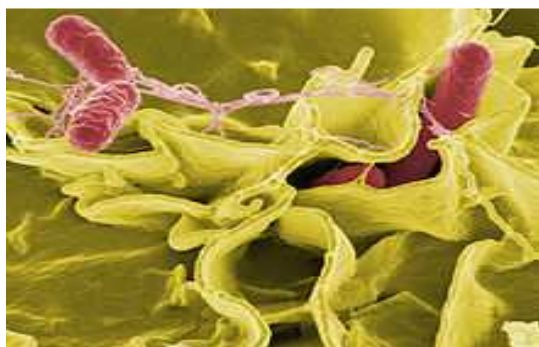


Snelle detectie van ziekteverwekkende bacteriën op groenten en fruit

Eten van verse groenten en fruit wordt vandaag de dag meer en meer aangemoedigd. Verse groenten en fruit leveren immers de nodige dosis van onze dagdagelijkse voedingsstoffen. Talrijke studies hebben aangetoond dat je door het eten van groenten en fruit een verlaagd risico hebt op verschillende chronische ziekten zoals zwaarlijvigheid, hart- en vaatziekten en bepaalde vormen van kanker. Echter, zoals overal in onze omgeving, zijn bacteriën talrijk aanwezig op groenten en fruit. De meeste van deze bacteriën zijn niet schadelijk en kunnen zelfs gunstig zijn. Er zijn echter ook bacteriën die ziektes kunnen veroorzaken. Deze zogenaamde pathogene bacteriën kunnen leiden tot een voedselinfectie bij mensen. In deze masterproef werd een nieuwe methode ontwikkeld om op een snelle manier pathogene bacteriën te detecteren in water en op groenten en fruit.

De laatste jaren worden er steeds meer voedselinfecties gerapporteerd die gerelateerd zijn aan de consumptie van verse groenten en fruit (Figuur 1). In Europa zijn verse groenten en fruit verantwoordelijk voor ongeveer 10% van het totaal aantal voedselinfecties. Veel groenten- en fruitsoorten worden immers rauw geconsumeerd zonder deze te koken.



Figuur 1: Microscopische weergave van *Salmonella* bacteriën op sla

Door groenten en fruit te koken verliezen ze wat van hun voedingswaarde, maar worden ook de aanwezige bacteriën gedood. Omdat groenten en fruit rauw worden gegeten, zullen aanwezige pathogenen of ziekteverwekkers niet gedood worden en bestaat de kans dat ze een voedselinfectie kunnen veroorzaken.

Hoe komen deze micro-organismen nu op de groenten en fruit terecht? Bacteriën kunnen tijdens de teelt via dierlijke meststoffen, de bodem, of het irrigatiewater op de vrucht of planten terechtkomen. Ook na de teelt kunnen de vruchten besmet worden door ze bijvoorbeeld te wassen of te spoelen met onzuiver water. Ook tijdens het sorteren, inpakken en het transporteren van deze groenten en het fruit kan er besmetting plaatsvinden.

Om het risico op voedselinfecties door consumptie van groenten en fruit in te schatten werd in dit onderzoek de kwaliteit van het water dat gebruikt wordt in de groente- en fruitteelt geanalyseerd. Dit water komt tijdens irrigatie, wassen, spoelen of sorteren rechtstreeks in contact met de vrucht waardoor de bacteriën in het water op de vrucht terecht kunnen komen. Het gebruik van kwaliteitsvol water is dus van groot belang. Daarom werd water onderzocht op aanwezigheid van bacteriegroepen (zoals fecale bacteriën) en specifieke ziekteverwekkers (zoals *Salmonella* en *Listeria*).

Klassieke diagnose duurt te lang

Bij de klassieke methode (Figuur 2) om bacteriën te detecteren en te identificeren, worden bacteriën opgegroeid op specifieke groeibodems, gevolgd door enkele biochemische testen. Deze methode vraagt echter heel wat werk en is tijdsrovend. Een analyse voor één bepaalde ziekteverwekker neemt al snel enkele dagen tot weken in beslag. Daarnaast bevat een staal vaak verschillende micro-organismen en zijn deze met de klassieke methoden moeilijk te onderscheiden van elkaar.

Daarom werd in dit onderzoek, uitgevoerd binnen de onderzoeksgroep "Microbiële Procesecologie en -beheersing" van de KU Leuven, een methode ontwikkeld om op een snellere en efficiëntere manier ziekteverwekkers te detecteren in water- of productstalen.



Figuur 1: Klassieke microbiologische uitplantingen

Detectie op basis van DNA

De ontwikkelde methode maakt gebruik van het DNA van de bacteriën. Elk levend wezen heeft een unieke DNA-samenstelling waarin zijn eigenschappen zijn vastgelegd. Op basis van het DNA is het dus mogelijk om specifieke ziekteverwekkers te detecteren en te identificeren.

In een eerste deel van de masterproef werd een DNA-test (de zogenaamde "DNA-multiscan[®]") ontwikkeld voor detectie van een 20-tal relevante voedselpathogenen of ziekteverwekkers, waarvan *Listeria monocytogenes*, *Legionella*, *Clostridium*, *Campylobacter*, *Escherichia coli* en *Salmonella* de bekendste zijn.

De analyse met de DNA multiscan bestaat uit twee fasen. In de eerste fase worden de bacteriën uit het water- of productstaal geïsoleerd en wordt het DNA van de bacteriën vermenigvuldigd aan de hand van een zogenaamde "polymerase chain reaction", of PCR. Tegelijkertijd wordt het DNA gemerkt met een molecule zodat het gevisualiseerd kan worden.

In een tweede fase wordt het vermenigvuldigde DNA toegevoegd aan een diagnosestrip met DNA-verklikkers. Dit is een strip waarop stukjes DNA gebonden zijn die kenmerkend zijn voor een specifieke ziekteverwekker. Indien een specifieke ziekteverwekker aanwezig is in het staal, kan het in de volgende stap binden op de overeenkomstige DNA-verklikker op de diagnosestrip. Dit kan zichtbaar gemaakt worden door een donkere vlek.

Op één diagnosestrip zijn heel veel verschillende DNA-verklikkers aangebracht die telkens overeenkomen met een andere bacterie. Aan de hand van de plaats van de donkere vlek op de diagnosestrip kan precies bepaald worden welke ziekteverwekkers in het staal aanwezig zijn (Figuur 3).

| | A | B | C | D | E |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | ● | ● | | | |
| 2 | | | | | |
| 3 | | | | | |
| 4 | | | | | |
| 5 | | | | | |

Figuur 2: Voorbeeld van een diagnosestrip waarbij elke donkere vlek overeenkomt met de aanwezigheid van een specifieke pathogene bacterie. Op positie A1 en B1 zitten DNA-verklikkers op de diagnosestrip die overeenkomen met *Listeria*. Op positie A2 en B2 zitten DNA-verklikkers gebonden die overeenkomen met *Salmonella*. Het bewuste staal test dus positief voor *Listeria* en negatief voor *Salmonella*.

De DNA-multiscan[®] die werd ontwikkeld in dit onderzoek, is met een analysetijd van ongeveer 36 uur veel sneller dan de klassieke detectiemethode. Hoewel je voor deze test gespecialiseerde apparatuur nodig hebt, is het een relatief eenvoudige methode. Bovendien kunnen er met de ontwikkelde methode in één enkele analyse een 20-tal ziekteverwekkers worden gedetecteerd. Dit is een grote stap vooruit ten opzichte van de klassieke methode waarbij er voor elke ziekteverwekker een afzonderlijke test moet worden ingezet. Daarnaast is het mogelijk op een snelle en eenvoudige manier kwaliteitscontroles te kunnen uitvoeren en de kwaliteit van het water dat gebruikt wordt in de groente- en fruitteelt te bepalen.

Gebruik van de DNA-test in de praktijk

In een tweede deel van de masterproef werd deze nieuwe DNA-gebaseerde detectiemethode gebruikt om de

waterkwaliteit na te gaan in de groente- en fruitteelt. De DNA-test werd gebruikt om meer dan 200 waterstalen, afkomstig van een 80-tal groente- en fruittelers te analyseren. Op deze manier werd een goed beeld gevormd rond de kwaliteit van het proceswater in de Belgische groente- en fruitsector en het daaraan gekoppelde risico voor de voedselveiligheid. Algemeen kon vastgesteld worden dat de geanalyseerde waterstalen ruimschoots voldeden aan de vereiste normen. In de Belgische groente- en fruitteelt, lijkt het risico op overdracht van bacteriën aanwezig in het proceswater op groenten en fruit miniem.

Lien Bosmans