



# Labinfo

Informatieblad voor de erkende laboratoria voedselveiligheid

- 4 Trichinella testen en kwaliteitscontrole in België
- 7 Bepaling van de levensvatbaarheid van aardappelcysteaaltjes (Globodera rostochiensis en G. pallida) door middel van trehalose
- 12 Voedingssupplement op basis van rodegistrijst Gezondheidsvoordelen en -risico's
- 15 Nieuwe workflow voor detectie van niet-toegelaten GGO's met behulp van Next-Generation-Sequencing
- 17 Onderzoek van voedseluitbraken en moleculaire typering: hoge diversiteit aan Staphylococcus aureus stammen en belang van toxine detectie.
- 29 Workshops & Symposia



### LabInfo

Informatieblad voor de erkende laboratoria voedselveiligheid

### Redactiegroep

Luc Bollen, Dirk Courtheyn, Fanny Di Silvestro, Brigitte Pochet, Ely Harnie, Sandrine Léonard, Alain Dubois, Geert Janssens.

### Auteurs van dit nummer

Bert Matthijs, Marleen Claes, Nicole Damme, Nicole Viane, Emmanuel Tangni, Marie-Alice Fraiture, Nina Papazova, Nancy Roosens, Sarah Denayer, Laurence Delbrassinne, Nadine Botteldoorn.

### Vertaling

Vertaaldienst van het Agentschap  
Redactiegroep

### Foto's en illustraties

Aangebracht door de laboratoria

### Vormgeving

Gert Van Kerckhove

### Redactieadres

LabInfo  
p.a. L. Bollen  
FAVV  
AC-Kruidtuin – Food Safety Center  
4de verdieping, bureel K04/120220  
Kruidtuinlaan 55  
1000 Brussel  
Tel.: 02.211.87.34  
luc.bollen@afsca-favv.be

Beste lezer,

Het is al weer meer dan twaalf maanden geleden dat de laatste editie van Labinfo verschenen is. Zoals u in de pers heeft kunnen vaststellen, was deze periode vol gebeurtenissen voor het Agentschap. In de zomer van vorig jaar hebben we de fipronilcrisis gekend, dit voorjaar de zaak Veviba... Beide incidenten hebben enigszins ons dagelijks werk verstoord. Maar in deze periode die voor het Agentschap nogal kritiek was, konden wij rekenen op de steun en medewerking van verschillende NRL's en privélaboratoria. Ik wens alle betrokkenen daarvoor bij deze van harte te bedanken.

Ondertussen is onze redacteur, Dirk Courtheyn, eind 2017 met welverdiend pensioen gegaan. Nadat Dirk in het labo van Gentbrugge gewerkt heeft, waar hij onder andere directeur was, kwam hij in het hoofdbestuur van DG Laboratoria werken. Onder zijn vele taken, kreeg Dirk de verantwoordelijkheid voor "Labinfo", waarvan hij de redactie op zich nam vanaf het eerste nummer in oktober 2008 tot het nummer 16 dat in april 2017 verscheen. Ik dank hem hiervoor en wens hem veel geluk in deze nieuwe fase van zijn leven.

U weet ook dat onze regering maatregelen getroffen heeft om de openbare schuld te verlagen en dat ze bijgevolg aan de federale besturen vraagt om inspanningen te leveren om hun werkingskosten en personeelsbestand te verminderen. In dit kader hebben wij de beslissing moeten nemen om Labinfo slechts eenmaal per jaar te publiceren en dit enkel in het Engels. Dit nummer is dus het laatste nummer dat in 3 talen verschijnt.

In dit nummer worden zeer diverse onderwerpen behandeld, zoals de Trichinella-tests in de erkende labo's, de levensvatbaarheid van cystenaaltjes in aardappelen, het risico van citrine, een toxine dat aanwezig kan zijn in rodegistrijst, de opsporing van niet-toegelaten ggo's gebaseerd op de Next - Generation - Sequencing en de voedseltoxiciteitsinfecties te wijten aan enterotoxines van Staphylococcus aureus.

Ik wens u veel leesgenot met deze zeventiende editie van Labinfo.

*Bert Matthijs*  
*Directeur generaal DG Laboratoria*

# Trichinella testen en kwaliteitscontrole in België

*Marleen Claes*

*Nationaal Referentielaboratorium voor Trichinella-onderzoek (NRLT),  
Instituut voor Tropische Geneeskunde, Nationalestraat 155, 2000 Antwerpen*

## Introductie

Trichinella spp. is een parasiet die wereldwijd voorkomt, en infectie kan veroorzaken indien onvoldoende verhit, besmet vlees wordt gegeten. Een infectie met Trichinella-larven kan bij de mens serieuze gezondheidsklachten tot gevolg hebben.

Daarom bestaat er in Europa de verplichting om het vlees voor menselijke consumptie, indien afkomstig van varken, paard en everzwijn, te testen vooraleer het op de markt komt.

Vanuit Europa werd het EU Referentie Lab (EURL) opgericht, en heeft elke lidstaat de verplichting om een Nationaal Referentie Lab (NRL) te voorzien.

Het EURL heeft, via het organiseren van jaarlijkse workshops, een echt netwerk van Europese NRL's gecreëerd. Tijdens deze workshop wordt er samengewerkt aan de organisatie van opleidingen en interlaboratoriumtesten, en de aanpak van bepaalde zaken zoals minimale vereisten voor de staalname, laboratoriumcontroles, richtlijnen voor interlaboratoriumtesten, minimale vereisten voor een kwaliteitsvol laboratorium worden besproken.

## Belgische evolutie:

### Opleiding:

In 1999 werden er voor de eerste maal vier vrijblijvende studiedagen georganiseerd; in 2000 gevolgd door een studienamiddag met 31 deelnemende laboratoria. Er werd opnieuw een studienamiddag ingericht in 2006, waaraan 12 laboratoria deelnamen.

Sinds 2007 wordt er jaarlijks een 'Communicatiegroep' ingericht - een vergadering georganiseerd door het NRL in samenwerking met het FAVV - en waaraan elk erkend labo verplicht moet deelnemen. De communicatie in beide richtingen wordt gestimuleerd. Zo is dit een uitgelezen moment om vragen te stellen, extra uitleg te geven, en nieuwigheden voor te stellen.

### **Interlaboratoriumtesten:**

Deze worden, met verplichte en algemene deelname, georganiseerd sinds 2007. Eerst werd gebruik gemaakt van bevroren stalen om de parasieten te desactiveren, om alle infectiegevaar en mogelijke introductie van de parasiet in het milieu uit te sluiten. Sinds 2011 worden gekoelde stalen gebruikt, waaraan een gekend aantal levende larven werd toegevoegd. Over de jaren heen werden ook de criteria geleidelijk aan strenger, en het aantal toegevoegde larven lager.

Niet-geaccrediteerde laboratoria namen tweemaal per jaar deel aan deze ringtesten, geaccrediteerde laboratoria éénmaal per jaar. Bij slecht presteren werd er gevolg gegeven door het FAVV.

Recent neemt elk laboratorium nog éénmaal per jaar deel, doch de geaccrediteerde laboratoria ontvangen één pakket met stalen, en de niet-geaccrediteerde laboratoria ontvangen een pakket per uitvoerder van de test.

### **Training**

In 2008 werd, voor iedereen die niet goed presteerde in de interlaboratoriumtest van 2007 (de eerste algemene ringtest), intensief extra training gegeven, en dit werd gevolgd door twee extra rondzendingen. Sinds 2008 wordt er een praktische opleiding in het NRL georganiseerd, op vraag van de laboratoria. Deze praktische opleidingen worden sinds 2014 gegroepeerd in vier opleidingen per jaar. Elk nieuw personeelslid moet deze opleiding gevolgd hebben, vooraleer hij of zij zelfstandig mag werken. De training bestaat onder andere uit de vereisten voor het materiaal en de reagentia, de kritische controlepunten (ccp's), demonstratie en hands-on oefeningen met besmet vlees. Daarnaast worden er een door het NRL geproduceerde CD-rom met bespreking van de verschillende stappen van de test en gefixeerde referentielarven meegegeven aan elk laboratorium.

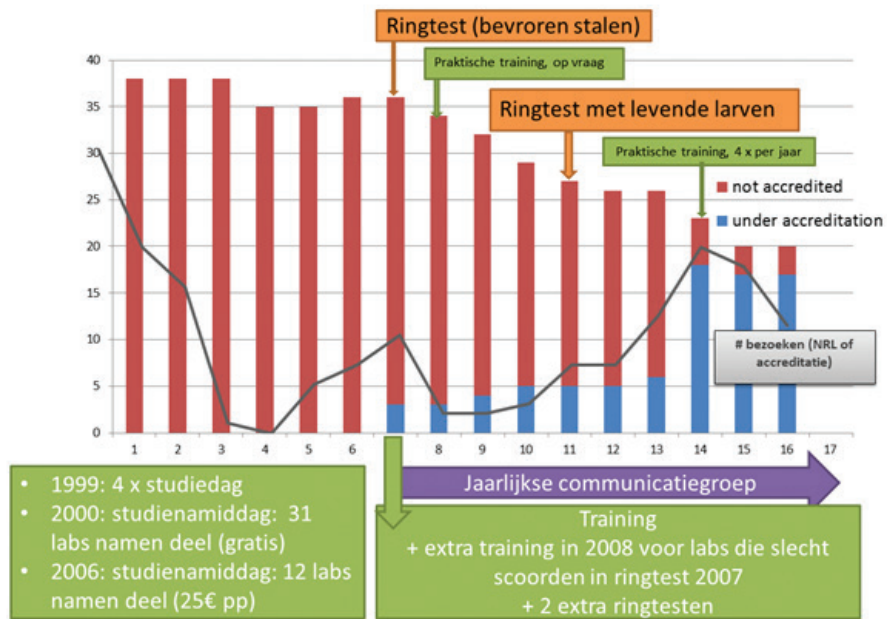
Adviserende bezoeken aan de laboratoria werden doorheen de tijd vervangen door controlebezoeken met checklist, of bezoeken in het kader van Belac-audits voor ISO17025.

### **Conclusie:**

Het aantal Belgische laboratoria is gedaald, maar de kwaliteit van de overgebleven laboratoria is fors gestegen. Er wordt met degelijke apparatuur en geschikte reagentia gewerkt, en met goed opgeleid personeel.



## Aantal Belgische *Trichinella*-labs, 2001-2016



[nrl@itg.be](mailto:nrl@itg.be)

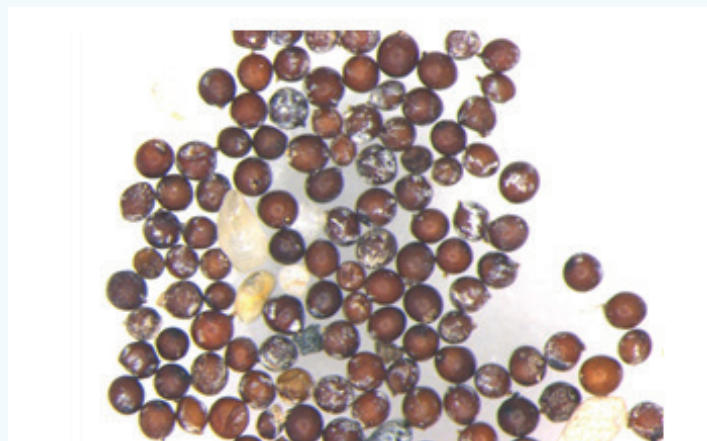
# Bepaling van de levensvatbaarheid van aardappelcysteaaltjes (*Globodera rostochiensis* en *G. pallida*) door middel van trehalose

Nicole Damme en Nicole Viaene

Instituut voor Landbouw-, Visserij- en Voedingsonderzoek  
Diagnosecentrum voor Planten

## Inleiding

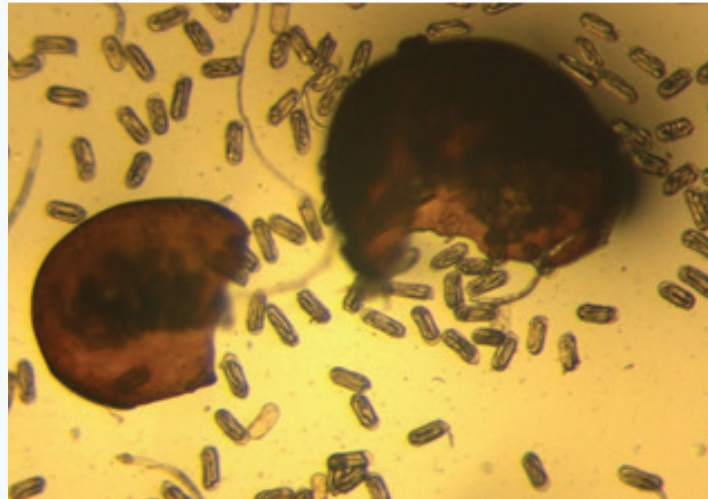
Aardappelcysteaaltjes, *Globodera rostochiensis* en *G. pallida*, vormen een ernstige bedreiging voor de aardappelteelt en zijn quarantaine-organismen in heel wat landen, waaronder ook België. Ingekapseld in een cyste, eigenlijk het geënkysteerde lichaam van het vrouwtje, kan het aaltje jaren overleven in de bodem. De cyste bevat eitjes, gemiddeld een 250-tal bij nieuwe cysten, waaruit juvenielen kunnen ontluiken. Deze cysten kunnen meerdere jaren levensvatbaar blijven, zelfs in de afwezigheid van een geschikte waardplant, wat bij ons vnl. aardappel is. De levensvatbaarheid kennen van aardappelcysteaaltjes is belangrijk aangezien cysten die leeg zijn of dode eitjes bevatten toch nog jarenlang in de bodem kunnen aangetroffen worden vermits de cyste zelf (het omhulsel) zeer traag afbreekt. Dergelijke niet-levensvatbare cysten vormen echter geen bedreiging voor de aardappelplant.



Figuur 1: Cysten en gelijkaardig inert materiaal na extractie uit grond



Voorafgaand aan de teelt door het FAVV gescreend op de aanwezigheid van aardappelcysten door het nemen van een grondmonster. Bij het aantreffen van aardappelcysten in het monster wordt op het ILVO bepaald of deze cysten nog levensvatbaar zijn.



*Figuur 2: Open aardappelcyste met eitjes en enkele juvenielen*

Tot op heden wordt de levensvatbaarheid van de aardappelcysten in het Diagnosecentrum voor Planten (ILVO) bepaald door middel van de ontluikingstest waarbij wordt nagegaan of de juvenielen uit de eitjes komen en dus levensvatbaar zijn. Dit gebeurt door de cysten te brengen in het wortel-exsudaat van aardappelplanten, de natuurlijke stimulans voor het ontluiken van deze aaltjes. Dit exsudaat "lokt" als het ware de juvenielen uit de eitjes; de ontluikingstest wordt ook wel de loktoets genoemd. Deze techniek is zeer betrouwbaar voor cysten die reeds een koude periode (de winter) hebben doorgebracht, maar heeft als nadeel dat het ontluiken niet onmiddellijk gebeurt en meerder weken kan duren. Om de doorlooptijd van de test te beperken wordt nu "maar" tot 3 weken opgevolgd of juvenielen uit de cysten zwemmen. Indien dit niet is gebeurd worden de cysten geplet om de eitjes zichtbaar te maken en wordt visueel beoordeeld of deze al dan niet levend zijn. Deze visuele test kan echter subjectief zijn, vooral wanneer het onderscheid tussen leven en dood niet zo duidelijk is. Het is mogelijk dat levensvatbare juvenielen niet ontluiken omdat ze nog geen koude periode hebben doorgemaakt (pas gevormde cysten, staalname direct na aardappelteelt) of gewoon omdat ze traag zijn en meer dan 3 weken nodig hebben om te ontluiken. In deze gevallen is de visuele beoordeling de enige test voor levensvatbaarheid.



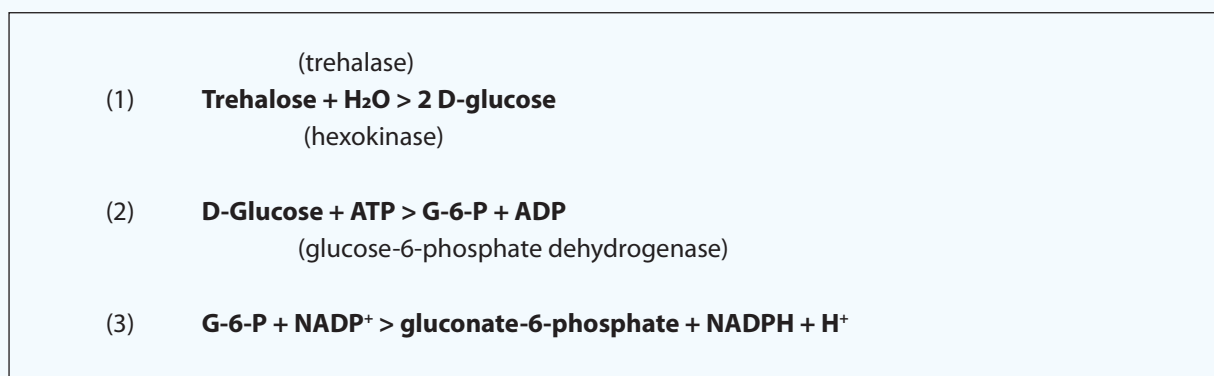
## Levensvatbaarheid op basis van trehalose

### Principe

Binnen het ei kan het juveniele stadium jaren in een gedeeltelijke gedehydrateerde toestand overleven omdat het omgeven is door perivitelline vloeistof welke trehalose bevat. Trehalose ( $\alpha$ -D-glucopyranosyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside) is een zeer stabiel disacharide welke de membraanintegriteit bewaart bij dehydratatie. Bij het afsterven van het juveniel binnenin het ei gaat de selectieve permeabiliteit van het celmembraan verloren, wat resulteert in diffusie van het trehalose uit het ei en verlies van dit disacharide. Bijgevolg is de aanwezigheid van trehalose in het ei een indicatie van levende eitjes. Door de aanwezigheid van trehalose in de eitjes van cysten te bepalen kan dus gezegd worden of de cyste nog levend is.

### Methode

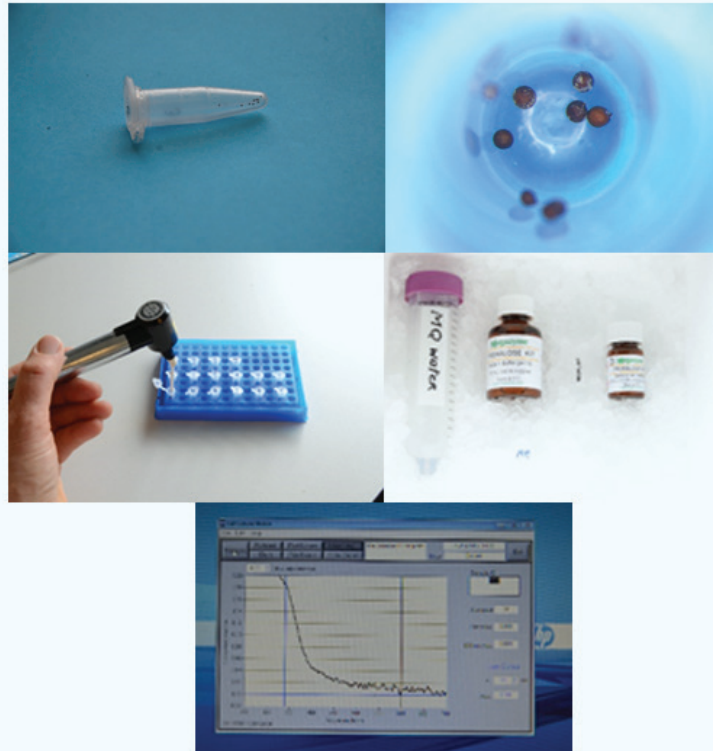
Om na te gaan of een of meerdere cysten nog levensvatbare eitjes bevatten worden ze voorzichtig geplet in een buisje (type Eppendorf) om de eitjes vrij te stellen. De bepaling van de concentratie van trehalose gebeurt onrechtstreeks. Eerst wordt het enzym trehalase toegevoegd zodat door de hydrolyse van trehalose 2 eenheden D-glucose ontstaan. Vervolgens wordt D-glucose gefosforyleerd in de aanwezigheid van hexokinase en ATP tot glucose-6-fosfaat. Dit laatste wordt door glucose-6-fosfaat dehydrogenase en NADP<sup>+</sup> geoxideerd tot gluconaat-6-fosfaat en NADPH. De concentratie van dit NADPH wordt dan spectrofotometrisch (Nanodrop) gemeten bij een golflengte van 340 nm. Indien deze hoeveelheid boven een bepaalde drempelwaarde gaat duidt dit erop dat er trehalose aanwezig was en de cysten dus levensvatbaar waren. De drempelwaarde stemt overeen met 20 eitjes, dit betekent dat lagere aantallen eitjes niet altijd worden gedetecteerd. De test is oorspronkelijk ontwikkeld in Nederland (van den Elsen et al., 2012) en werd verder op punt gesteld in het kader van een ILVO-doctoraatsonderzoek over de overleving van aardappelcysten (Ebrahimi et al., 2015). De test is ook opgenomen in het EPPO Diagnostisch Protocol voor Globodera (OEPP, EPPO 2015).



Figuur 3: Schema van de enzymatische reacties bij de bepaling van de aanwezigheid van trehalose, wat wijst op levende eitjes.



Wel moet er op gelet worden dat het geen monster betreft van recent ontsmette grond, omdat de afbraak van trehalose in de gedode eitjes nog niet volledig is gebeurd, wat vals positieve resultaten kan opleveren (dode eitjes die als levend worden bestempeld).



*Figuur 4 : Cysten in Eppendorfe (zij- en bovenaanzicht), crushen van de cysten, bij te voegen producten (op ijs), aflezen resultaten van de spectrofotometer.*

## Trehalosestest versus ontluikingstest

De trehalosestest biedt een snel antwoord op de vraag of er nog leven aanwezig is in aardappelcysten: de analyse kan binnen een dag zijn afgerond. De ontluikingstest kan wel 3 weken duren en visuele bepaling kan in bepaalde gevallen subjectief zijn, zeker in geval eitjes als dood worden beoordeeld. Daartegenover staat dat de trehalosestest minder gevoelig is dan de ontluikingstest: met de trehalosestest kunnen levensvatbare eitjes niet altijd gedetecteerd worden als hun aantal minder dan 20 bedraagt, terwijl we bij de ontluikingstest de levende juvenielen zien en er dus reeds detectie is vanaf 1 levende nematode. Een detectielimiet van "maar" 20 levende eitjes per grondmonster, dat in de meeste gevallen een hectare vertegenwoordigt, kan echter aanvaardbaar zijn als daartegenover staat dat de resultaten van de test heel vlug bekend zijn. Een minpunt van de trehalosestest is de lagere betrouwbaarheid voor cysten afkomstig van recent ontsmette grond (mogelijk vals positieve resultaten). Ook de prijs ligt iets hoger: de trehalosestest kost 90 euro, terwijl men voor de loktoets 70 euro betaalt.

### Referenties

- Beniers, J.E. et al. 2014. Quantification of viable eggs of the potato cyst nematodes (*Globodera* spp.) using either trehalose or RNA-specific Real-Time PCR. *Nematology*, 1219-1232.
- Ebrahimi, N. et al. 2015. Optimizing Trehalose-Based Quantification of Live Eggs in Potato Cyst Nematodes (*Globodera rostochiensis* and *G. pallida*). *Plant Disease*, 947-953.
- OEPP/EPPO (2013) EPPO Standard PM 7/40 (3) *Globodera rostochiensis* and *Globodera pallida*. EPPO Bulletin 43, 119–138.
- van den Elsen, S. et al. 2012. A rapid, sensitive and cost-efficient assay to estimate viability of potato cyst nematodes. *Phytopathology* 102, 140-146



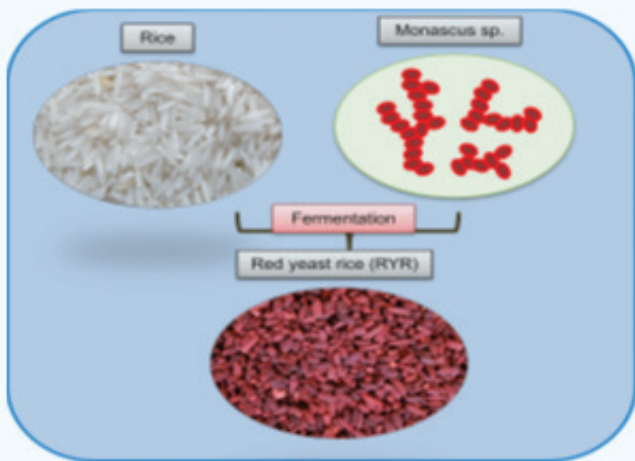
# Voedingssupplement op basis van rodegistrijst

## Gezondheidsvoordelen en -risico's

Tangni Emmanuel K. (emmanuel.tangni@coda-cerva.be)

Centrum voor Onderzoek in Diergeneeskunde en Agrochemie (CODA-CERVA)  
Operationele Directie Chemische Veiligheid van de Voedselketen,  
Dienst Toxines en Natuurlijke Bestanddelen,  
Nationaal Referentielaboratorium Mycotoxines, Plantentoxines en Mariene Toxines  
Leuvensesteenweg 17, 3080 Tervuren, België

Rodegistrijst wordt bereid door de vaste fermentatie van rijst (*Oryzae* sp.) die is beënt met de schimmel *Monascus purpureus* om zo verbindingen te produceren die de cholesterolproductie inhiberen en de cholesterolgehalten op een gezond niveau houden. Dit product wordt in bepaalde Aziatische landen al duizenden jaren gebruikt als een natuurlijk voedingssupplement en is tegenwoordig ook wereldwijd aanvaard voor dit doeleinde. Rodegistrijst is verkrijgbaar in de vorm van poeder dat wordt gebruikt in afgewogen kleine hoeveelheden of als voedingssupplement dat in dosisvormen, zoals capsules, tabletten of pillen, op de markt wordt gebracht. Deze voedingssupplementen worden ofwel in kleinhandelszaken (apotheek, drogisterij) of via het internet aangekocht.



Behalve rijstzetmeel en suiker, bestaat rodegistrijst uit een conglomeraat van bioactieve verbindingen, zoals polyketiden (monacoline K, vergelijkbaar met lovastatine), fytosterolen, onverzadigde vetzuren, pigmenten (monascorubrine, rubropunctatine, ankaflavine, rubropunctamine, monascorubramine, monascin) en gecondenseerde tannines.

Rodegistrijst bevordert de spijsvertering en de bloedcirculatie. Rodegistrijst wordt gepromoot als een voedingssupplement dat de volksgezondheid bevordert door het risico op hartziekten te reduceren bij personen met een matig verhoogd cholesterolniveau. Naast de voornaamste antilipemische eigenschap, worden ook andere gezondheidsbevorderende eigenschappen zoals anticarcinogene, antiglycemische en osteoprotectieve eigenschappen toegeschreven aan dit voedingssupplement, wat bijkomend onderzoek vereist. Om consistente gezondheidsvoordelen in kaart te brengen en tot een volledig overzicht te komen, zijn bijkomende epidemiologische studies vereist.

Rodegistrijst wordt ook gebruikt om de organoleptische eigenschappen (bijvoorbeeld de kleur) van vlees te verbeteren. Naast het gebruik als rode kleurstof, doet rodegistrijst ook dienst als bewaar- en smaakstof.



Behalve de klassieke cholesterolverlagende verbinding, ontstaat tijdens de fermentatie van de rodegistrijst ook een natuurlijke mycotoxine citrinine genaamd die aanzienlijk kan bijdragen tot de biobeschikbaarheid van citrinine in het spijsverteringskanaal. Citrinine is een nefrotoxische stof en wordt op basis van de beschikbare data beschouwd als een genotoxische en carcinogene stof. Er is een overvloed aan bewijs van de globale contaminatie van rodegistrijst met citrinine. In de handel verkrijgbare voedingssupplementen, zoals rodegistrijst in capsules, zijn besmet met concentraties gaande van 2 tot 114  $\mu\text{g}$  citrinine/capsule. In België worden vaak lage citrininegehaltenes aangetroffen in voedingssupplementen op basis van rodegistrijst. Occasioneel worden hoge citrininegehaltenes (tot 121mg/kg) aangetroffen in buitenlandse monsters van rodegistrijst (boven de wettelijke limiet van 2000  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , Verordening van de Commissie EG/212/2014). De meest recente wetenschappelijke informatie die werd beoordeeld door de European Food Safety Authority (EFSA) geeft duidelijk aan dat rodegistrijst het product is waarin citrininebesmetting het meest voorkomt. Van de 37 onderzochte monsters, werd citrinine gekwantificeerd in 24 voedingssupplementen die zijn afgeleid van rodegistrijst aan concentraties die variëren van 10 tot 3597  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Slechts 13 monsters bevatten sporenniveaus die onder de kwantificatielimiet (10  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) lagen. Niettegenstaande dat op het etiket werd aangegeven dat de monsters uit Europa kwamen, is het niet duidelijk of de grondstof oorspronkelijk uit Europa kwam of daar werd verwerkt. Er werd opgemerkt dat de citrininegehaltenes in de 3 monsters de wettelijke Europese limiet



overschreden. Daarom eiste de EFSA dat rodegistrijst en verwerkte voedingssupplementen op basis van rodegistrijst werden opgevolgd wat betreft het beheer van de risico's voor de volksgezondheid. Naar aanleiding van deze opvolging achtte de EFSA het noodzakelijk en wenselijk om het huidige maximumniveau van 2000 µg/kg in voedingssupplementen op basis van rodegistrijst te herzien. Het European Standardization Committee (CEN) heeft via CEN/TC275 WG5 een mandaat gelanceerd voor de standaardisatie van de analytische methode om het citrininegehalte in levensmiddelen te bepalen, wat in de toekomst zal toelaten om data te verzamelen voor de consumer exposure assessment.

De monacolinedosering, het citrininegehalte en de interactie met andere geneesmiddelen zijn kritische factoren voor de therapeutische doeltreffendheid van rodegistrijst en voedingssupplementen op basis van rodegistrijst.

#### **Meer lezen:**

- Commission regulation No. 212/2014 amending regulation (EC) No 1881/2006 as regards maximum levels of the contaminant citrinin in food supplements based rice fermented with red yeast *Monascus purpureus*. Official Journal of the European Union L 67: 3-4.
- EFSA European Food safety Authority 2012. Scientific Opinion on the risks for public and animal health related to the presence of citrinin in food and feed. EFSA J. 10(3):2605.
- Kiebooms JAL, Huybrechts B, Thiry C, Tangni EK, Callebaut A (2016) A quantitative ultrahigh performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for citrinin and ochratoxin A detection in food, feed and red yeast rice food supplements. World Journal Mycotoxin 9(3):343-352.

[emmanuel.tangni@coda-cerva.be](mailto:emmanuel.tangni@coda-cerva.be)

# Nieuwe workflow voor detectie van niet-toegelaten GGO's met behulp van Next-Generation-Sequencing

Marie-Alice Fraiture ([Marie-Alice.Fraiture@wiv-isp.be](mailto:Marie-Alice.Fraiture@wiv-isp.be))

Nina Papazova ([nina.papazova@wiv-isp.be](mailto:nina.papazova@wiv-isp.be))

Nancy H Roosens ([nancy.roosens@wiv-isp.be](mailto:nancy.roosens@wiv-isp.be))

Wetenschappelijk Instituut Volksgezondheid (WIV-ISP), Platform Biotechnologie en moleculaire Biologie (PBB), J. Wytsmanstraat 14, 1050 Brussels, Belgium

Het huidige system voor detectie van Genetisch Gewijzigde Organismen (GGO's) door de officiële laboratoria is gebaseerd op de qPCR technologie. Eerst is de potentiële aanwezigheid van GGO's onderzocht door middel van een screening analyse vooral gebruik makend van elementen die vaak voorkomen in GGO transgene constructen. De combinatie van p35S (Bloemkoolmozaïkvirus (CaMV) 35S promoter) en tNOS (Agrobacterium tumefaciens nopaline synthase terminator) dekt de meeste GGO events af die geautoriseerd zijn in de Europese Unie (EU), evenals niet-geautoriseerde GGO's. Bijgevolg zouden de niet-geautoriseerde GGO's kunnen ontsnappen aan de controle indien de geteste monsters zowel toegelaten als niet geautoriseerde GGO's bevatten. Bovendien, aangezien de meeste van de gebruikte screeningsmerkers afkomstig zijn van natuurlijke organismen, b.v. p35S en tNOS, kan hun detectie alleen maar leiden tot verdenking van de aanwezigheid van GGO's.

Om deze moeilijkheden te overwinnen hebben we een nieuwe workflow ontwikkeld op basis van next-generation-sequencing (NGS) -technologie om de sequentie-informatie te verkrijgen die nodig is om de aanwezigheid van niet-toegelaten GGO's in de voedsel- en voederketen te bewijzen. Meer specifiek, de qPCR-screening-analyse, gericht op belangrijke transgene elementen die vaak worden aangetroffen in zowel de EU geautoriseerde als niet-toegelaten GGO's, zoals p35S, tNOS en t35S pCAMBIA, wordt nog steeds gebruikt als de eerste stap om te mikken op een groot aantal GGO's. Als een van deze transgene elementen wordt gedetecteerd in de qPCR-screeninganalyse, wordt vervolgens een tweede stap toegepast om informatie te verkrijgen over de sequenties die dit transgene element omringen: een "DNA-walking" strategie, die verankerd is op de eerder gedetecteerde transgene elementen wordt toegepast om onbekende sequenties die de bekende sequenties flankeren te amplificeren. Het eind PCR-product kan vervolgens gesequenced worden door middel van NGS-technologieën. Deze workflow is met succes toegepast in GGO-monsters, waaronder GGO's op trace-niveaus, GGO-mengsels en bewerkte voedingsmatrices.

Van de verschillende NGS-platformen werd het gebruik van Pacific Biosciences® en Oxford Nanopore® instrumenten voor de sequenering van DNA bibliotheken van deze twee gerichte NGS strategieën, geëvalueerd als de meest relevante opties, omdat ze kunnen werken met heterogene bibliotheken en momenteel de langste leeslengte bieden (tot 60 kbp and 200 kbp respectievelijk voor Pacific Biosciences® en Oxford Nanopore® instrumenten).



Op deze manier kan de complexiteit van de bioinformatica-analyse verminderd worden, omdat de volledige sequenties van de gegenereerde amplicons direct konden worden geleverd zonder enige voorafgaande de novo assemblage van korte sequenties om langere sequenties opnieuw te bouwen

De DNA-sequenties die zijn gegenereerd uit deze gerichte NGS strategieën kunnen eerst worden vergeleken met een database die ten minste alle sequenties bevat van door de EU geautoriseerde GGO's, waaronder de transgene cassettes, de plantengenomen en de transgene flankerende regio's. Als er geen overeenkomst kan vastgesteld worden tussen de gegenereerde sequenties en de sequenties van in de EU geautoriseerde GGO's, is de aanwezigheid van in de EU niet-toegelaten GGO's bewezen na een bevestiging met behulp van qPCR.

Met deze nieuwe workflow kan, in tegenstelling tot het huidige GGO-detectiesysteem op basis van qPCR, de aanwezigheid van in de EU niet-toegelaten GGO's niet worden gemaskeerd door de aanwezigheid van in de EU geautoriseerde GGO's.

Wat de sequentiestap betreft, kan NGS-technologie het aantal monsters in één analyse eenvoudig en aanzienlijk verhogen via een barcodesysteem, waardoor de aanwezigheid van in de EU niet-toegelaten GGO's in de voedsel- en voederketen op een snelle en hoge doorvoerwijze kan gecontroleerd worden.

## **Dankwoord**

Het onderzoek dat tot deze resultaten leidde, werd gesubsidieerd door de Belgische Federale Overheidsdienst Volksgezondheid, Veiligheid van de Voedselketen en Leefmilieu via het contract UGMMONITOR (conventie RF 11/6242).

## **References**

Fraiture Marie-Alice, Herman Philippe, De Loose Marc, Debode Frédéric and Roosens Nancy (2017) How can we better detect unauthorized GMO in the food and feed chain. Trends in Biotechnology. 35:507-517.doi: 10.1016/j.tibtech.2017.03.002



# Onderzoek van voedseluitbraken en moleculaire typering: hoge diversiteit aan *Staphylococcus aureus* stammen en belang van toxine detectie.

*Sarah Denayer, Laurence Delbrassinne en Nadine Botteldoorn.*

*Wetenschappelijk Instituut Volksgezondheid (WIV-ISP), NRL Voedselvergiftigingen-NRL Coagulase positieve staphylococci, J. Wytsmanstraat 14, 1050 Brussel, België.*

## Inleiding

Voedselintoxicaties veroorzaakt door staphylococci enterotoxinen (SEs) behoren tot de meest gerapporteerde voedselgebonden uitbraken. Deze worden veroorzaakt door de consumptie van een levensmiddel waarin coagulase positieve staphylococci (CPS), meestal *Staphylococcus aureus*, kunnen groeien en enterotoxinen produceren. Gegevens van het Europese Agentschap voor Veiligheid van de Voedselketen (EFSA) en het Europees centrum voor controle van infectieziekten (ECDC) tonen aan dat bacteriële toxinen het tweede meest gerapporteerde oorzakelijk agens vormen in de Europese Unie voor voedselintoxicaties, dit voor de periode 2011-2015 (EFSA 2012-2016). In deze periode waren bacteriële toxinen verantwoordelijk voor 12.9% tot 19.5% van de voedselgerelateerde uitbraken, waarvan ongeveer de helft door SEs werden veroorzaakt.

Een intoxicatie met SEs wordt gekarakteriseerd door het snel manifesteren van de typische symptomen waaronder braken, misselijkheid, maagkrampen en in sommige gevallen ook diarree. De typische incubatieperiode is 2-7 uur, maar soms worden symptomen reeds 30 minuten na consumptie van een SE bevattend voedingsmiddel gerapporteerd (Humphries en Linscott, 2015). De symptomen zijn zelfhelend en verdwijnen meestal binnen de 12 uur. De ernst van de symptomen hangt af van de hoeveelheid ingenomen toxine, de gezondheidstoestand van het individu maar ook het toxine-type (Hennekinne et al., 2012). Voor gevoelige personen zoals de zogenaamde YOPI-groep (jong, oud, zwanger, immuno-onderdrukt), kan hospitalisatie nodig zijn.

Tot op heden worden er 24 verschillende SEs beschreven, dit op basis van hun antigeniciteit (Hennekinne et al., 2012; Ono et al., 2015). De nomenclatuur van SEs (SEA tot SEIY) is gebaseerd op hun chronologie van ontdekken. Voor een sub-groep van de SEs kon reeds een emetische activiteit worden aangetoond (Argudin et al., 2010, Omoe et al., 2013, Ono et al., 2015). Naar de andere wordt verwezen als SE gelijkende toxinen (SEI), omdat deze geen emetische activiteit vertonen of omdat deze nog niet kon worden aangetoond. Van de 24 in de literatuur beschreven SEs, werden er slechts 5 SEs uitbundig gekarakteriseerd (SEA, SEB, SEC, SED en SEE) waarvoor er dan ook reeds detectiemethoden (commercieel of in-house) beschikbaar zijn (Nia et al., 2016 ULPT, NIA et al., 2016 Equatox). De aanwezigheid van deze toxinen wordt meestal kwalitatief beschreven in uitbraken, maar kwantitatieve data over SEs in voedingsmiddelen zijn eerder schaars. Recente bevindingen tonen aan dat ook andere SEs (SEG, SEH, SEI, SER, SES en SET) een potentieel risico vormen in voedselvergiftigingen (Omoe et al., 2013, Ono et al., 2015). Door hun stabiliteit bij hoge temperaturen (tot



28 minuten bij 121°C), worden SEs niet volledig vernietigd bij de verhitting die momenteel wordt gebruikt in de voedselverwerking (zoals 15 s bij 72°C) (Hennekinne et al., 2012, Balaban en Rasooly 2000). Bovendien zijn SEs resistent aan vele omgevingscondities (lage pH, invriezen, drogen) waarin CPS niet overleeft en zijn ze resistent aan humane proteolytische enzymen waardoor ze actief blijven in het spijsverteringsstelsel na inname (Hennekinne et al., 2012). De toxische dosis wordt meestal weergegeven voor waarnemingen van het SEA, waarbij amper 20-100 ng van het enterotoxine reeds aanleiding kan geven tot symptomen bij een gevoelig volwassen persoon (Hennekinne et al., 2012).

Een voedselintoxicatie door SEs wordt voornamelijk geassocieerd aan het niet correct behandelen van gekookte of verwerkte voedingsmiddelen, waarbij vervolgens de bewaarcondities de uitgroei van CPS toelaten en dus ook de productie van SEs (Argudin et al., 2010). Voedselbereiders die drager zijn van SE producerende CPS (vb. ter hoogte van de neus, handen, huid) worden aanzien als de voornaamste bron van voedselbesmetting via manueel contact of via secreties. *Staphylococcus aureus* is namelijk een veelvoorkomende bacterie op de huid en slijmvliezen van de mens, met een persistentie van ongeveer 20-30% (Kluytmans en Wertheim, 2005). Anderzijds kunnen CPS ook in de zuivelproductie terecht komen via besmette melk van dieren (vee, schapen, geiten) met een geïnfecteerde uier (Hennekinne et al., 2012; Kümmel et al., 2016).

De groei van CPS wordt voornamelijk bevorderd in eiwitrijke voeding zoals vlees en vleesproducten, gevogelte en ei-producten, melk en zuivelproducten, en bakkerijproducten (voornamelijk banketbakkersroom) (EFSA report 2010 – 2015, Hennekinne et al., 2012). De diagnose van een voedselintoxicatie met CPS is meestal gebaseerd op een hoeveelheid  $>10^5$  kve CPS/g en de detectie van SEs in voedselresten, maar ook de isolatie van identieke *S. aureus* klonen bij de patiënten en de betrokken voedselresten (Hennekinne et al., 2010).

Aan de hand van 3 uitbraken veroorzaakt door SE producerende CPS in 2013, wordt het belang aangetoond van de moleculaire typering van CPS isolaten afkomstig van de mens en uit de voeding, maar ook van de detectie en kwantificatie van SEs in voedingsmiddelen.

## Methoden

Voor voedseluitbraken in België zijn de inspecteurs van het Federaal Agentschap voor de Veiligheid van de Voedselketen (FAVV) verantwoordelijk voor het onderzoek van het voedingsgedeelte en de staalname van voedingsmiddelen, terwijl de artsen van Diensten Infectieziektenbestrijding (Vlaanderen) en AViQ-COCOM (Wallonië en Brussel) verantwoordelijk zijn voor het humane luik van het onderzoek met het verzamelen van humane stalen. Epidemiologische informatie over de uitbraak wordt bekomen via (familieleden van) patiënten.

De telling van CPS en *Bacillus cereus* op voedingsstalen gebeurde zoals beschreven in de ISO 6888-1:1999 en ISO 7932:2004, respectievelijk. Een entnaald humane faeces of braaksel werden rechtstreeks overgebracht op MYP agar (*B. cereus*) en Baird Parker agar (CPS). De aanwezigheid van SEs werd uitgevoerd met behulp van de VIDAS volgens de Europese screeningsmethode (ESMv5), de kwantificatie van SEs in voeding gebeurde door middel van een kwantitatieve ELISA methode in het Europese Unie Referentie Laboratorium voor CPS (Anses). De CPS isolaten werden verder gekarakteriseerd voor de aanwezigheid van 11 enterotoxine-genen via PCR (Roussel et al., 2015). De vergelijking van humane isolaten en voedingsisolaten werd uitgevoerd door middel van pulsed-field gelelektroforese (PFGE) met *SmaI* als restrictie-enzyme (Roussel et al., 2015).

## Resultaten

In 2013 werden in België vier voedseluitbraken gemeld met CPS als oorzakelijk agens, waarvan er drie hier worden beschreven. Een humaan geval werd gedefinieerd als een persoon die een maaltijd nuttigde op de locatie waar de uitbraak plaatsvond en die symptomen (braken) vertoonde binnen een tijdspanne van 1-6 uur.

- Uitbraak A vond plaats in een rusthuis en werd gerapporteerd door artsen aan de Diensten Infectieziektenbestrijding. Achtentwintig residenten moesten braken binnen een tijdspanne van 3 uur na het middagmaal. Het middagmaal bestond uit vleesbrood of kabeljauw en aardappelpuree.
- Uitbraak B werd gerapporteerd aan het FAVV door de verantwoordelijke van een cateringfirma, nadat 18 personen moesten braken binnen de 6 uur na het eten van verschillende voedingsmiddelen tijdens een lokale barbecue. Dezelfde cateraar had ook voeding geleverd voor een vergelijkbare barbecue op een andere locatie, maar daar waren geen zieken gemeld. Een interessant gegeven was het uitvallen van de stroom van de koelwagen op de locatie van de uitbraak met mogelijk een impact op de bewaartemperatuur.
- Uitbraak C: Hier moesten 6 van de 7 blootgestelde kinderen binnen het uur na het eten van wortelpuree met vis braken. De leeftijd van de kinderen was tussen 9 maanden en 2 jaar. Het kindje dat slechts een kleine hoeveelheid (<2g) had gegeten werd niet ziek. Alle zieke kinderen werden gehospitaliseerd en 2 kinderen waren in shock. De wortelpuree bevatte ook resten van de dag voordien die bij kamertemperatuur werden afgekoeld alvorens ze in de koelkast te bewaren. De vis werd gestoomd net voor consumptie.

Voeding die mogelijks aanleiding gaf tot de symptomen, waaronder ook voedingsresten, werden indien beschikbaar doorgestuurd voor analyse. Aangezien de symptomen (braken) voor deze uitbraken zich kort na de consumptie van de betrokken voedingsmiddelen manifesteerden, werd het laboratoriumonderzoek toegespitst op voedselpathogenen die emetische toxinen produceren, namelijk *Bacillus cereus* en coagulase positieve staphylococci. Daarnaast werden ook faecesstalen van de zieken en neus- en/of keelwabs van de voedselbereiders geanalyseerd op deze pathogenen.

Voor geen enkel van de stalen werd een emetisch toxine producerende *Bacillus cereus* gedetecteerd. CPS werden geïsoleerd voor alle drie de uitbraken zoals uitgebreid wordt weergegeven in de tabellen 1 (uitbraak A), 2 (uitbraak B) en 3 (uitbraak B). De karakterisatie van de isolaten op de aanwezige enterotoxine-genen werd eveneens opgenomen in de tabellen net als de detectie en -/of kwantificatie van de enterotoxinen aanwezig in de voedingsresten.



Tabel 1: Overzicht van de CPS tellingen in voedingsstalen, detectie van CPS in humane stalen en typeringsresultaten van isolaten voor uitbraak A.

SE detectie a								
	Oorsprong (F, C, FH)*	Matrix	CPS (kve/g, D, ND)	stam (SE-type, ND)	Voeding (D, ND)	SE (ng/g) b	se-genen	Pulso-type
Uitbraak A	F	aardappelpuree	270	SEA, SED	D	SEA 0.019	sea, sed, seg, sei, sej, ser	210
	F	Divers (17 stalen)	ND		ND		Geen iso-laot	
	C	Faeces 1	D	SEA			sea, sed, seg, sei, sej, ser	210
	C	Faeces 2	D	SEA			sea, sed, seg, sei, sej, ser	210
	FH <sup>1</sup>	Keelwab	D	SEA			sea, seh	37
	FH <sup>2</sup>	Keelwab	D	SEC			sec, seg, sei	212
	FH <sup>3</sup>	Keel-/neuswab	D	SEA			sea, seh	19
	FH <sup>4</sup>	Neuswab	D	ND			Negatief onderzochte se-genen	N/A
	FH <sup>5</sup>	Neuswab	D	ND			seg, seh, sei	213
	FH <sup>5</sup>	Keelwab	D	ND			seg, seh, sei	214
	FH <sup>6</sup>	Neuswab	D	ND			seg, sei	211
	FH <sup>7</sup>	Keel-/neuswab	D	ND			Negatief onderzochte se-genen	N/A
20 FH/7 C	Swab / Faeces	ND					Geen iso-laot	

Bij uitbraak A werden enkel in de aardappelpuree lage aantallen (270 kve/g) CPS teruggevonden, de overige voedingsstalen werden negatief bevonden voor CPS. Er werden ook lage hoeveelheden SEA (0.019 ng/g) gedetecteerd in deze matrix., Enterotoxinogene CPS werd geïsoleerd uit de stoelgang van 2 patiënten. Er werden ook neus- en keelwabs van 7 voedselbereiders positief bevonden voor CPS. Een identiek se-geneprofiel wordt waargenomen tussen het voedseliso-laot de isolaten van de 2 patiënten, terwijl bij de isolaten afkomstig van de voedselbereiders andere se-profielen worden waargenomen.

Tabel 2: Overzicht van de CPS tellingen in voedingsstalen, detectie van CPS in humane stalen en typeringsresultaten van isolaten voor uitbraak B.

SE detectie a								
	Oorsprong (F, C, FH)*	Matrix	CPS (kve/g, D, ND)	stam (SE-type, ND)	Voeding (D, ND)	SE (ng/g) b	se-genen	Pulso-type
Uitbraak B	F	Kip	1700	SEA, SEC	ND	N/A	sea, sec	195
	F	Worst	1300	SEA	D	N/A	sea	209
	F	Rundsvlees	900	ND	ND	N/A	sea	209
	F	aardappelsalade	7200000	SEA, SEC	D	SEA 0.015	sea, sec	195
	F	taart	100	ND	ND	N/A	sep	5
	F	Divers (11 stalen)	ND		N/A		Geen isolaat	
	4 FH/ 5 C	Faeces (9 stalen)	ND				Geen isolaat	

In de aardappelsalade werden hoge aantallen CPS gedetecteerd ( $>10^6$  kve/g). In deze aardappelsalade werd niet alleen SEA gedetecteerd maar waren er ook hoge hoeveelheden SEC aanwezig.

In de andere betrokken voedingsmiddelen waren lagere aantallen sea-positieve CPS aanwezig ( $10^2$ - $10^3$  kve/g), maar werd het toxine SEA niet gedetecteerd. Een overdracht van SEA-producerende CPS stammen naar andere voedingsmiddelen door een kruisbesmetting tijdens bewaring kan niet worden uitgesloten, anderzijds lag de concentratie SEA in deze voedingsmiddelen mogelijk onder de detectielimiet van alle gebruikte methoden. Voor geen enkel van de humane stalen werden CPS geïsoleerd.

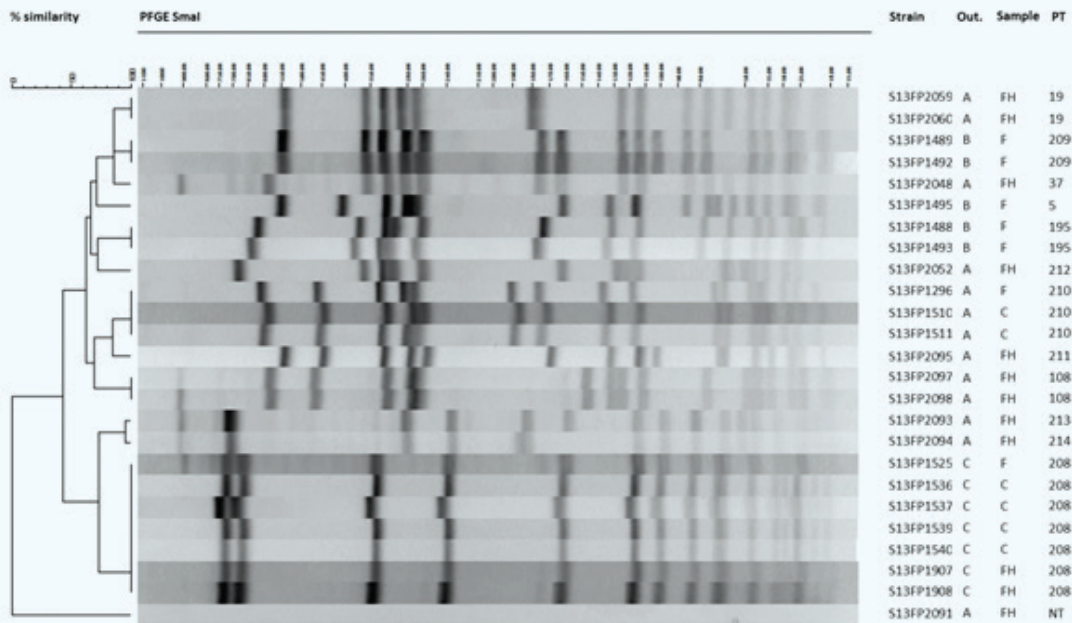
Tabel 3: Overzicht van de CPS tellingen in voedingsstalen, detectie van CPS in humane stalen en typeringsresultaten van isolaten voor uitbraak C.

SE detectie a								
	Oorsprong (F, C, FH)*	Matrix	CPS (kve/g, D, ND)	stam (SE-type, ND)	Voeding (D, ND)	SE (ng/g) b	se-genen	Pulso-type
Uitbraak C	F	Wortelpuree met vis	>15000000	SEA	N/A		sea, seg, sei	208
	F	Vis	ND		N/A		Geen isolaat	
	C	Faeces 1	D	SEA			sea, seg, sei	208
	C	Faeces 2	D	SEA			sea, seg, sei	208
	C	Faeces 3	D	SEA			sea, seg, sei	208
	C	Faeces 4	D	SEA			sea, seg, sei	208
	FH	Swab Keel/ Neus	D	SEA			sea, seg, sei	208
	C	Braaksel	ND				Geen isolaat	

In de wortelpuree van uitbraak C werden hoge aantallen aan CPS ( $> 10^6$  kve/g) teruggevonden. Er was onvoldoende staal beschikbaar voor de detectie en kwantificatie van de SEs. Door de extreem hoge aantallen CPS en het snel opduiken van de symptomen bij de patiënten, wordt wel verondersteld dat hier hoge concentraties aan SEA aanwezig waren. Aangezien het in deze uitbraak jonge kinderen betrof tussen 9 maanden en 2 jaar oud, zou de uitkomst van deze uitbraak veel ernstiger geweest kunnen zijn. Er wordt een identiek se-genprofiel waargenomen tussen het voedselisolaat en de humane CPS isolaten.

#### Vergelijking van CPS stammen van humane oorsprong en uit voeding

Alle se-positieve CPS isolaten van de drie uitbraken werden vergeleken door middel van Pulsed Field Gel elektroforese (PFGE) (Figuur 1). Verscheidene pulsotypes circuleerden bij de patiënten, voedselbereiders en in de voeding voor de drie uitbraken. In uitbraak A werden verschillende pulsotypes (namelijk 19, 37, 211, 212 en 213) onderscheiden bij de voedselbereiders maar geen enkele had hetzelfde pulsotype (210) als het voedselisolaat of de patiënten (Figuur 1). In uitbraak B konden drie pulsotypes worden onderscheiden (namelijk 5, 195, 209). Voor uitbraak C hadden alle stammen geïsoleerd van de aardappelpuree, de patiënten en de voedselbereider een identiek pulsotype (namelijk 208).



Figuur 1. Vergelijking van voedings- en humane isolaten van uitbraken A, B en C gebruik makende van Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE). Legende: Voeding (F); Patiënt (C); Voedselbereider (FH); Uitbraak (Out.); Pulsotype (PT)

## Discussie

Er werden drie voedselintoxicaties beschreven die veroorzaakt werden door enterotoxinen (SEs) van coagulase positieve Staphylococci (CPS). Allen werden beschouwd als uitbraken met sterke microbiologische en epidemiologische evidentie volgens de EFSA nomenclatuur. Op basis van microbiële analyse kon de betrokkenheid van emetische *Bacillus cereus* uitgesloten worden als oorzakelijk agens.

- Staphylococci enterotoxine A (SEA) is wereldwijd het meest gerapporteerde SE in voedselintoxicaties met CPS (Argudin et al., 2010). Dit SE was eveneens het betrokken toxine voor de uitbraken van 2013 waarbij SEA zowel fenotypisch als op genotypisch niveau werd gedetecteerd bij de CPS isolaten van humane gevallen en voedselresten. Voedingsmiddelen op basis van aardappelen, waaronder puree en aardappelsalade, waren betrokken in de drie beschreven uitbraken. SEs konden in deze voedingsmiddelen gekwantificeerd worden, behalve voor uitbraak C waarbij de analyse niet kon worden uitgevoerd doordat er onvoldoende staal was.



- Verschillende analytische methoden werden ontwikkeld voor de detectie en kwantificatie van SEs, zoals immunologische methoden en andere die gebaseerd zijn op massa spectrometrie. Beiden hebben hun beperkingen, voornamelijk wat betreft beschikbaarheid van specifieke antilichamen, peptiden en standaarden maar ook een verschil in gevoeligheid van de detectiemethode zoals ook blijkt uit onze resultaten (Hennekinne et al., 2010; Hait et al., 2014; Wu et al., 2016). Zo wordt voor de SET-RPLA een lagere gevoeligheid waargenomen ten opzichte van de VIDAS SET2 en de Ridascreen. Momenteel laten de commercieel beschikbare ELISA methoden bovendien enkel de detectie toe van de vijf klassieke SEs, SEA tot SEE, in voedingsmatrices met al, dan niet identificatie van de toxine types SEA tot SED (Hait et al., 2014; Nia et al., 2016a en b). Echter werd ook voor andere beschreven SEs reeds een emetische activiteit aangetoond maar zijn er nog geen detectiemethoden voorhanden.
- Daarnaast wordt SE productie beïnvloed door verschillende factoren zoals pH, wateractiviteit, temperatuur en andere parameters (Hait et al., 2014). Hoewel de aanwezigheid van enterotoxine-genen daarom misschien geen correcte indicatie geeft van de productie van het toxine, kan PCR toch een waardevolle screeningstool zijn voor geïsoleerde staphylococcen en voor voedselmatrices. Op deze manier is er een indicatie of er een kans bestaat dat er een enterotoxine aanwezig kan zijn in een voedingsmiddel, zelfs voor meer recent beschreven SEs voor dewelke er voorlopig nog geen toxine detectiemethode bestaat. Door middel van PCR werden inderdaad niet alleen genen gedetecteerd die coderen voor de klassieke enterotoxinen (sea, sec or sed) in de voedings- en humane isolaten maar ook genen die coderen voor andere SEs (seg, seh, sei, sej, ser en sep) waarbij voor sommigen reeds een emetische activiteit werd beschreven.
- De exacte hoeveelheid enterotoxine die aanleiding geeft tot symptomen is nog steeds niet gekend. Indien honderd gram als een gemiddelde portie wordt genomen, dan werden hoeveelheden tussen 1.9 ng (aardappelpuree uitbraak A) en 14.7 ng (aardappelen uitbraak B) gedetecteerd die aanleiding gaven tot braken en vervolgens diarree. Deze niveaus liggen veel lager dan deze beschreven in eerdere studies op humane gezonde mannelijke vrijwilligers, waarbij orale opname van 3.5 µg zuiver SEA, SEB of SEC aanleiding gaf tot braken en/of diarree in alle individuen (Bennet et al., 2005). Hoeveelheden tussen 20-100 ng werden eerder beschreven als zijnde effectief in SFP (Hennekinne et al., 2012). Recent onderzoek via dosis-respons modellen die gebaseerd zijn op uitbraakgegevens, tonen aan dat 6.1 ng SEA voldoende is om aanleiding te geven tot symptomen bij 10% van de blootgestelde populatie (benchmark dosis (BMD10)) (Guillier et al., 2016). In het geval van uitbraak A kan de aanwezigheid van meerdere enterotoxinen, die bovendien een synergetisch effect kunnen uitoefenen, niet uitgesloten worden aangezien de *S. aureus* isolaten ook andere enterotoxine genen (sea, sed, seg, sei, sej en ser) bevatten. Hoewel SEG, SEH, SEI, SES en SET allen emetische activiteit vertonen en dus een potentiële rol hebben in SFP, moeten detectiemethoden voor deze toxinen in de voeding nog worden ontwikkeld (Omoe et al., 2013, Ono et al., 2015).
- De Europese wetgeving 2073/2005 vereist dat de aanwezigheid van SEs in kaas en melk of weipoe-der moet onderzocht worden, enkel wanneer de hoeveelheid CPS minstens  $10^5$  kve per gram voeding bedraagt (voedselhygiëne criterium), waarbij SEs afwezig moeten zijn (voedselveiligheids criterium) voor deze producten op de markt tot het einde van de houdbaarheid. Voor andere voedingsmiddelen bestaan er momenteel nog geen criteria, maar toch is de rechtstreekse detectie van SEs in voeding en dit onder meer bij voedselintoxicaties belangrijk omwille van de hitteresistentie van deze toxinen. Een interessant gegeven is daarom de detectie van SEA in de aardappelpuree waarvoor slechts 270 kve CPS per gram puree werden teruggevonden. Dit bevestigt eerdere bevindingen dat gevormde SEs nog steeds kunnen aanwezig zijn in hittebehandelde voedingsmiddelen terwijl *S. aureus* geëlimineerd werd zodat een telling van CPS op zich niet gebruikt kan worden voor de karakterisatie van een SFP uitbraak (Hennekinne et al., 2010).



- Verscheidene moleculaire typeringsmethoden werden reeds gebruikt voor het vergelijken van *Staphylococcus aureus* stammen in uitbraakonderzoek waaronder, MLVA, spa-typering en pulsed field gelelektroforese (PFGE) (Roussel et al., 2015). Tot op vandaag blijft PFGE de referentie voor het typeren van CPS, hoewel het gebruik van nieuwe moleculaire technieken zoals het nieuwe generatie sekwenen (NGS) in uitbraakonderzoek en typering van stammen aan populariteit wint en ook veelbelovend is voor surveillance (Hennekine et al., 2003, Bartels et al., 2014, Robinson et al., 2013, EFSA Opinie 2013). Het gebruik van deze typeringsmethoden is belangrijk aangezien de aanwezigheid van SEs of se genen niet voldoende discriminatoir is voor het in verband brengen van een besmet voedingsmiddel met een patient, voedselbereider of operator. Voor uitbraak A behoorden bijvoorbeeld twee isolaten van een voedselbereider alsnog tot een verschillend pulsotype (213 en 214), hoewel ze een identiek se-genprofiel hadden. Anderzijds kon PFGE aantonen dat enterotoxigene *S. aureus* isolaten (sea, seg, sei) van de patiënten in uitbraak C identiek waren aan het voedselisolat en behoorden tot het pulsotype 208. Het isolat van de voedselbereider, hier de onthaalmoeder, was bovendien van hetzelfde pulsotype wat betekent dat de stam vermoedelijk via de onthaalmoeder in de aardappelpuree is terechtgekomen. Het blijft onbekend hoe de stam in de voeding terecht is gekomen voor uitbraken A en B, maar door middel van PFGE kon de voeding wel in verband gebracht worden met de patiënten voor uitbraak A aangezien een identiek pulsotype (nl 210) werd waargenomen voor de isolaten. Merk ook op dat het vergelijken van genomen niet alleen de betrokkenheid van voedselbereiders kan aantonen maar ook kan uitsluiten.
- SFP wordt klassiek gekoppeld aan het niet correct behandelen van gekookte of verwerkte voeding, gevolgd door bewaring onder condities die groei van *S. aureus* en de productie van toxinen toelaten. De aanwezigheid van enterotoxine genen in CPS isolaten van gezonde dragers, waaronder ook voedselbereiders, benadrukt het risico op besmetting van voedingsmiddelen tijdens de voedselbereiding en -verwerking. Daarenboven bevatten veel van onze isolaten enterotoxine genen die verschillend zijn van de klassieke SEs, voor dewelke hun rol in voedselintoxicaties niet altijd gekend is. In uitbraak A, resulteerden 3 voedselbereiders positief voor *S. aureus* isolaten die het seh gen bevatten, hetgeen beschreven wordt in eerdere uitbraken in Japan en Noorwegen (Hait et al., 2014, Jorgesen et al., 2005). Een herhaaldelijke staalname van een grote populatie gezonde dragers, waaronder voedselbereiders, in China tussen 2002-2012 heeft een significante toename aangetoond voor bepaalde se-genen waaronder seh (Ho et al., 2015). Deze studies tonen aan dat er nood is aan methoden die onder meer SEH rechtstreeks in voeding detecteren. In de hier beschreven uitbraken werd geen enkel CPS isolat uit voeding positief bevonden voor het seh-gen. Ook de combinatie van se-genen, voortaan se-genprofiel genoemd, kan een eerste indicatie geven van een mogelijk verband tussen een gecontamineerd voedingsmiddel en een patiënt. Dit is het geval voor uitbraken A en C, waarbij een identiek se-genprofiel wordt waargenomen tussen het voedselisolat en één of meerdere humane CPS isolaten.



## Conclusie

Er werden 3 SFP uitbraken beschreven die veroorzaakt werden door enterotoxine A producerende *S. aureus* stammen. Moleculaire detectiemethoden waaronder conventionele of real-time PCR kan gebruikt worden om de genetische capaciteit tot productie van enterotoxinen van geïsoleerde stammen te evalueren. Moleculaire typering van CPS isolaten kan ook helpen bij de trace-back/-forward bronopsporing in uitbraakonderzoek. Detectie en identificatie van emetische SEs, verschillend van SEA-SEE, zal belangrijk zijn om het aantal gerapporteerde uitbraken met sterke evidentie te doen toenemen. Aangezien het moeilijk is om ELISA gebaseerde immunologische methoden voor de detectie van SEs te ontwikkelen, geven PCR methoden nog steeds complementaire informatie in SFP uitbraakonderzoek. In het geval van voedselgerelateerde uitbraken, zou het onderzoek enerzijds de analyse van neus-of keelwabs moeten inhouden van personen die de voeding hanteren, en de analyse van alle voedselcomponenten of voedselresten anderzijds. Dit vereist een gecoördineerde aanpak binnen een multidisciplinaire team, waarbij personen van diergezondheid en humane gezondheid worden samengebracht evenals epidemiologen en voedselmicrobiologen. Goede hygiënepraktijken, inclusief handhygiëne en correcte bewaring of verhitting van levensmiddelen is cruciaal voor het voorkomen van CPS uitbraken.

## Legende Tabellen:

F: Voeding;

C: Patiënt;

FH: Voedselbereider;

N/A: Niet geanalyseerd;

D: gedetecteerd;

ND: Niet gedetecteerd;

SE type: Staphylococcal Enterotoxin type

\*: Humane stalen afkomstig van eenzelfde C of FH worden met een identiek nummer in superscript aangeduid.

a commerciële methode (VIDAS en/of Ridascreen op voeding, SET-RPLA op stam).

b in house ELISA methode

## Referenties

1. Humphries, R.M.; Linscott, A.J. Laboratory diagnosis of bacterial gastroenteritis. *Clin. Microbiol. Rev.* 2015, 28, 3-31. doi: 10.1128/CMR.00073-14
2. Hennekinne, J.A.; de Buyser, M.L.; Dragacci, S. Staphylococcus aureus and its food poisoning toxins: characterization and outbreak investigation. *FEMS Microbiol. Rev.* 2012, 36, 815-836. doi: 10.1111/j.1574-6976.2011.00311.x
3. Ono, H.K.; Sato'o, Y.; Narita, K.; Naito, I.; Hirose, S.; Hisatsune, J.; Asano, K.; Hu, D. L.; Omoe, K.; Sugai, M.; Nakane, A. Identification and Characterization of a Novel Staphylococcal Emetic Toxin. *Appl. Environ. Microbiol.* 2015, 81, 7034-40. doi: 10.1128/AEM.01873-15
4. Argudin, M.A.; Mendoza, M.C.; Rodicio, M.R. Food poisoning and Staphylococcus aureus enterotoxins. *Toxins* 2010, 2, 1751-1773. doi: 10.3390/toxins2071751
5. Omoe, K.; Hu, D.L.; Ono, H.K.; Shimizu, S.; Takahashi-Omoe, H.; Nakane, A.; Uchiyama, T.; Shinagawa, K.; Imanishi, K. Emetic potentials of newly identified staphylococcal enterotoxin-like toxins. *Infect Immun.* 2013, 81, 3627-3631. doi: 10.1128/IAI.00550-13
6. Nia Y.; Mutel, I.; Assere, A.; Lombard, B.; Auvray, F.; Hennekinne, J.A.. Review Over a 3-Year Period of European Union Proficiency Tests for Detection of Staphylococcal Enterotoxins in Food Matrices. *Toxins* 2016, 8, 107-121. doi: 10.3390/toxins8040107
7. Nia Y.; Rodriguez, M.; Zeleny, R.; Herbin, S.; Auvray, F.; Fiebig, U.; Avondet, M.A.; Munoz, A.; Hennekinne, J.A. Organization and ELISA-Based Results of the First Proficiency Testing to Evaluate the Ability of European Union Laboratories to Detect Staphylococcal Enterotoxin Type B (SEB) in Buffer and Milk. *Toxins* 2016, 8, 268-281. doi: 10.3390/toxins8090268
8. Balaban, N.; Rasooly, A. Staphylococcal enterotoxins. *Int. J. Food Microbiol.* 2000, 61, 1-10.
9. Kluytmans, J.A.; Wertheim, H.F. Nasal carriage of Staphylococcus aureus and prevention of nosocomial infections. *Infection* 2005, 33, 3-8.
10. Kummel, J.; Stessl, B.; Gonano, M.; Walcher, G.; Bereuter, O.; Fricker, M.; Grunert, T.; Wagner, M.; Ehling-Schulz, M. Staphylococcus aureus Entrance into the Dairy Chain: Tracking S. aureus from Dairy Cow to Cheese. *Front. Microbiol.* 2016, 7, 1603.
11. EFSA. 2013. "The European Food Safety Authority; The European Centre for Disease Prevention and Control. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2011." In, edited by EFSA Journal, 250. European Food Safety Authority. doi: 10.2903/j.efsa.2013.3129
12. EFSA. 2014a. "The European Food Safety Authority; The European Centre for Disease Prevention and Control. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2012." In, edited by EFSA Journal, 312. European Food Safety Authority. doi: 10.2903/j.efsa.2014.3547
13. EFSA. 2014b. "The European Food Safety Authority; The European Centre for Disease Prevention and Control. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2013." In, edited by EFSA Journal, 165. European Food Safety Authority. doi: 10.2903/j.efsa.2015.3991
14. EFSA. 2015. "The European Food Safety Authority; The European Centre for Disease Prevention and Control. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2014." In, edited by EFSA Journal, 191. European Food Safety Authority. doi: 10.2903/j.efsa.2015.4329



15. EFSA. 2016. "The European Food Safety Authority; The European Centre for Disease Prevention and Control. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2015." In, edited by EFSA Journal, 231. European Food Safety Authority. doi: 10.2903/j.efsa.2016.4634
16. Hennekinne, J.A.; Ostyn, A.; Guillier, F.; Herbin, S.; Prufer, A.L.; Dragacci, S. How should staphylococcal food poisoning outbreaks be characterized? *Toxins* 2010, 2, 2106-2116. doi: 10.3390/toxins2082106
17. Roussel, S.; Felix, B.; Vingadassalon, N.; Grout, J.; Hennekinne, J.A.; Guillier, L.; Brisabois, A.; Auvray, F. Staphylococcus aureus strains associated with food poisoning outbreaks in France: comparison of different molecular typing methods, including MLVA. *Front. Microbiol.* 2015, 6, 882. doi: 10.3389/fmicb.2015.00882
18. Bennett, R.W. Staphylococcal enterotoxin and its rapid identification in foods by enzyme-linked immunosorbent assay-based methodology. *J. Food Prot.* 2005, 68, 1264-1270.
19. Hait, J.M.; Tallent, S.M.; Bennett, R.W. Screening, detection, and serotyping methods for toxin genes and enterotoxins in Staphylococcus strains. *J. AOAC Int.* 2014, 97, 1078-1083.
20. Wu, S.; Duan, N.; Gu, H.; Hao, L.; Ye, H.; Gong, W.; Wang, Z. A Review of the Methods for Detection of Staphylococcus aureus Enterotoxins. *Toxins* 2016, 8, 176-195. doi: 10.3390/toxins8070176
21. Guillier, L.; Bergis, H.; Guillier, F.; Noel, V.; Auvray, F.; Hennekinne, J.-A. Dose-response modelling of staphylococcal enterotoxins using outbreak data. *Procedia Food Science.* 2016, 7, 129-132.
22. Hennekinne, J.-A.; Kerouanton, A.; Brisabois, A.; De Buyser, M.L. Discrimination of Staphylococcus aureus biotypes by pulsed-field gel electrophoresis of DNA macro-restriction fragments. *J. Appl. Microbiol.* 2003, 94, 321-329.
23. Bartels, M.D.; Petersen, A.; Worning, P.; Nielsen, J.B.; Larner-Svensson, H.; Johansen, H.K.; Andersen, L.P.; Jarløv, J.O.; Boye, K.; Larsen, A.R.; Westh, H. Comparing whole-genome sequencing with Sanger sequencing for spa typing of methicillin-resistant Staphylococcus aureus. *J. Clin. Microbiol.* 2014, 52, 4305-4308. doi: 10.1128/JCM.01979-14
24. Robinson, E.R.; Walker, T.M.; Pallen, M.J. Genomics and outbreak investigation: from sequence to consequence. *Genome Medicine* 2013, 5, 36. doi: 10.1186/gm440
25. EFSA BIOHAZ Panel (EFSA panel on Biological Hazards). Scientific Opinion on the evaluation of molecular typing methods for major food-borne microbiological hazards and their use for attribution modelling, outbreak investigation and scanning surveillance: Part 1 (evaluation of methods and applications). *EFSA journal* 2013, 11, 3502. doi: 10.2903/j.efsa.2013.3502
26. Ho, J.; Boost, M.; O'Donoghue, M. Prevalence of enterotoxin genes in Staphylococcus aureus colonising food handlers: does nasal carriage status matter? *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2015, 34, 2177-81.
27. Jorgensen, H.J.; Mathisen, T.; Løvseth, A.; Omoe, K.; Qvale, K.S.; Loncarevic, S. An outbreak of staphylococcal food poisoning caused by enterotoxin H in mashed potato made with raw milk. *FEMS Microbiol. Lett.* 2005, 252, 267-72.

# Workshops & Symposia

**De opleidingen voor de erkende laboratoria, georganiseerd door het FAVV in samenwerking met de nationale referentielaboratoria, vindt U terug op de website van het FAVV ([www.favv.be](http://www.favv.be) > Professionelen > Laboratoria > Seminars & workshops).**

**Deze tabel wordt regelmatig geactualiseerd, gelieve daarom regelmatig de website te consulteren.**

**Andere interessante workshops en symposia zijn hieronder opgenomen.**

Date	Subject	Place	More information (website)
5-7 november 2018	4th International Congress "Food Quality, Technology and Safety"	Berlin, Germany	<a href="http://unitedscientificgroup.com/conferences/food-chemistry-and-technology/">http://unitedscientificgroup.com/conferences/food-chemistry-and-technology/</a>
23-25 october 2018	18th International Symposium "Feed Technology"	Novi Sad, Serbia	<a href="http://foodtech.uns.ac.rs/">http://foodtech.uns.ac.rs/</a>
10-11 october 2018	Workshop "Use of reference materials and the estimation of measurement uncertainty"	Geel, Belgium	<a href="https://ec.europa.eu/jrc/en/event/training-course/use-reference-materials-and-estimation-measurement-uncertainty-2018">https://ec.europa.eu/jrc/en/event/training-course/use-reference-materials-and-estimation-measurement-uncertainty-2018</a>
18 october 2018	Symposium "Food Allergens: regulation, management and detection"	Brussel, Belgium	<a href="http://www.cergroupe.be/fr/news/83-symposium-international-2-edition.html">http://www.cergroupe.be/fr/news/83-symposium-international-2-edition.html</a>
19-21 september 2018	Innovations in Food Analysis 2018	München, Germany	<a href="http://www.ifaiconference.com/">http://www.ifaiconference.com/</a>
9-12 october 2018	Workshops on 'The use of DNA barcoding, from theory to practice'	Paris, France	<a href="https://www.euphresco.net/media/events/dna_barcoding_2018.pdf">https://www.euphresco.net/media/events/dna_barcoding_2018.pdf</a>
11-14 december 2018	Workshops on 'The use of DNA barcoding, from theory to practice'	Wageningen, Netherlands	<a href="https://www.euphresco.net/media/events/dna_barcoding_2018.pdf">https://www.euphresco.net/media/events/dna_barcoding_2018.pdf</a>
4-5 october 2018	Twenty-third Conference on Food Microbiology	Brussel, Belgium	<a href="https://www.bsfm.be/">https://www.bsfm.be/</a>
12-14 september 2018	Pesticides 2018 - International Conference	Bologna, Italy	<a href="https://events.unibo.it/10thpesticides-16thchemistry-fatemodernpesticides-10thmgpr-symposium2018">https://events.unibo.it/10thpesticides-16thchemistry-fatemodernpesticides-10thmgpr-symposium2018</a>
26-31 august 2018	10th International PCB Workshop : DIOXIN 2018	Kraków, Poland	<a href="http://dioxin2018.org/">http://dioxin2018.org/</a>
19-24 may 2019	14th IUPAC International Congress of Crop Protection Chemistry	Ghent, Belgium	<a href="https://www.iupac2019.be/">https://www.iupac2019.be/</a>
2-6 June 2019	67th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics	Atlanta, GA, USA	<a href="https://machprinciple.com/conference5.php?conf=67th-ASMS-Conference-on-Mass-Spectrometry-and-Allied-Topics&amp;sno=809">https://machprinciple.com/conference5.php?conf=67th-ASMS-Conference-on-Mass-Spectrometry-and-Allied-Topics&amp;sno=809</a>





# Labinfo