

University of Groningen

Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) from Humans in the Netherlands

Ferdous, Mithila

IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

Document Version

Publisher's PDF, also known as Version of record

Publication date:

2017

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

Citation for published version (APA):

Ferdous, M. (2017). *Shiga toxin-producing Escherichia coli (STEC) from Humans in the Netherlands: Novel diagnostic approach, molecular characterization and phylogenetic background*. [Thesis fully internal (DIV), University of Groningen]. University of Groningen.

Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

APPENDICES

Nederlandse Samenvatting

Acknowledgements

Biography

List of publication

Nederlandse Samenvatting

Nederlandse Samenvatting

Dit proefschrift beschrijft het onderzoek naar snelle moleculaire diagnostiek van Shiga toxine producerende *E. coli* (STEC) in combinatie met risico-inschatting en een gedetailleerde karakterisering van de bacterie. Hierbij is gebruik gemaakt van een moderne techniek met een hoog discriminerend vermogen: whole genome sequencing (WGS). Het onderzoek richt zich met name op de STEC serotypes O157:H7 en O104:H4. Daarnaast beschrijft dit proefschrift de plasticiteit van virulentie- en antibioticaresistentie eigenschappen, de moleculaire typering van *E. coli* O157:non-H7 isolaten zonder het Shiga toxine (*Stx*) coderende gen *stx* en hun genetische verwantschap met STEC O157:H7.

Hoofdstuk 2 beschrijft de screening van fecale monsters op STEC met behulp van een snel screeningsalgoritme gebaseerd op zowel moleculaire als conventionele diagnostiek. Op basis van de pathogeniciteit van STEC werden risicogroepen gedefinieerd die varieerden van de hoog risico pathotype (PT) groep I tot de laag risico PT groep III. *Stx*-PCR positieve monsters die niet met een bacteriële kweek bevestigd konden worden, werden ingedeeld in een vierde PT-groep. Het bleek dat de PT I groep, gedefinieerd door de aanwezigheid van *escV* of *agg* en/of *aat* genen en eveneens behorend bij de belangrijkste O-serotypes (O26, O103, O104, O111, O121, O145 en O157), significant geassocieerd is met bloederige diarree. Ook de *Stx* subtypes 2a en 2c bleken geassocieerd te zijn met PT I, waarmee de relatie van deze subtypes met ernstige klinische uitkomsten zoals bloederige diarree werd bevestigd.

Hoofdstuk 3 beschrijft een algemene moleculaire karakterisering van de STEC isolaten, uitgevoerd met behulp van WGS. Voor de karakterisering van STEC blijkt WGS een betrouwbare en robuuste methode te zijn. Een specifiek fylogenetische achtergrond (bijvoorbeeld bepaalde sequence type (ST)) van het isolaat bleek niet te correleren met de ernst van de ziekte. Aangetoond werd dat veel STEC isolaten een gemeenschappelijke voorouder delen met andere *E. coli* pathogroepen. Dit suggereert dat in de evolutionaire geschiedenis STECs niet als één enkele *E. coli* pathogroep beschouwd kunnen worden, maar dat ze zijn ontstaan uit meerdere pathogroepen welke de *Stx* faag hebben verkregen. In deze studie kwam de genomische diversiteit van de STEC isolaten overeen met die van een referentie collectie van diarree veroorzakende *E. coli* (DEC) isolaten, maar bleek minder divers dan die van beta-lactamase (ESBL) producerende *E. coli*'s. Dit suggereert dat de *Stx* faag bij voorkeur integreert in bepaalde *E. coli* types.

In **hoofdstuk 4** worden EAHEC (Enteroaggregatieve hemorragische *E. coli*) isolaten beschreven. Deze isolaten zijn verkregen uit fecale monsters van twee Nederlandse vriendinnen die op vakantie waren geweest in Turkije, vlak voordat één van hen gediagnostiseerd werd met het hemolytisch-uremisch syndroom (HUS). Eén van de EAHEC O104:H4 isolaten was ESBL positief, net zoals de

Duitse uitbraak stam uit 2011. Uit de feces van de vriendin van de HUS patiënt werd ook een *stx* negatieve ESBL-positieve bacterie geïsoleerd, hetgeen een aanwijzing kan zijn voor mogelijke overdracht van resistentie genen tussen bacteriën in de darm.

In **Hoofdstuk 5** wordt een evolutionair model gepresenteerd gebaseerd op de fylogenetische analyse van 23 O104:H4 isolaten, inclusief uitbraak en niet-uitbraak isolaten. Volgens dit model hebben drie succesvolle *E. coli* clusters, te weten de uitbraakstam uit 2011 en twee niet-uitbraak EAHEC O104:O4 clusters, een recente gemeenschappelijke voorouder. Het frequent opnemen en verliezen van mobiel genetische elementen (MGE) kan resulteren in een nieuwe combinatie van virulentie factoren in een pathogeen. Dit kan een mogelijke trigger zijn voor een toekomstige uitbraak. De data verkregen in **hoofdstuk 4 en 5** laat zien dat *E. coli* O104:H4, vergelijkbaar met die van de uitbraakstam in 2011, nog steeds in Europa circuleert en benadrukt het belang van een goede moleculaire surveillance van STEC.

Hoofdstuk 6 beschrijft een gedetailleerde genetische vergelijking van *stx* positieve met negatieve *E. coli* O157:H7. Deze *stx* negatieve isolaten kunnen als EPEC worden beschouwd indien ze het *eae* gen bevatten. Met behulp van WGS en fylogenetische analyse werd aangetoond dat de *stx* negatieve varianten van *E. coli* O157:H7 wel alle overige aan *stx* geassocieerde virulentie genen bevatten en daarmee nauw verwant zijn aan STEC O157:H7. Of zij hebben de *Stx* coderende bacteriofaag verloren of zij zijn mogelijk een voorganger van STEC O157:H7, in staat om de *Stx* faag op te nemen. Aangezien *stx* negatieve O157:non-H7 isolaten gewoonlijk sorbitol fermenterend (SF) zijn en onbeweeglijk kunnen zijn, kunnen ze ten onrechte als STEC SF O157:HNM geïdentificeerd worden indien geen gedegen moleculaire karakterisering wordt uitgevoerd. *E. coli* O157:non-H7 isolaten zonder het *stx* gen blijken erg divers te zijn en behoren tot verschillende ST's en H-types, zoals beschreven in **hoofdstuk 7**. Deze isolaten kunnen geclassificeerd worden als typische en atypische EPEC maar ook als non-EPEC verre verwant aan STEC O157:H7. Ze blijken verschillende virulentie eigenschappen te hebben en enkelen bevatten resistentiegenen tegen meerdere antibiotica. De aanwezigheid van verschillende plasmiden, pathogeniciteitseilanden en insertie elementen, die een rol kunnen spelen bij de verspreiding van virulentie en resistentiegenen naar andere pathogenetische bacteriën in de darmen of in het milieu, zijn waargenomen.

Ten behoeve van de gezondheidszorgautoriteiten en de wetenschappelijke gemeenschap zijn in plaats van conventionele kweektechnieken, moleculaire schema's voor een snelle diagnostiek van STEC geïmplementeerd, tezamen met een voorlopige risicoclassificatie. Door goed voorbereid te zijn op een mogelijke epidemie wordt de volksgezondheid beschermt. De verspreiding van MGE's is dynamisch en het opnemen of verliezen van deze genetische elementen maakt het moeilijk om het organisme te classificeren als bedreiging voor de volksgezondheid of juist niet. De karakterisering is

Appendices

voornamelijk uitgevoerd met behulp van WGS, een methode geschikt voor een groot aantal pathogenen en die ons in staat stelt om een uitgebreid aantal kenmerken van isolaten te bestuderen. Zonder het gebruik van WGS was het niet mogelijk geweest om van een groot aantal isolaten in een relatief korte tijd de virulentie, resistentie, andere moleculaire eigenschappen en de fylogenetische verwantschap tot in detail te bestuderen. Aangezien WGS steeds goedkoper wordt en de doorlooptijd korter, is het goed toepasbaar in de routine diagnostiek en klinische laboratoria. Aangezien de meeste grote STEC uitbraken en verschillende sporadische STEC infecties gelinkt zijn aan voedsel, zal het screenen van voedsel, water en voor voedsel bestemde dieren op de aanwezigheid van STEC, en de karakterisering van de isolaten afkomstig uit deze bronnen, bijdragen aan het opsporen van de bron in de voedselketen en een bijdrage leveren aan het voorkomen van transmissie. Ook het screenen van "gezonde" mensen op de aanwezigheid van STEC geeft inzicht in mogelijke transmissie routes via asymptomatische dragers. Daarom is het van belang om de complete faag-eigenschappen van verschillende isolaten met verschillende serotypes in kaart te brengen om relatief hoog-virulente STEC varianten te kunnen definiëren. Daarnaast geven proteomics en transcriptomics van geselecteerde STEC isolaten ons inzicht in de genexpressie die mogelijk relevant kan zijn voor de ontwikkeling van ziekte en betrokken kunnen zijn bij overlevingsmechanismen van de bacterie.

Acknowledgements

Appendices

Acknowledgements

First and foremost thank to Almighty Allah, my creator, all praises for him.

The successful completion of my thesis would not have been possible without the help and support of many people whom I wish to acknowledge below.

My sincere thanks to my promoter Prof. Alexander Friedrich and my co-promoter Dr. John Rossen. This research would not be possible without their esteemed support and guidance.

Dear Alex, first of all, thank you for offering me a Ph.D. position that ended up with this nice book with our successful publications. You always encouraged my research with brilliant and nice ideas. I have learned from you how to think very positively and divert everything to a successful ending. You always encouraged me to be very independent, and from this I learned much. It was really a great opportunity for me to work in this multispectral department with your precise guidance. I appreciate your support, your resourcefulness, your enthusiasm and your optimistic attitude, all of which have a positive influence on me.

Dear John, for me its next to impossible to express my humble gratitude to you. From the beginning of my Ph.D. project, your assistance, ideas and suggestions helped me to perform these works. It's a pleasure to work with you. You are more a friend than a supervisor for me. I dared to knock your office and disturb you whenever I had a question and I was so lucky, you were never disturbed by my questions. Being such a friendly supervisor you gave me the opportunities to share my problems any time I want, as you always told me that I can contact you 24/7 ☺. And you know, immediately after you appear my problems are somehow solved sometimes even before sharing with you.

I can't but thank to Prof. Jan Maarten van Dijl; in another way, it's you, for whom I am here today. Dear Jan Maarten, although I did not have an opportunity to directly work with you but you were the person who invited me to visit you when I applied for a job in UMCG . Till now whenever I see you I remember my first day in UMCG, I will be always grateful to you. You gave me the opportunity to meet Dr. Hermie Harmsen. Dear Hermie, I started initially working with you in our department. It was a great pleasure for me to work with you that helped me a lot in gathering research experiences and developing my skills. You were always so friendly and co-operative.

I would like to acknowledge all the members of "STEC-ID-net" project especially Dr. Mirjam Kooistra-Smid for coordinating such a nice project. Thank you Dr. Richard de Boer for helping me in collecting strains and providing me the information regarding the study. My thanks to my dear colleagues Harmen, Pascal and Hamideh who did a great job to start up the project.

Acknowledgements

I would like to thank the members of my thesis reading committee, Prof. Jan Maarten van Dijk, Prof. dr. H.J. (Henkjan) Verkade and Prof. dr. E.J. (Ed) Kuijper for sparing their precious time to read and evaluate the thesis.

Thank you Sigrid and Monika for being my paronymph and for all the discussion regarding my thesis, for the translation of dutch summary, for helping me preparing this book, helping me in designing the cover page, and many more...☺. My special thanks to the ex and current members of my office (2.034); Sigrid, Kai, Silvia, Monika, Linda, Jan-Willem, Ruud, Mehdi, Carien, Rudi, Jelte (although the people are reshuffled but I remained in the same office). I always got support from you whenever I had problems. I would like to thank the residents of "de Brug" (Bhanu, Erik, Adriana, Ieneke, Greetje, Coretta, Marjolein, Corina, Ana, Maria, Erley, Randy, Mart and who are not mentioned by name). I would like to thank Ank, Marchine, Anja, Caroline, Judith, Johan and Henk for their cordial help. Special thanks to Ank for helping me in arranging everything for the completion of the thesis including printing, invitations, arranging the symposium and so on. Thanks to Erwin, Paula, Fenna, Willy, Brigitte, Yvette, Mohammed, Karuna, Gini for helping me in the lab works. I would like to thank Prof. Hajo Grundmann for our nice and fruitful discussion. Thank you Ieneke for your nice suggestion on the dutch summary. Thanks to all the members of the Medical Microbiology department for their help and support during my PhD period. Surely, there are also many people to acknowledge who are not mentioned here by name.

Most importantly, my family : my parents, this achievement would not be possible without their inspiration and sacrifices. My father, who waited so eagerly for this day and finally his dreams came to true. Unfortunately, you two are not here with me in this big day, I could not make it but I know your affection and prayers for my happiness and prosperity is always with me. I would like to thank my parents-in-law, my brother (Ritom), brothers-in-law (Rasel vaia, Rajib and Shojib) for their encouragements. My husband Hasan Mahmud, who was always beside me, made my difficult times easier and was always very positive that inspired me a lot. The way would have never been easier without him. In every step of my PhD, in every situation, I got his intense support and care. My thanks to all of my relatives and friends in Bangladesh from whom I always got support and inspiration. In such a big achievement I must remember my grandfather (Late) Ramzan Ali Shaikh, from whom I got a lot of inspiration and guidance during the early journey of my education.

I would like to thank all of my Bangladeshi friends here specially Asad vai, Mila vabi and their children; they were like my family here in all the situations. Thank you Atiq vai for always being with us and inspiring with suggestions. I would also like to thanks my friends whom I meet in Groningen (Khokon vai, Nasrin vabi, Zilee, Khan, Maruf, Sabil, Rushmi, Faruq vai, Tushar, Jasmine, Soumen, Soutri, Anjala, Ingrid and Simmona) for their encouragements and discussion.

Appendices

The last one, the most important one to acknowledge, my son Rayn who sacrificed his days for my work. My dear Rayn, I remember clearly your first day in the day care when you were exactly three months and I had to come for my work leaving you with some unknown persons, it was so painful for me (I am grateful to all of them who took care of Rayn in 'Picasso' since his early months). You always wanted to play and spend your time with me and every morning when we dropped you in the day care you cried and I had to start my day looking at your crying face; believe me, it was not easy for me at all, I had to cry. So all of my achievements are for you my boy. You are the inspiration of my life.

Biography

Biography

Mithila Ferdous was born on 18th of November, 1984 in Kushtia, Bangladesh. She completed her Higher Secondary School Certificate in 2002 from Kushtia Government College. She studied Bachelor in the department of Microbiology at the University of Dhaka from 2003-2007. In 2009 she completed her Masters in the same department. During her masters, she performed her thesis on 'Prevalence of Extended Spectrum Beta Lactamase producing *E. coli* and *Klebsiella spp.* isolated from hospitalized patients' in the International Centre for Diarrhoeal Disease Research, Bangladesh (ICDDR). Subsequently, she continued to work as a senior research assistant (from August 2009-July 2010) and as a research officer (August 2010- July 2011) in the Clinical Microbiology Laboratory in ICDDR.

From December 2011 Mithila started to work as a visiting scientist in the department of Medical Microbiology at the University Medical Center Groningen, the Netherlands under the supervision of Dr. Hermie Harmsen. During that period she worked in the project of quantitative analysis of intestinal microbiota in chemotherapy-induced gastrointestinal mucositis in a rat model using Fluorescent In situ Hybridization (FISH). In April 2012 she started to work as a Ph.D. student in the genomic for infection prevention group of the Medical microbiology department under the supervision of Prof. Alex Friedrich and Dr. John Rossen. In her Ph.D. project, she worked on Shiga toxin producing *E. coli* (STEC) to establish rapid molecular diagnosis, and to perform risk assessment and detailed characterization of STEC by using high-resolution whole genome sequencing (WGS). During her research period, she learned multiple experimental techniques and gathered a lot of experiences in the field of WGS data analysis and interpretation using different bioinformatics software. Her PhD thesis will be defended on 13 February 2017 in Groningen. Currently, she is working in the same department as a postdoctoral researcher on genomics of gram-negative bacteria focusing on pathogenic *E. coli*.

List of Publications

List of Publication

1. **Ferdous M**, Kooistra-Smid AM, Zhou K, Rossen JW, Friedrich AW. Virulence, Antimicrobial Resistance Properties and Phylogenetic Background of Non-H7 Enteropathogenic *Escherichia coli* O157. *Front Microbiol.* 2016 Sep 28;7:1540.
2. **Ferdous M**, Friedrich AW, Grundmann H, de Boer RF, Croughs PD, Islam MA, Kluytmans-van den Bergh MF, Kooistra-Smid AM, Rossen JW. Molecular characterization and phylogeny of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates obtained from two Dutch regions using whole genome sequencing. *Clin. Microbiol.* 2016 *Infect.* 22:642.e1-642.e9.
3. **Ferdous M**, Zhou K, de Boer RF, Friedrich AW, Kooistra-Smid AM, Rossen JW. Comprehensive Characterization of *Escherichia coli* O104:H4 Isolated from Patients in the Netherlands. *Front Microbiol.* 2015;6:1348.
4. **Ferdous M**, Zhou K, Mellmann A, Morabito S, Croughs PD, de Boer RF, Kooistra-Smid AM, Rossen JW, Friedrich AW. Is Shiga Toxin-Negative *Escherichia coli* O157:H7 Enteropathogenic or Enterohemorrhagic *Escherichia coli*? Comprehensive Molecular Analysis Using Whole-Genome Sequencing. *J Clin Microbiol.* 2015;53(11):3530-8.
5. de Boer RF, **Ferdous M**, Ott A, Scheper HR, Wisselink GJ, Heck ME, Rossen JW, Kooistra-Smid AM. Assessing the public health risk of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* by use of a rapid diagnostic screening algorithm. *J Clin Microbiol.* 2015;53(5):1588-98.
6. Zhou K, **Ferdous M**, de Boer RF, Kooistra-Smid AM, Grundmann H, Friedrich AW, Rossen JW. The mosaic genome structure and phylogeny of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O104:H4 is driven by short-term adaptation. *Clin Microbiol Infect.* 2015;21(5):468.e7-18.
7. Fijlstra M, **Ferdous M**, Koning AM, Rings EH, Harmsen HJ, Tissing WJ. Substantial decreases in the number and diversity of microbiota during chemotherapy-induced gastrointestinal mucositis in a rat model. *Support Care Cancer.* 2015 Jun;23(6):1513-22.
8. Deurenberg RH, Bathoorn E, Chlebowicz MA, Couto N, **Ferdous M**, García-Cobos S, Kooistra-Smid AMD, Raangs EC, Rosema S, Veloo ACM, Zhou K, Friedrich AW, Rossen JWA. Application of next generation sequencing in clinical microbiology and infection prevention. *Journal of Biotechnology* <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.12.022>.
9. Moran-Gilad J, Rokney A., Danino D, **Ferdous M**, Elsana F., Baum M, Dukhan L, Agmon V, Grotto I, Rossen JWA AND Gdalevich M. Real-Time Genomic Investigation Underlying the Public Health Response to a Shiga Toxin-Producing *Escherichia Coli* O26:H11 Outbreak in a Nursery. *Submitted.*