bacteriestock te maken, werd een tienvoudige verdunning gemaakt van een suspensie met STEC (Revco BS263). Van een verse STEC-kweek werd een aantal kolonies gesuspendeerd in fysiologisch zout tot een dichtheid van 1,4 McFarland. De suspensie werd tienvoudig doorverdund in fysiologisch zout tot 10^{-7} . Van elke verdunning werd met behulp van een öse 1 µl op een COS-plaat uitgestreken. De verdunningen werden ingevroren bij -20°C en de kweekplaten werden overnacht aeroob geïncubeerd bij 37°C. Daarna kon aan de hand van kolonietelling op de platen voor elke verdunning het aantal CFU per ml worden berekend.

2.1.6 Gekwantificeerde verdunningsreeks STEC in Sigmawater

Met behulp van de gekwantificeerde stock werd een verdunning gemaakt van 125.000 DNA-kopieën per reactie (5 µl eluaat). De bacteriestock werd met Sigmawater verdund tot 90 µl en er werd 10 µl BSA aan toegevoegd. De verdunning werd geïsoleerd en tienvoudig verdund met Sigmawater tot 10.000, 1.000, 100, 10 en 1 kopie per reactie.

2.1.7 Gekwantificeerde verdunningsreeks STEC in feces

Met behulp van de gekwantificeerde STEC-stock werd een verdunning gemaakt van 200 kopieën per reactie in vloeibare feces. Deze verdunning werd doorverdund in feces tot 100, 10, 5 en 1 kopie per reactie. Alle verdunningen werden op de gebruikelijke manier geïsoleerd.

2.2 Moleculaire ruimten

Het moleculaire laboratorium is opgedeeld in meerdere ruimten om contaminatie van PCR-monsters met DNA of RNA zoveel mogelijk te voorkomen.

2.2.1 Ruimte 1

Hier worden de PCR-buffers gemaakt. In ruimte 1 wordt geheel DNA/RNA-vrij gewerkt; er mag dus geen patiëntenmateriaal mee naar binnen worden genomen. Vanuit ruimte 2 of 3 mag iemand op dezelfde dag niet meer terug naar ruimte 1, omdat de kans op contaminatie te groot is. In de ruimte wordt gewerkt met een bovendruk van >5 Pascal. Voor het betreden van ruimte 1 moeten in de sluis achtereenvolgens overschoentjes, labjas en handschoenen worden aangetrokken. De werkzaamheden worden uitgevoerd in het kabinet. De werkplek

wordt na afloop schoongemaakt met achtereenvolgens chlooroplossing (500 ppm), demiwater en ethanol 70%. Vervolgens wordt een UV-lamp aangezet, die na 30 minuten automatisch uit gaat.

2.2.2 Ruimte 2

Hier wordt DNA en RNA geïsoleerd uit patiëntenmateriaal. Ook in ruimte 2 wordt gewerkt met een bovendruk van >5 Pascal. Voor het betreden van de ruimte moeten in de sluis achtereenvolgens labjas en handschoenen worden aangetrokken. De werkzaamheden worden uitgevoerd in het kabinet of de laminaire flowkast. De werkplek wordt na afloop schoongemaakt met achtereenvolgens chlooroplossing (500 ppm), demiwater en ethanol 70%. Vervolgens wordt een UV-lamp aangezet, die na 30 minuten automatisch uit gaat.

2.2.3 Ruimte 3

Ruimte 3 is de moleculaire afdeling op het MMI-laboratorium. In deze ruimte wordt de PCR uitgevoerd. Ook vindt hier DNA-isolatie uit feces plaats vanwege de hoge DNA-load van dit materiaal. In ruimte 3 wordt met de eigen labjas gewerkt. De werkplek wordt na afloop schoongemaakt met achtereenvolgens chlooroplossing (500 ppm), demiwater en ethanol 70% (SOP: MB-PRC-HUI-05).

2.3 PCR-reagentia

2.3.1 Voormix

Voormix werd samengesteld met de volgende concentraties:

- 500 nM forward primer
- 500 nM reverse primer
- 500 nM probe
- 10% 10 mg/ml BSA
- aangevuld met DNase/RNase-vrij Sigmawater (Sigma-Aldrich, St. Louis, Verenigde Staten).

2.3.2 Mastermix

Er werd gebruik gemaakt van TaqMan Fast Virus 1-Step Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, Californië, Verenigde Staten), aangeduid met 4*mastermix. Met deze mastermix duurt een PCR-run slechts 40 minuten.

Per PCR-reactie werd 10 µl voormix toegevoegd aan 5 µl 4*mastermix. Vervolgens werd 15 µl van deze mix met 5 µl DNA-eluaat in een welletje gepipetteerd. Voor de negatieve controle werd in plaats van DNA-eluaat 5 µl Sigmawater toegevoegd.

2.4 Primers en probes

De primer- en probesequenties zijn weergegeven in tabel 2.1. De primer- en probesequenties voor *Clostridium*-PCR zijn overgenomen van Lesla Bruijnesteijn (Isala klinieken, Zwolle) met kleine aanpassingen. Sequenties van de STEC-targetgenen werden opgezocht in de EMBL database met behulp van de Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). Vervolgens werden alignments gemaakt met het programma BioEdit Sequence Alignment Editor. Primers en probes werden ontworpen met Primer Express (Applied Biosystems) en werden besteld bij Eurogentec (Luik, België).

Tabel 2.1 Primer- en probesequenties voor *tcdA*, *Stx1*, *Stx2* en *eae*.

<i>C. difficile tcdA</i>	forward primer	TTA CAT TTT GTA TGG ATA GGT GGA GAA
	reverse primer	TGC ATT AAT ATC AGC CCA TTG TTT
	probe	TCA GTG ATA TTG YTC TTG AAT AC
STEC <i>Stx1</i>	forward primer	GCG GTT ACA TTG TCT GGT GAC A
	reverse primer	CGT ACG ACT GAT CCC YGC AA
	probe	AGC TAT ACC ACG TTA CAG CG
STEC <i>Stx2</i>	forward primer 1	CGG TGT GAC AAC KRT TTC CAT GA
	reverse primer 1	CAG CGC TGC GAC ACG TT
	forward primer 2	GCC TGA TGT GAT AAC TGT TTC CAT
	reverse primer 2	CTG CGA TTC GCT GTA ATG ATG
	probe	RAC GGA CAG CAG YTA T
STEC <i>eae</i>	forward primer 1	CGT TTA GGT ATT GGT GGS GAA T
	forward primer 2	GCT TAG GAA TCG GCG GTG A
	reverse primer	CAT GCG GAA ATA GCC GTT MAC
	probe	TTT TRA AAT AGT CTC GCC A

2.5 Interne controle

Als interne controle (IC) werd de Cyanobacterie *Synechococcus* gebruikt. Deze Gramnegatieve staaf komt voor in mariene milieus en is niet pathogeen, waardoor het kan dienen als DNA-IC (SOP: MB-ANL-DIC-01). De IC werd gebruikt als maat voor de efficiëntie van DNA-isolatie en als controle op remming tijdens PCR. In tabel 2.2 zijn de primer- en probesequenties van de IC weergegeven. De IC die we hebben gebruikt wordt aangeduid met IC4*, behorend bij de 4*mastermix.

Tabel 2.2 Primer- en probesequenties IC.

forward primer	CAT TCT TGA CAA GTT AAC CAG TTA GCT G
reverse primer	CAA GGT TCT GCT GAC ATT CAA ACA
probe	TCT CCA GGG CAG CAT TGA ATC CAG



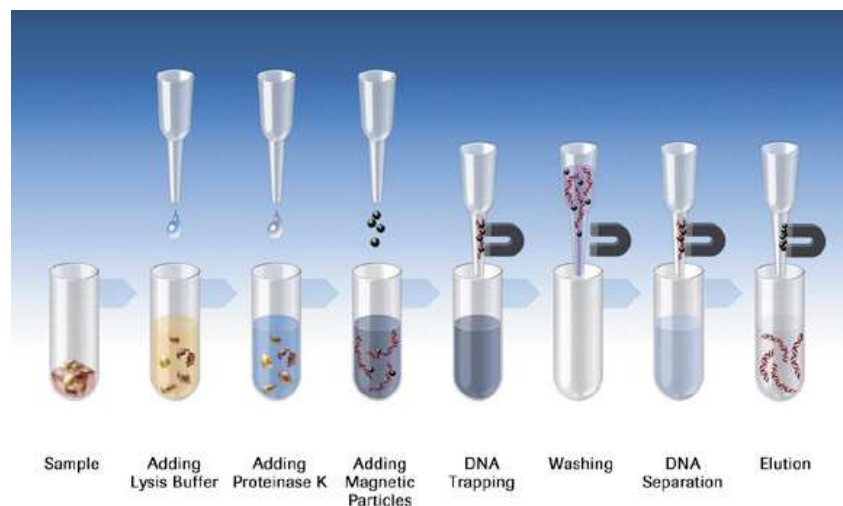
Figuur 2.2 MagNA Pure Compact System.



Figuur 2.3 MagNA Pure LC System.

2.6 DNA-isolatie

Feces werd gesuspenderd in Stool Transfer And Recovery (STAR)-buffer (Roche Applied Science, Penzberg, Duitsland). Deze buffer zorgt voor stabilisatie van de nucleïnezuren, binding van remmende stoffen en inactivatie van nucleases (website Docstoc). Circa 1 µl feces werd met een öse gesuspenderd in een schroefdopvial met 200 µl STAR-buffer en 20 µl IC. De vials werden bij 99°C geschud met 1400 rpm gedurende 15 minuten op de Eppendorf Thermomixer (Eppendorf, Hamburg, Duitsland) in ruimte 2. Vervolgens werden ze 4 minuten bij -20°C gezet om af te koelen. De afgekoelde vials werden 5 minuten afgedraaid bij 20.000 rpm in de Hettich Mikro 22 Microcentrifuge (24 place 0.4- 2.0 ml rotor - 31154 x g) (Hettich Lab Technology, Tuttlingen, Duitsland). Vervolgens werd 100 µl van het supernatant gebruikt voor DNA-isolatie. Het afdraaien en pipetteren van het supernatant gebeurde in ruimte 3, vanwege de hoge DNA-load van het materiaal. Voor isolatie van hoeveelheden monster t/m 8 werd het MagNA Pure Compact System (Roche Applied Science) (figuur 2.2) gebruikt in ruimte 2. Voor isolatie van hoeveelheden monster van 9 t/m 32 werd het MagNA Pure LC System (Roche Applied Science) (figuur 2.3) gebruikt in ruimte 3. Zie figuur 2.4 voor de verschillende isolatiestappen van het MagNA Pure System.



Figuur 2.4 Isolatiemethode MagNA Pure System.

2.7 Real-time PCR

PCR-mix en DNA-eluaat werden gepipetteerd in een MicroAmp Fast Optical 48-wellsplaat (Applied Biosystems). Daarna werd de PCR-plaat afgedekt met een MicroAmp 48-well Optical Adhesive Film (Applied Biosystems). Om eventuele luchtbelln van de bodem van de wells te verwijderen, werd de plaat kort afgedraaid in een slacentrifuge. Real-time PCR werd uitgevoerd met behulp van het StepOne Real-Time PCR System (Applied Biosystems) (figuur 2.5). Een PCR-cyclus bestond uit 1 seconde op 95°C om het dubbelstrengs DNA te laten smelten, en 20 seconden op 60°C om de primers en de probe te laten binden en het DNA te amplificeren. Een PCR bestond uit 40 cycli.



Figuur 2.5 StepOne Real-Time PCR System.

2.8 PCR-validatie

2.8.1 Analytische validatie

- Juistheid: bekend positieve monsters moeten positief zijn in de PCR.
- Intratestvariatie (herhaalbaarheid): als een monster in triplo wordt getest, moet deze drie keer ongeveer dezelfde Ct-waarde hebben.
- Intertestvariatie (reproduceerbaarheid): als een monster op drie verschillende dagen wordt getest, moet deze drie keer ongeveer dezelfde Ct-waarde hebben.
- Specificiteit: PCR mag niet positief worden bij andere soorten.
- Technische detectiegrens: per tienvoudige verdunning van het aantal DNA-kopieën per reactie mag het verschil in cycli niet groter zijn dan 4.
- Klinische detectiegrens: 1 tot 10 DNA-kopieën per reactie moeten detecteerbaar zijn.
- Robuustheid: met behulp van een interne controle wordt getest of er remmende stoffen aanwezig zijn.

2.8.2 Klinische validatie

- Sensitiviteit en specificiteit: er wordt een aantal klinische monsters getest waarvan de gouden standaard is bepaald. Vervolgens worden aan de hand van de resultaten de sensitiviteit en de specificiteit berekend.

3. Resultaten

3.1 C. difficile

3.1.1 Optimaliseren primerconcentraties

Om de concentraties van de forward en reverse primer te optimaliseren, werd een primermatrix ontworpen (tabel 3.1).

Tabel 3.1 Primermatrix.

	Reverse primer (nM)		
Forward primer (nM)	300 \ 300	300 \ 500	300 \ 900
	500 \ 300	500 \ 500	500 \ 900
	900 \ 300	900 \ 500	900 \ 900

Op een bekend positief DNA-monster (Revco CE31) werd een PCR uitgevoerd, waarbij telkens een andere combinatie primerconcentraties uit de primermatrix werd gebruikt. Het monster werd voor elke concentratie 10^2 x en 10^4 x verdund. De resultaten zijn weergegeven in tabel 3.2.

Tabel 3.2 Resultaten primermatrix met twee verschillende monsterverdunningen.

Monster-verdunning	Forward primer (nM)	Reverse primer (nM)	Ct-waarde
10^{-2}	300	300	24,6
		500	24,3
		900	24,4
	500	300	24,9
		500	24,7
		900	24,6
	900	300	25,1
		500	24,9
		900	24,5
10^{-4}	300	300	31,5
		500	31,5
		900	30,8
	500	300	31,9
		500	31,6
		900	31,4
	900	300	31,8
		500	31,7
		900	31,2

De Ct-waarden verschillen zo weinig van elkaar dat is besloten om PCR uit te voeren met de standaard primerconcentraties die in het AZN worden gebruikt, namelijk 500 nM forward primer en 500 nM reverse primer.

3.1.2 Optimaliseren probeconcentratie

Om de concentratie van de probe te optimaliseren, werd een PCR uitgevoerd op een bekend positief DNA-monster (Revco CE31) met verschillende probeconcentraties. Het monster werd voor elke concentratie 10^2 x en 10^4 x verdund. De resultaten zijn weergegeven in tabel 3.3.

Tabel 3.3 Resultaten probeconcentraties met twee verschillende monsterverdunningen.

Monster-verdunning	Probe (nM)	Ct-waarde
10^{-2}	100	21,8
		21,9
	150	21,2
		21,1
	200	20,9
		20,7
	250	20,6
		20,6
10^{-4}	100	24,9
		24,9
	150	24,5
		24,5
	200	24,1
		24,2
	250	24,1
		24,0

Er is geen groot verschil tussen de Ct-waarden van de verschillende concentraties, dus werd besloten om PCR uit te voeren met de standaard probeconcentratie die in het AZN wordt gebruikt: 150 nM.

3.1.3 Invriesstap

Volgens de SOP 'Voorbewerking voor DNA-isolatie uit feces' worden de fecesmonsters voorafgaand aan isolatie overnacht bewaard in STAR-buffer bij -80°C . Om te kijken of de invriesstap weggelaten kan worden, werd op vier bekend positieve monsters, zowel met als zonder invriesstap, in triplo een PCR uitgevoerd (tabel 3.4).

Tabel 3.4 Resultaten PCR met en zonder invriesstap.

Monster	Invriesstap	Gem. Ct-waarde
CDT1	Ja	28,9
	Nee	29,3
CDT2	Ja	35,4
	Nee	36,2
CDT3	Ja	32,0
	Nee	32,4
CDT4	Ja	32,9
	Nee	33,5

Er zijn geen grote verschillen tussen de Ct-waarden met en zonder invriesstap. DNA-isolatie kan uitgevoerd worden zonder de monsters van tevoren in te vriezen.

3.1.4 Analytische validatie: juistheid

Om de juistheid van de PCR te bepalen, werd een PCR uitgevoerd op elf bekend positieve fecesmonsters. CDT 1 t/m 4 werd getest in triplo, CDT 5 t/m 10 in duplo en CDT 11 in mono. De gemiddelde Ct-waarden zijn weergegeven in tabel 3.5.

Tabel 3.5 Resultaten bekend positieve monsters.

Monster	Gem. Ct-waarde
CDT1	29,3
CDT2	36,2
CDT3	32,4
CDT4	33,5
CDT5	33,8
CDT6	-
CDT7	-
CDT8	34,8
CDT9	31,0
CDT10	30,2
CDT11	28,4

3.1.5 Analytische validatie: intratestvariatie

Om de herhaalbaarheid van de PCR te bepalen, werd een PCR uitgevoerd op drie bekend positieve monsters in triplo. Vervolgens werden de variatiecoëfficiënten berekend; deze dienden lager te zijn dan 5% (tabel 3.6).

Tabel 3.6 Resultaten intratestvariatie.

Monster	Ct-waarde	Var. coëff.
CDT1	29,3	0,26%
	29,3	
	29,2	
CDT3	32,6	0,52%
	32,5	
	32,3	
CDT4	34,3	1,94%
	33,0	
	33,3	

3.1.6 Analytische validatie: intertestvariatie

Om de reproduceerbaarheid van de PCR te bepalen, werd een PCR uitgevoerd op drie bekend positieve monsters op drie verschillende dagen. De eerste dag werden de monsters getest in triplo, de tweede en derde dag in duplo. Ook hiervan werden de variatiecoëfficiënten berekend, die lager moesten zijn dan 5% (tabel 3.7).

Tabel 3.7 Resultaten intertestvariatie.

Monster	Dag	Ct-waarde	Var. coëff.
CDT1	1	29,3	3,44%
		29,3	
		29,2	
	2	30,6	
		30,4	
	3	31,8	
		31,5	
	CDT3	32,6	2,82%
		32,5	
		32,3	
CDT4	2	32,6	
		32,9	
		34,6	
	3	34,3	
		34,3	
	1	34,3	4,17%
		33,0	
		33,3	
	2	32,7	
		32,5	
	3	35,9	
		35,7	

3.1.7 Analytische validatie: specificiteit

Met behulp van BLAST werd in de EMBL database gezocht naar DNA-sequenties in andere bacteriesoorten die (deels) overeenkomen met de primer- en probesequenties van *C. difficile*. Om te kijken of in de PCR geen kruisreacties voorkomen met verwante soorten of andere darmpathogenen, werd een PCR uitgevoerd op DNA-monsters van de volgende bacteriesoorten:

Soorten met (deels) overeenkomende DNA-sequenties

- *Escherichia coli* (Revco FJ316)
- *Enterobacter cloacae* (Revco FJ82)
- *Enterobacter aerogenes* (Revco FF311)
- *Klebsiella oxytoca* (Revco FJ155)
- *Listeria monocytogenes* (Revco FF257)

Andere darmpathogenen

- *Salmonella* sp. (Revco FC362)
- *Shigella* sp. (Revco EC261)
- *Yersinia* sp. (Revco EM193)
- *Campylobacter jejuni* (Revco FH201)
- *Clostridium perfringens* (Revco FE182)
- Niet-toxineproducerende *Clostridium difficile* (B794760)

De DNA-monsters van alle bovenstaande soorten bleven negatief in de PCR.

3.1.8 Analytische validatie: technische detectiegrens

Om de detectiegrens van de PCR onder optimale omstandigheden te bepalen, werd een PCR uitgevoerd op een gekwantificeerde verdunningsreeks van DNA in Sigmawater. De monsters werden in triplo getest. 1 tot 10 kopieën per reactie moesten detecteerbaar zijn en per tienvoudige verdunning moest het verschil in cycli kleiner zijn dan 4 (tabel 3.8). Eén van de reacties van de verdunning van 1 kopie per reactie bleef negatief.

Tabel 3.8 Resultaten bepaling technische detectiegrens.

Verdunning	Gem. Ct-waarde	Vershil
10.000/reactie	25,1	
1.000/reactie	28,6	3,5
100/reactie	31,9	3,3
10/reactie	34,8	2,9
1/reactie	36,5	1,7

3.1.9 Analytische validatie: klinische detectiegrens

Om de klinische detectiegrens van de PCR te bepalen, werd een isolatie en een PCR uitgevoerd op een gekwantificeerde verdunningsreeks van bacteriën in feces. De monsters werden in duplo getest. 1 tot 10 kopieën per reactie moesten detecteerbaar zijn en per tienvoudige verdunning moest het verschil in cycli kleiner zijn dan 4 (tabel 3.9).

Tabel 3.9 Resultaten bepaling klinische detectiegrens.

Verdunning	Gem. Ct-waarde	Vershil
100/reactie	32,0	
10/reactie	35,5	3,5
5/reactie	36,8	1,3
1/reactie	35,8	-1

3.1.10 Klinische validatie: sensitiviteit

Om de sensitiviteit van de PCR te bepalen, werd een PCR uitgevoerd op 119 klinische monsters, aangevraagd op de toxinesneltest, met de betreffende sneltest als gouden standaard. De resultaten zijn weergegeven in tabel 3.10. De sensitiviteit werd als volgt berekend: aantal juist positieven / (aantal juist positieven + aantal onjuist negatieven) *100%. Met de resultaten uit de tabel kwam de sensitiviteit uit op: $9 / (9 + 2) * 100\% = 82\%$.

Tabel 3.10 Resultaten klinische validatie.

	Sneltest +	Sneltest -
PCR +	9	4
PCR -	2	104

3.1.11 Klinische validatie: specificiteit

Aan de hand van de resultaten in tabel 3.10 kon ook de specificiteit worden berekend: aantal juist negatieven / (aantal juist negatieven + aantal onjuist positieven) *100%. Met de resultaten uit de tabel kwam de specificiteit uit op: $104 / (104 + 4) * 100\% = 96\%$.

3.2 STEC

Omdat de PCR voor STEC reeds was opgezet, volgen hier de resultaten van de validatie van de STEC-PCR.

3.2.1 Analytische validatie: juistheid

Om de juistheid van de PCR te bepalen, werd een PCR uitgevoerd op 15 STEC-stammen uit Revco. De Ct-waarden zijn weergegeven in tabel 3.11. Van elke stam hoort minimaal één van de toxinegenen positief te zijn. Zoals te zien in de tabel, geldt dit niet voor de laatste drie stammen. Nadat deze drie stammen waren opgestuurd naar het Universitair Centrum in Groningen (UMCG) voor controle, bleken de stammen inderdaad *Stx*-negatief te zijn.

Tabel 3.11 Resultaten STEC-stammen.

Revco-nummer	Ct-waarde		
	<i>Stx1</i>	<i>Stx2</i>	<i>eae</i>
BS263	19,4	22,0	22,8
BS264	18,8	-	22,7
BS266	18,6	-	22,8
BS267	18,3	-	22,3
CE346	37,0	-	-
CE347	17,8	-	-
CE348	-	21,8	23,0
CE349	-	19,3	-
CE350	-	20,2	-
BP52	-	21,8	-
CG399	-	19,8	22,0
EC223	-	19,0	21,6
BS265	-	-	-
EC218	-	-	23,0
EC298	-	-	-

3.2.2 Analytische validatie: intratestvariatie

Om de herhaalbaarheid van de PCR te bepalen, werd voor elk gen een PCR uitgevoerd op drie bekend positieve monsters in triplo. Ook hiervan werden de variatiecoëfficiënten berekend, die lager moesten zijn dan 5% (tabel 3.12, 3.13 en 3.14).

Tabel 3.12 Resultaten intratestvariatie voor *Stx1*.

Monster	Ct-waarde	Var. coëff.
STEC44	32,7	0,18%
	32,7	
	32,8	
STEC47	36,0	0,43%
	35,7	
	35,7	
STEC53	32,4	0,33%
	32,7	
	32,7	

Tabel 3.13 Resultaten intratestvariatie voor *Stx2*.

Monster	Ct-waarde	Var. coëff.
STEC43	29,1	1,55%
	30,0	
	29,7	
STEC44	30,8	0,77%
	30,4	
	30,4	
STEC47	35,5	0,37%
	35,3	
	35,2	

Tabel 3.14 Resultaten intratestvariatie voor *eae*.

Monster	Ct-waarde	Var. coëff.
STEC43	29,8	0,23%
	29,7	
	29,8	
STEC47	34,0	0,53%
	34,1	
	34,3	
STEC53	31,9	0,38%
	32,0	
	32,2	

3.2.3 Analytische validatie: intertestvariatie

Om de reproduceerbaarheid van de PCR te bepalen, werd voor elk gen een PCR uitgevoerd op drie bekend positieve monsters op drie verschillende dagen. De monsters werden getest in duplo. Vervolgens werden de variatiecoëfficiënten berekend; deze dienden lager te zijn dan 5% (tabel 3.15, 3.16 en 3.17).

Tabel 3.15 Resultaten intertestvariatie voor *Stx1*.

Monster	Dag	Ct-waarde	Var. coëff.
STEC44	1	30,3	3,00%
		30,2	
	2	29,1	
		29,0	
	3	31,0	
		31,1	
STEC47	1	34,6	1,77%
		35,0	
	2	34,9	
		35,0	
	3	33,8	
		33,6	
STEC53	1	30,2	1,70%
		30,0	
	2	31,3	
		31,0	
	3	30,5	
		30,2	

Tabel 3.16 Resultaten intertestvariatie voor *Stx2*.

Monster	Dag	Ct-waarde	Var. coëff.
STEC43	1	31,3	5,52%
		31,4	
	2	28,6	
		28,4	
	3	28,0	
		28,1	
STEC44	1	29,7	3,45%
		29,7	
	2	28,7	
		28,9	
	3	29,5	
		31,6	
STEC47	1	34,9	2,33%
		35,0	
	2	34,5	
		35,0	
	3	33,2	
		33,4	

Tabel 3.17 Resultaten intertestvariatie voor *eae*.

Monster	Dag	Ct-waarde	Var. coëff.
STEC43	1	30,3	3,44%
		30,3	
	2	28,1	
		28,1	
	3	28,9	
		28,8	
STEC47	1	33,7	1,47%
		34,3	
	2	33,1	
		33,0	
	3	33,3	
		33,5	
STEC53	1	30,0	1,83%
		29,9	
	2	30,0	
		30,0	
	3	31,0	
		31,1	

3.2.4 Analytische validatie: specificiteit

Met behulp van BLAST werd in de EMBL database gezocht naar DNA-sequenties in andere bacteriesoorten die (deels) overeenkomen met de primer- en probesequenties van *C. difficile*. Om te kijken of in de PCR geen kruisreacties voorkomen met verwante soorten of andere darmpathogenen, werd een PCR uitgevoerd op DNA-monsters van de volgende bacteriesoorten:

Soorten met (deels) overeenkomende DNA-sequenties

- *Enterobacter cloacae* (Revco FJ82)
- *Listeria monocytogenes* (Revco FF257)
- *Proteus mirabilis* (Revco FJ35)
- *Shigella dysenteriae* (Revco DH104)
- *Shigella sonnei* (Revco EM312)
- *Acinetobacter haemolyticus* (Revco CC128)
- *Citrobacter freundii* (Revco FJ30)
- *Enterococcus faecalis* (Revco FJ45)

Andere darmpathogenen

- *Salmonella* sp. (Revco FC362)
- *Yersinia* sp. (Revco EM193)
- *Campylobacter jejuni* (Revco FH201)
- *Escherichia coli* (Revco FJ316)

De DNA-monsters van alle bovenstaande soorten bleven negatief in de PCR.

3.2.5 Analytische validatie: technische detectiegrens

Om de detectiegrens van de PCR onder optimale omstandigheden te bepalen, werd een PCR uitgevoerd op een gekwantificeerde verdunningsreeks van DNA in Sigmawater. De monsters werden in triplo getest. 1 tot 10 kopieën per reactie moesten detecteerbaar zijn en per tienvoudige verdunning moest het verschil in cycli kleiner zijn dan 4 (tabel 3.18, 3.19 en 3.20). Bij *Stx2* bleef één van de reacties van de verdunning van 10 kopieën per reactie negatief, terwijl één reactie van de verdunning van 1 kopie per reactie positief was. Verder waren alle reacties van de verdunning van 1 kopie per reacties bij alle drie de genen negatief.

Tabel 3.18 Resultaten bepaling technische detectiegrens voor *Stx1*.

Verdunning	Gem. Ct-waarde	Vershil
10.000/reactie	25,9	
1.000/reactie	29,4	3,5
100/reactie	32,4	3,0
10/reactie	35,6	3,2
1/reactie	-	-

Tabel 3.19 Resultaten bepaling technische detectiegrens voor *Stx2*.

Verdunning	Gem. Ct-waarde	Vershil
10.000/reactie	27,4	
1.000/reactie	30,9	3,5
100/reactie	34,3	3,4
10/reactie	36,7	2,4
1/reactie	37,0	0,3

Tabel 3.20 Resultaten bepaling technische detectiegrens voor *eae*.

Verdunning	Gem. Ct-waarde	Vershil
10.000/reactie	27,6	
1.000/reactie	30,9	3,3
100/reactie	33,5	2,6
10/reactie	36,9	3,4
1/reactie	-	-

3.2.6 Analytische validatie: klinische detectiegrens

Om de klinische detectiegrens van de PCR te bepalen, werd een isolatie en een PCR uitgevoerd op een gekwantificeerde verdunningsreeks van bacteriën in feces. De monsters werden in triplo getest. 1 tot 10 kopieën per reactie moesten detecteerbaar zijn en per tienvoudige verdunning moest het verschil in cycli kleiner zijn dan 4 (tabel 3.21, 3.22 en 3.23).

Tabel 3.21 Resultaten bepaling klinische detectiegrens *Stx1*.

Verdunning	Gem. Ct-waarde	Vershil
200/reactie	27,4	
100/reactie	29,0	1,6
10/reactie	33,0	4,0
5/reactie	33,9	0,9
1/reactie	33,6	-0,3

Tabel 3.22 Resultaten bepaling klinische detectiegrens *Stx2*.

Verdunning	Gem. Ct-waarde	Vershil
200/reactie	26,9	
100/reactie	28,6	1,7
10/reactie	32,4	3,8
5/reactie	33,7	1,3
1/reactie	35,2	1,5

Tabel 3.23 Resultaten bepaling klinische detectiegrens *eae*.

Verdunning	Gem. Ct-waarde	Vershil
200/reactie	26,8	
100/reactie	28,5	1,7
10/reactie	31,9	3,4
5/reactie	33,0	1,1
1/reactie	35,2	2,2

3.2.7 Klinische validatie: sensitiviteit

Om de sensitiviteit van de PCR te bepalen, werd een PCR uitgevoerd op 53 klinische monsters. De 31 monsters uit het AZN waren aangevraagd op *E.coli* O157-kweek of *Salmonella*-, *Shigella*-, *Yersinia*- en *Campylobacter*- (SSYC)-PCR. Voor deze monsters werd de *E.coli* O157-kweek als gouden standaard gebruikt. Op de 22 klinische monsters van het Lvl te Groningen was STEC-PCR uitgevoerd, dus dit diende vanzelfsprekend als de gouden standaard voor deze monsters. De resultaten zijn weergegeven in tabel 3.24. De sensitiviteit werd als volgt berekend: aantal juist positieven / (aantal juist positieven + aantal onjuist negatieven) *100%. Met de resultaten uit de tabel kwam de sensitiviteit uit op: 14 / (14 + 8) *100% = 64%.

Tabel 3.24 Resultaten klinische validatie

	Gouden standaard +	Gouden standaard -
PCR +	14	0
PCR -	8	31

3.2.8 Klinische validatie: specificiteit

Aan de hand van de resultaten in tabel 3.24 kon ook de specificiteit worden berekend: aantal juist negatieven / (aantal juist negatieven + aantal onjuist positieven) *100%. Met de resultaten uit de tabel kwam de specificiteit uit op: 31 / (31 +0) *100% = 100%.

3.2.9 Detectie in ongekoelde feces

Om te testen of het ongekoeld bewaren van feces invloed heeft op de hoogte van de Ct-waarden, werd STEC-positieve feces een week bij kamertemperatuur bewaard. Hiervoor werd de verdunning van 100 kopieën per reactie van de gekwantificeerde feces gebruikt. Op vijf verschillende dagen werd hiervan feces geïsoleerd en op de eluat werd een PCR uitgevoerd. De Ct-waarden van de verschillende dagen zijn weergegeven in tabel 3.25. Na vijf dagen waren de Ct-waarden niet aanzienlijk verhoogd.

Tabel 3.25 Resultaten detectie bij ongekoeld bewaren.

Dag	Ct-waarde		
	<i>Stx1</i>	<i>Stx2</i>	<i>eae</i>
1	29,0	28,6	28,5
2	29,0	28,3	29,6
3	29,3	28,7	29,8
4	29,4	28,9	30,0
5	29,6	29,0	30,4

3.3 Interne controle

Omdat de ABI StepOne niet is gekalibreerd voor de TAMRA-quencher van de IC4*-probe, werd het signaal van de probe niet goed gemeten. Hierdoor waren de Ct-waarden van IC4* vrij hoog (32-36 cycli). Om te controleren of de Ct-waarden van IC4* goed waren, werd de IC van een aantal klinische CDT-monsters gemeten met behulp van de ABI PRISM 7500 (Applied Biosystems), die wel is gekalibreerd voor IC4*. In tabel 3.26 zijn de Ct-waarden van de ABI 7500 vergeleken met de Ct-waarden van de StepOne. De verschillen lagen tussen de 2,8 en 3,5 cycli.

Tabel 3.26 Ct-waarden IC op ABI StepOne en ABI PRISM 7500.

Monster	Ct-waarde		Verskil
	StepOne	PRISM 7500	
90	34,4	30,9	3,5
91	34,0	30,5	3,5
92	34,2	31	3,2
93	34,0	30,8	3,2
94	34,1	30,8	3,3
95	34,2	30,7	3,5
96	34,9	32,1	2,8
97	33,6	30,5	3,1
98	33,9	30,8	3,1
99	33,9	30,7	3,2

4. Discussie en conclusie

4.1 *C. difficile*

4.1.1 Gouden standaard

Voor de validatie van de *Clostridium*-PCR werd de toxinesneltest aangehouden als gouden standaard. Als een monster echter positief was in de PCR terwijl de sneltest negatief was, dan werd er een kweek op *C. difficile* ingezet. Ook als een monster negatief was in de PCR terwijl de sneltest positief was, werd gekeken of *C. difficile* gekweekt was. Dit laatste werd gedaan bij de twee PCR-negatieve monsters die voor de juistheid waren gebruikt. Als we bij bovenstaande monsters rekening houden met de uitkomst van de kweek, zouden zowel de sensitiviteit als de specificiteit uitkomen op 100%.

4.1.2 TcdA en/of tcdB als target

Het target dat we voor *Clostridium*-PCR gebruiken is *tcdA*. Volgens Lyerly *et al.* (1985) is vooral *tcdA* verantwoordelijk voor de ziekteverschijnselen bij infectie met *C. difficile*. *TcdB* zou alleen werkzaam zijn op een door *tcdA* beschadigde darmwand of in combinatie met *tcdA*. Riegler *et al.* (1995) tonen echter aan dat *tcdB* zelfs meer potentie heeft dan *tcdA* om schade aan te richten.

Er zijn stammen gevonden die alleen *tcdB* produceren: Geric *et al.* (2004) en Pituch *et al.* (2001) wijzen op een percentage *tcdA*-negatieve stammen van 11%. Samra *et al.* (2002) kwamen zelfs uit op een percentage van 56,5% *tcdA*-negatieve stammen. Stammen die alleen *tcdB* produceren, en dus wel degelijk schadelijk kunnen zijn, zouden op die manier gemist kunnen worden in een PCR met als target *tcdA*.

Volgens Persson *et al.* (2008) hebben *tcdA*-negatieve stammen een deletie aan het 3'-eind van *tcdA*. De primers en probe die we gebruiken zijn zo ontworpen (Lesla Bruijnesteijn, Isala klinieken, Zwolle; met kleine aanpassingen) dat ze de deletie, indien aanwezig, omzeilen. Zodoende kunnen *tcdA*-negatieve stammen alsnog worden gedetecteerd in een PCR met *tcdA* als target.

4.1.3 Asymptotisch dragerschap

PCR heeft een hoge sensitiviteit en leent zich daardoor goed voor het uitsluiten van CDI. Volgens Jong *et al.* (2012) kan PCR echter geen onderscheid maken tussen CDI en asymptomatisch dragerschap. Iemand kan gekoloniseerd zijn met een *C. difficile* die in het bezit is van de toxinegenen, zonder dat deze daadwerkelijk toxinen produceert.

Kato *et al.* (2001) onderzochten zeven groepen van gezonde individuen, die de voorgaande vier weken geen antibiotica hadden gebruikt, op kolonisatie met *C. difficile*. De percentages dragerschap in de verschillende groepen varieerde van 4,2% tot 15,3%. Ryan *et al.* (2009) onderzochten asymptomatisch dragerschap van *C. difficile* in een verzorgingsinstelling voor ouderen. Het percentage *C. difficile*-kolonisatie bedroeg 10%, waarvan 7% *tcdA/tcdB*-positief was.

Volgens Crobach *et al.* (2009) kan een positieve *Clostridium*-PCR het best worden bevestigd met een tweede test, namelijk één die het vrije toxine in de feces detecteert.

4.1.4 Toepassing

Hoewel de sensitiviteit van de *Clostridium*-PCR (bepaald met de toxinesneltest als gouden standaard) geen 100% is, is de PCR gevoelig genoeg gebleken om 1 kopie per reactie te kunnen detecteren. Ook op alle andere punten van de analytische validatie heeft de PCR goede resultaten behaald.

Ondanks de lage sensitiviteit van de toxinesneltest, blijft deze test de snelste methode om CDI aan te tonen. Daarom zal de *Clostridium*-PCR gebruikt worden voor de monsters die negatief blijven in de sneltest. Omdat de PCR geen onderscheid maakt tussen toxineproducerende en niet-toxineproducerende stammen, zullen positieve PCR-monsters bevestigd moeten worden met behulp van een specifiekere test, bijvoorbeeld een enzyme immuno assay (EIA).

4.2 STEC

4.2.1 Gouden standaard

De klinische monsters voor de STEC-PCR uit het AZN werden voor het bepalen van de gouden standaard ingezet op CHROMagar *E. coli* O157. Het nadeel van deze agar is dat het geen onderscheid maakt tussen STEC en gewone *E. coli*. Ook is met deze methode alleen serotype O157 te detecteren. Dit is weliswaar het meest voorkomende STEC-serotype, maar er zijn nog genoeg andere Shigatoxineproducerende serotypen. Deze kweekplaat is dus niet bepaald de optimale gouden standaard, maar omdat er geen andere methoden voorhanden waren, was het de enige methode die we konden gebruiken.

4.2.2 Juistheid diepvriesstammen

Voor het bepalen van de juistheid van de STEC-PCR werden 15 ingevroren STEC-stammen gebruikt. Drie van deze stammen waren volgens onze PCR niet in het bezit van *Stx1* en/of *Stx2*. Om de uitkomst te bevestigen, werden deze drie stammen opgestuurd naar het UMCG. Daar werd op de stammen een PCR uitgevoerd met als targets *Stx1*, *Stx2* en *escV*. Het *escV*-gen ligt net als het *eae*-gen op de locus of enterocyte effacement (LEE)-regio. Volgens de PCR van het UMCG waren de drie stammen inderdaad *Stx*-negatief. Verder waren twee van deze stammen, die volgens Revco onder serotype O157 vielen, uiteindelijk O157-negatief. Omdat deze drie stammen vanwege hun determinatie in Revco zijn bewaard, is het de vraag hoe het komt dat de stammen uiteindelijk geen STEC's blijken te zijn. Een optie zou kunnen zijn dat deze stammen hun toxinegenen hebben verloren. Feng *et al.* (2001) beschrijven een *E. coli* O157-stam die beide *Stx*-genen zou zijn kwijtgeraakt. In een onderzoek van Mellmann *et al.* (2005) werd bij 210 HUS-patiënten zowel tijdens de acute fase als een aantal dagen later feces afgenomen voor onderzoek op STEC. Bij zeven patiënten werden bij de eerste afname *Stx*+/*eae*+ stammen gevonden, maar bij de tweede afname werden *Stx*-/*eae*+ stammen van dezelfde serotypen aangetroffen.

4.2.3 Variatiecoëfficiënt intertestvariatie

Om de intertestvariatie van een PCR te bepalen, wordt de variatiecoëfficiënt van de verschillende Ct-waarden berekend. Deze mag niet hoger zijn dan 5%. In de STEC-PCR komen de Ct-waarden bij *Stx2* van monster STEC43 echter uit op een variatiecoëfficiënt van 5,52%. Aanzienlijke verschillen tussen Ct-waarden zouden kunnen betekenen dat de PCR onnauwkeurig is. Het kan echter ook zijn dat de bacterie niet homogeen over de feces is

verdeeld, en dat zich daardoor bij de eerste test meer of minder bacteriecellen in de feces bevinden dan bij een volgende test.

4.2.4 Technische en klinische detectiegrens

De technische detectiegrens van de PCR wordt bepaald met een gekwantificeerde verdunningsreeks van DNA in Sigmawater. De klinische detectiegrens daarentegen wordt bepaald met een gekwantificeerde verdunningsreeks van bacteriecellen in feces. Bij de laatste bepaling gaan we ervan uit dat er tijdens de isolatie een aantal bacteriecellen verloren gaat. Daardoor zou de klinische detectiegrens van de PCR op een hoger aantal kopieën per reactie moeten liggen dan de technische grens, waarbij de isolatie buiten beschouwing wordt gelaten. Bij de validatie van de STEC-PCR bleek dit echter niet het geval te zijn. Een oorzaak hiervan kan zijn dat de bacteriestock niet goed is gemixt voor gebruik, waardoor de bacteriecellen niet homogeen waren verdeeld over de oplossing. Hierdoor kan de concentratie cellen voor de klinische verdunningsreeks hoger zijn geweest dan de concentratie die voor de technische verdunningsreeks is gebruikt.

4.2.5 Klinische monsters Lvl

Voor de validatie van de STEC-PCR ontvingen wij 22 bekend positieve fecesmonsters van het Lvl te Groningen. Daar was PCR uitgevoerd met als targets *Stx1*, *Stx2* en *escV*. De uitkomsten van onze PCR waren beduidend anders dan de uitkomsten van het Lvl, oftewel de gouden standaard. Niet alleen waren er grote verschillen tussen de Ct-waarden (tot 14 cycli verschil), maar ook bleef bij ons een aantal monsters (gedeeltelijk) negatief.

Een mogelijke oorzaak van deze uitkomst is het gebruik van het NucliSENS easyMAG extraction protocol (bioMérieux) door het Lvl. Dit is een andere isolatiemethode dan de methode die in het AZN wordt toegepast. Daarnaast gebruikt het Lvl andere hoeveelheden PCR-mixen en een ander PCR-programma. Omdat deze verschillende werkwijzen moeilijk te vergelijken zijn, kunnen ook de uitkomsten van de PCR's lastig met elkaar vergeleken worden. Desalniettemin kwamen de uitkomsten van 14 monsters op alle genen overeen met de gouden standaard.

Van de 8 monsters die in onze PCR negatief bleven, hadden 5 monsters Ct-waarden van 35 of hoger. Omdat vaak onduidelijk is of een patiënt met een positieve PCR-uitslag daadwerkelijk een risico vormt voor verspreiding van STEC, is een grens opgesteld wat betreft de Ct-waarde: alleen bij een Ct-waarde van 35 of lager wordt de patiënt ingelicht en wordt eventueel bron- en contactonderzoek gedaan (website RIVM 2). Bij hogere Ct-waarden kan de bacterie namelijk niet altijd gekweekt worden. In een onderzoek van van Duynhoven *et al.* (2008) was bij slechts 38% van de positieve STEC-PCR-monsters ook de bijbehorende kweek positief.

De 3 andere monsters die negatief waren gebleven in onze PCR, hadden volgens de gouden standaard Ct-waarden van 29. Om in onze PCR gemist te worden, zou er een verschil geweest moeten zijn van minimaal circa 10 cycli. Aangezien het grootste verschil tussen onze PCR en de gouden standaard 14 cycli was, zou dit het geval geweest kunnen zijn.

4.2.6 Toepassing

Omdat de CHROMagar *E. coli* O157 niet goed aansluit bij de STEC-PCR, en omdat de PCR-methode van het Lvl anders is dan die van ons, zijn de sensitiviteit en specificiteit van de STEC-PCR niet onder optimale omstandigheden te bepalen. Wel heeft de PCR op bijna alle punten van de analytische validatie goede resultaten behaald.

Van Duynhoven *et al.* (2008) onderzocht fecessamples van patiënten met (een verleden van) bloederige diarree en vond daarbij meer STEC-stammen dan *Shigella*- en *Yersinia*-stammen. Dit zou een goede reden zijn om (bloederige) feces standaard op STEC te testen, net als op SSYC.

4.3 Interne controle

De ABI StepOne is niet gekalibreerd voor de TAMRA-quencher van de IC4*-probe. Deze probe kan alsnog worden gebruikt door in het programma van de ABI StepOne geen quencher te selecteren. De ABI StepOne kan zo het signaal van de probe wel meten, maar rekent het niet helemaal goed uit. Hierdoor zijn de Ct-waarden in de ABI StepOne hoger (tussen 32,2 en 36,0) dan normaal (lager dan 33). Om te controleren of de Ct-waarden van IC4* wel goed zijn, werd de IC van een aantal klinische monsters getest op de ABI PRISM 7500. Met dit PCR-systeem kwamen de Ct-waarden tussen 30,5 en 32,1 te liggen. Tussen de Ct-waarden in de twee verschillende PCR-systemen zat een gemiddeld verschil van 3,2 cycli. Als we uitgaan van dit verschil, zal zelfs de hoogste Ct-waarde op de ABI StepOne (36,0) eigenlijk onder de 33 cycli liggen. Dit houdt in dat de monsters niet geremd zijn.

4.4 Conclusie

De *Clostridium*-PCR is succesvol opgezet, en zowel de *Clostridium*- als de STEC-PCR zijn met succes gevalideerd. De PCR's zijn voldoende sensitief en specifiek gebleken om toegepast te kunnen worden in de diagnostiek.

De *Clostridium*-PCR zal een goede aanvulling zijn op de ImmunoCard toxinesneltest: monsters die negatief zijn in de sneltest, zullen alsnog getest worden in de PCR. Omdat met PCR ook asymptomatische *C. difficile* wordt aangetoond, zal een positieve PCR-uitslag nog wel bevestigd moeten worden met een specifieke test. Dit zou een EIA kunnen zijn.

De STEC-PCR is een welkome vervanging voor de CHROMagar *E. coli* O157. In tegenstelling tot deze plaat zal de PCR specifiek de Shigatoxineproducerende *E. coli*'s detecteren. Ook zullen alle STEC-serotypen aangetoond kunnen worden. STEC zou kunnen worden toegevoegd aan de SSYC-PCR.

Bronnen

Artikelen

1. Alcalá L, Sánchez-Cambronero L, Catalán MP, Sánchez-Somolinos M, Peláez MT, Marín M, Bouza E. Comparison of three commercial methods for rapid detection of *Clostridium difficile* toxins A and B from fecal specimens. *Journal of Clinical Microbiology* 2008; 46 (11):3833-3835.
2. Bélanger SD, Boissinot M, Clairoux N, Picard FJ, Bergeron MG. Rapid detection of *Clostridium difficile* in feces by real-time PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 2003; 41 (2):730-734.
3. Berg RJ van den, Kuijper EJ, Bruijnesteijn van Coppenraet LES, Claas ECJ. Rapid diagnosis of toxinogenic *Clostridium difficile* in faecal samples with internally controlled real-time PCR. *Clin Microbiol Infect* 2006; 12:184-186.
4. Blanco M, Blanco JE, Mora A, Dahbi G, Alonso MP, González EA, Bernárdez MI, Blanco J. Serotypes, virulence genes, and intimin types of Shiga toxin (Verotoxin)-producing *Escherichia coli* isolates from cattle in Spain and identification of a new intimin variant gene (*eae-ξ*). *Journal of clinical microbiology* 2004; 42 (2):645-651.
5. Boerlin P, McEwen SA, Boerlin-Petzold F, Wilson JB, Johnson RP, Gyles CL. Associations between virulence factors of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and disease in humans. *Journal of clinical microbiology* 1999; 37 (3):497-503.
6. Bruins MJ, Verbeek E, Wallinga JA, Bruijnesteijn van Coppenraet LES, Kuijper EJ, Bloembergen P. Evaluation of three enzyme immunoassays and a loop-mediated isothermal amplification test for the laboratory diagnosis of I infection. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2012; 31:3035-3039.
7. Caprioli A, Morabito S, Brugère H, Oswald E. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: emerging issues on virulence and modes of transmission. *Vet. Res.* 2005; 36:289-311.
8. Crobach MJT, Dekkers OM, Wilcox MH, Kuijper EJ. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID): Data review and recommendations for diagnosing *Clostridium difficile*-infection (CDI). *Clin Microbiol Infect* 2009; 15:1053-1066.
9. Duynhoven YTHP van, Friesema IHM, Schuurman T, Roovers A, van Zwet AA, Sabbe LJM, van der Zwaluw WK, Notermans DW, Mulder B, van Hannen EJ, Heilmann FGC, Buiting A, Jansen R, Kooistra-Smid AMD. Prevalence, characterisation and clinical profiles of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in The Netherlands. *Clin Microbiol Infect* 2008; 14:437-445.
10. Feng P, Dey M, Abe A, Takeda T. Isogenic strain of *Escherichia coli* O157:H7 that has lost both Shiga toxin 1 and 2 genes. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 2001; 8 (4):711-717.
11. Geric B, Rupnik M, Gerding DN, Grabnar M, Johnson S. Distribution of *Clostridium difficile* variant toxinotypes and strains with binary toxin genes among clinical isolates in an American hospital. *J. Med. Microbiol.* 2004; 53:887-894.
12. Guarner F, Malagelada JR. Gut flora in health and disease. *Lancet* 2003; 361:512-519.
13. Jaeger JL, Acheson DWK. Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Current Infectious Disease Reports* 2000; 2:61-67.

14. Jong E de, de Jong AS, Bartels CJM, van der Rijt-van den Biggelaar C, Melchers WJG, Sturm PDJ. Clinical and laboratory evaluation of a real-time PCR for *Clostridium difficile* toxin A and B genes. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2012; 31:2219-2225.
15. Kato H, Kita H, Karasawa T, Maegawa T, Koino Y, Takakuwa H, Saikai T, Kobayashi K, Yamagishi T, Nakamura S. Colonisation and transmission of *Clostridium difficile* in healthy individuals examined by PCR ribotyping and pulsed-field gel electrophoresis. *J. Med. Microbiol.* 2001; 50:720-727.
16. Kuehne SA, Cartman ST, Minton NP. Both, toxin A and toxin B, are important in *Clostridium difficile* infection. *Gut Microbes* 2011; 2 (4):252-255.
17. Loukiadis E, K  rour  dan M, Beutin L, Oswald E, Brug  re H. Characterization of Shiga toxin gene (stx)-positive and intimin gene (eae)-positive *Escherichia coli* isolates from wastewater of slaughterhouses in France. *Applied and environmental microbiology* 2006; 72(5):3245-3251.
18. Lyster, Saum, MacDonald, Wilkins. Effects of *Clostridium difficile* toxins given intragastrically to animals. *Infect. Immun.* 1985; 47:349-352.
19. Mellmann A, Bielaszewska M, Zimmerhackl LB, Prager R, Harmsen D, Tsch  pe H, Karch H. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* in human infection: in vivo evolution of a bacterial pathogen. *Clinical Infectious Diseases* 2005; 41:785-92.
20. Persson S, Torpdahl M, Olsen KEP. New multiplex PCR method for the detection of *Clostridium difficile* toxin A (tcdA) and toxin B (tcdB) and the binary toxin (cdtA / cdtB) genes applied to a Danish strain collection. *Clin Microbiol Infect* 2008; 14:1057-1064.
21. Pituch, H, van den Braak N, van Leeuwen W, van Belkum A, Martirosian G, Obuch-Woszczatynski P, Luczak M, Meisel-Mikolajczyk F. Clonal dissemination of a toxin-A-negative/toxin-B-positive *Clostridium difficile* strain from patients with antibiotic-associated diarrhea in Poland. *Clin. Microbiol. Infect.* 2001; 7:442-446.
22. Riegler M, Sedivy R, Pothoulakis C, Hamilton G, Zacheri J, Bischof G, Cosentini E, Feil W, Schiessel R, LaMont JT, Wenzi E. *Clostridium difficile* toxin B is more potent than toxin A in damaging human colonic epithelium *in vitro*. *J. Clin. Invest.* 1995; 95:2004-2011.
23. Ryan J, Murphy C, Twomey C, Paul Ross R, Rea MC, MacSharry J, Sheil B, Shanahan F. Asymptomatic carriage of *Clostridium difficile* in an Irish continuing care institution for the elderly: prevalence and characteristics. *Ir J Med Sci* 2010; 179:245-250.
24. Samra Z, Talmor S, Bahar J. High prevalence of toxin A-negative toxin B-positive *Clostridium difficile* in hospitalized patients with gastrointestinal disease. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2002; 43:189-192.
25. Sears L. A dynamic partnership: celebrating our gut flora. *Anaerobe* 2005; 11:247-251.
26. Sloan LM, Duresko BJ, Gustafson DR, Rosenblatt JE. Comparison of real-time PCR for detection of the *tcdC* gene with four toxin immunoassays and culture in diagnosis of *Clostridium difficile* infection. *Journal of Clinical Microbiology* 200; 46 (6):1996-2001.

Boeken

Versalovic, Carroll, Funke, Jorgensen, Landry, Warnock. *Manual of clinical microbiology*, 10th edition, 2011.

Websites

CDC: <http://www.cdc.gov/ecoli/general/index.html>

Docstoc: <http://www.docstoc.com/docs/109598853/Buffer-formed-stool>

Emedicine: <http://emedicine.medscape.com/article/186458-overview>

Rijksoverheid: <http://www.rijksoverheid.nl/onderwerpen/infectieziekten/ehc-bacterie>

RIVM 1:

[http://www.rivm.nl/Bibliotheek/Professioneel Praktisch/Richtlijnen/Infectieziekten/LCI richtlijnen/LCI richtlijn Shigatoxineproducerende E coli STEC infectie](http://www.rivm.nl/Bibliotheek/Professioneel_Praktisch/Richtlijnen/Infectieziekten/LCI_richtlijnen/LCI_richtlijn_Shigatoxineproducerende_E_coli_STEC_infectie)

RIVM 2:

[http://www.rivm.nl/Bibliotheek/Algemeen Actueel/Uitgaven/Infectieziekten Bulletin/Jaargang 23/Mei 2012/Inhoud mei 2012/Gebrek aan uniformiteit bij meldingen van Shigatoxineproducerende Escherichia coli en Shigella aan en door GGDen](http://www.rivm.nl/Bibliotheek/Algemeen_Actueel/Uitgaven/Infectieziekten_Bulletin/Jaargang_23/Mei_2012/Inhoud_mei_2012/Gebrek_aan_uniformiteit_bij_meldingen_van_Shigatoxineproducerende_Escherichia_coli_en_Shigella_aan_en_door_GGDen)

SOP's

1. DNA-Interne controle (Cyano) real-time PCR. Code: MB-ANL-DIC-01
2. Huishoudelijk reglement werken in PCR-ruimten. Code: MB-PRC-HUI-05
3. Voorbewerking voor DNA-isolatie uit feces. Code: BA-BY1-FEC-01

Afbeeldingen

Figuur 1.1:

<http://atlas.microumftgm.ro/bacteriologie/bactsp/clostridium.php>

Figuur 1.2:

<http://www.somagen.com/products/immunocard-toxins-ab/>

Figuur 1.3:

<http://www.microbiologyinpictures.com/bacteria%20photos/escherichia%20coli%20photos/escherichia%20coli%2002.html>

Figuur 1.4:

<http://store-for-long.blogspot.nl/2010/07/self-drawn-explanatory-diagram-of.html>

Figuur 1.5:

http://www.asuragen.com/Services/services/gene_expression/ab_tagman.aspx

Figuur 2.1:

[http://www.chromagar.com/fiche-produit.php?PARAM NAVIGATION=industrial&PDT ID=26&PHPSESSID=441354f6c5764ff65ee04b64290746da](http://www.chromagar.com/fiche-produit.php?PARAM_NAVIGATION=industrial&PDT_ID=26&PHPSESSID=441354f6c5764ff65ee04b64290746da)

Figuur 2.2, 2.3 en 2.4:

<http://www.roche-applied-science.com>

Figuur 2.5:

<http://www.labexchange.com/en/buy-devices/d/?sn=19778>

Bijlage 1: monsternummers

C. difficile

Toxinesneltest-positieve monsters

CDT1: B951420	AZN
CDT2: 12000 00198	AZN
CDT3: B791415	Diak
CDT4: B795242	Diak
CDT5: 12000 04956	AZN
CDT6: 12000 04990	AZN
CDT7: 12000 16657	AZN
CDT8: 12000 20382	AZN
CDT9: B119940	Hofpoort
CDT10: 12000 21799	AZN
CDT11: 12000 24199	AZN

Klinische monsters AZN met de toxinesneltest als gouden standaard

1. 12000 03594	29. 12000 07762	57. 12000 09684
2. 12000 04336	30. 12000 07764	58. 12000 11654
3. 12000 04390	31. 12000 07844	59. 12000 12044
4. 12000 04480	32. 12000 07886	60. 12000 12082
5. 12000 04549	33. 12000 07996	61. 12000 12186
6. 12000 05272	34. 12000 08098	62. 12000 12524
7. 12000 05299	35. 12000 08141	63. 12000 12532
8. 12000 05305	36. 12000 08995	64. 12000 12624
9. 1200005557	37. 12000 09497	65. 12000 13017
10. 12000 05620	38. 12000 11036	66. 12000 13048
11. 12000 05706	39. 12000 11155	67. 12000 13079
12. 12000 05744	40. 12000 11387	68. 12000 13097
13. 12000 05827	41. 12000 10660	69. 12000 13385
14. 12000 06117	42. 12000 11852	70. 12000 13603
15. 12000 06173	43. 12000 08585	71. 12000 13607
16. 12000 05276	44. 12000 09250	72. 12000 14049
17. 12000 05283	45. 12000 09332	73. 12000 14070
18. 12000 05571	46. 12000 09910	74. 12000 14437
19. 12000 06113	47. 12000 08218	75. 12000 14440
20. 12000 06118	48. 12000 10203	76. 12000 14660
21. 12000 06623	49. 12000 10383	77. 12000 14738
22. 12000 04859	50. 12000 10419	78. 12000 14741
23. 12000 07301	51. 12000 10774	79. 12000 14405
24. 12000 07306	52. 12000 10805	80. 12000 14443
25. 12000 07308	53. 12000 11001	81. 12000 14647
26. 12000 07456	54. 12000 10659	82. 12000 15059
27. 12000 07634	55. 12000 10804	83. 12000 15178
28. 12000 07735	56. 12000 09675	84. 12000 15339

85. 12000 15351	93. 12000 16654	101. 12000 17032
86. 12000 15597	94. 12000 16655	102. 12000 17039
87. 12000 15819	95. 12000 16734	103. 12000 17048
88. 12000 15225	96. 12000 09230	104. 12000 17049
89. 12000 16087	97. 12000 14035	105. 12000 17053
90. 12000 16366	98. 12000 15129	106. 12000 17054
91. 12000 16409	99. 12000 16572	107. 12000 17178
92. 12000 16569	100. 12000 17030	108. B794760 (Diak)

STEC

Klinische monsters AZN met kweek als gouden standaard

1. 12000 08218	12. 12000 12776	23. 12000 14057
2. 12000 09910	13. 12000 13034	24. 12000 14104
3. 12000 11008	14. 12000 13078	25. 12000 14117
4. 12000 11359	15. 12000 13080	26. 12000 14359
5. 12000 10446	16. 12000 13083	27. 12000 14441
6. 12000 09939	17. 12000 13096	28. 12000 14503
7. 12000 12434	18. 12000 13268	29. 12000 14630
8. 12000 12535	19. 12000 13610	30. 12000 14645
9. 12000 12573	20. 12000 13008	31. 12000 14659
10. 12000 12633	21. 12000 13041	
11. 12000 12698	22. 12000 13247	

Klinische monsters Lvl Groningen met PCR als gouden standaard

32. 12033107
33. 12032907
34. 12030334
35. 12035412
36. 12034860
37. 12051488
38. 12062960
39. 12062615
40. 12074042
41. 12181977
42. 12190327
43. 12191745
44. 12132630
45. 12135162
46. 12131991
47. 12135090
48. 12141229
49. 12143264
50. 12143257
51. 12141809
52. 12140530
53. 12164634

