

BTO 2014.204(s) | December 2013

BTO rapport

Mogelijkheden voor
ontwikkeling van een
qPCR methode voor
pathogene *Fusarium*
soorten

BTO

Mogelijkheden voor ontwikkeling van een qPCR methode voor pathogene *Fusarium* soorten

BTO 2014.204(s) | Februari 2014

Opdrachtnummer

B222001-028

Projectmanager

Gerard van den Berg

Opdrachtgever

BTO- Verkennend onderzoek

Kwaliteitsborger

Paul van der Wielen

Auteur

Leo Heijnen

Verzonden aan

Dit rapport is selectief verspreid onder medewerkers van BTO-participanten en is verder niet openbaar.

Jaar van publicatie
2014

Meer informatie

T 030-6069743
E leo.heijnen@kwrwater.nl

PO Box 1072
3430 BB Nieuwegein
The Netherlands

T +31 (0)30 60 69 511
F +31 (0)30 60 61 165
E info@kwrwater.nl
I www.kwrwater.nl



BTO | December 2013 © KWR

Alle rechten voorbehouden.
Niets uit deze uitgave mag worden veeelvoudigd, opgeslagen in een geautomatiseerd gegevensbestand, of openbaar gemaakt, in enige vorm of op enige wijze, hetzij elektronisch, mechanisch, door fotokopieën, opnamen, of enig andere manier, zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van de uitgever.

Inhoud

Inhoud	2
1 Inleiding	3
1.1 Achtergrond	3
1.2 <i>Fusarium</i> als ziekteverwekker en de relatie met water	3
2 Methoden	5
2.1 Literatuuronderzoek: qPCR methoden voor detectie van <i>FOSC</i> en <i>FSSC</i>	5
2.2 Verbeterde qPCR methoden voor detectie van <i>FSSC</i> en <i>FOSC</i>	7
2.3 Vervolgstappen voor ontwikkeling van qPCR methoden	10
3 Conclusies	11
4 Literatuur	12

1 Inleiding

1.1 Achtergrond

Het voorkomen van ziekteverwekkende micro-organismen vormt een potentieel risico voor de gezondheid van de consument en voor de betrouwbaarheid van drinkwater zonder desinfectieresidu. In het BTO heeft de afgelopen jaren onderzoek plaatsgevonden naar opportunistische pathogenen in drinkwater, omdat opwarming van het drinkwater door klimaatverandering en een toename van het aantal mensen met een verzwakt immuunsysteem in onze maatschappij twee trends zijn die kunnen resulteren in een stijging van het aantal infecties met opportunistische ziekteverwekkers via drinkwater. In dat BTO-onderzoek is ook aandacht geweest voor ziekteverwekkende schimmels die in staat zijn om zich in drinkwater te vermeerderen. Hierbij was de focus voornamelijk gericht op het detecteren van de ziekteverwekkende schimmel *Aspergillus fumigatus* in drinkwater. BTO-onderzoek in samenwerking met het CentraalBureau voor Schimmelcultures (CBS) heeft echter laten zien dat met kweekmedia ook ziekteverwekkende *Fusarium*-soorten worden aangetroffen in drinkwater. *Fusarium*-soorten worden in de wetenschappelijke literatuur ook beschreven als pathogenen die zich mogelijk via drinkwaterinstallaties kunnen verspreiden (Anaissie et al. 2001, Short et al. 2011, Scheel et al. 2013, Mesquita-Rocha et al. 2013). Het kwantitatief detecteren van schimmelsoorten met kweekmedia heeft echter zijn limitaties omdat er geen selectief medium voor *Fusarium* is, de kweekmethode tijdrovend en arbeidsintensief is, mogelijk niet alle *Fusarium*-stammen in drinkwater kweekbaar zijn en kweekgegevens van schimmels niet kwantitatief zijn, omdat meerdere cellen één kolonie kunnen vormen. Om het risico op ziekteverwekkende *Fusarium* in drinkwater te kunnen beoordelen zijn daarom alternatieve detectiemethoden nodig. Een dergelijke alternatieve methode is een specifieke en kwantitatieve PCR methode die alle *Fusarium*-soorten, en de mens-pathogene *Fusarium* in het bijzonder, in drinkwater kan detecteren. Het gebruik van dergelijke PCR-methoden zorgt ervoor dat de drinkwatersector verder is voorbereid op eventuele toekomstige bedreigingen van de drinkwaterkwaliteit.

1.2 *Fusarium* als ziekteverwekker en de relatie met water

Fusarium schimmels zijn vooral bekend als verwekkers van ziekte bij verschillende plantensoorten. *Fusarium* kan de wortels van planten aantasten waardoor de plant sterft. *Fusarium* kan daardoor grote problemen veroorzaken in broeikassen, tropische tuinen en kwekerijen, dat kan leiden tot grote economische schade. Het is bekend dat bepaalde *Fusarium*-soorten ook kunnen zorgen voor infecties bij mensen met een verzwakt immuunsysteem (Walsh et al. 2004, Anaissie et al. 1986). Vooral "Multilocus-Sequencebased-Typing" (MLST) wordt tegenwoordig gebruikt om geïsoleerde stammen te identificeren (Databases: <http://www.cbs.knaw.nl/fusarium/> en <http://isolate.fusariumdb.org>) en op basis van MLST identificatie zijn er zijn meer dan 200 *Fusarium* soorten beschreven. Deze soorten zijn verdeeld in tien phylogenetische "soorten complexen" (O'Donnell et al. 2010) en deze "soorten-complexen" worden gebruikt voor het identificeren van onbekende *Fusarium* soorten. Slechts een beperkt aantal *Fusarium* soorten wordt in verband gebracht met het veroorzaken van ziekte bij mensen. Ziektegevallen kunnen variëren van oppervlakkige wondinfecties, ooginfecties, infecties via katheters in ziekenhuizen en luchtweginfecties (Nucci and Anaissie 2007). Deze infecties kunnen, vooral bij mensen met verminderde weerstand aanleiding geven tot tot zeer ernstige levensbedreigende infecties (Walsh et al. 2004). Om een indruk te krijgen over de belangrijkste humaanpathogene *Fusarium* soorten en de relatie met drinkwater is MLST

toegepast voor het identificeren van de ziekteverwekkende Fusaria en *Fusarium* stammen uit drinkwaterinstallaties.

In een studie naar het voorkomen van *Fusarium* soorten in de afvoer van gootstenen afvoeren van drinkwaterinstallaties (Short et al. 2011) wordt *Fusarium* aangetroffen bij het grootste deel van de monsterlocaties (in 66% van de 471 onderzochte gootstenen in 82% van de 131 onderzochte gebouwen). Het grootste deel (62%) van de geïsoleerde *Fusarium* stammen blijkt verwant te zijn aan *Fusarium solani* en daarmee te behoren tot het "*Fusarium solani* species complex" (FSSC) en een kleiner deel (29%) is meer verwant aan *Fusarium oxysporum* en behoren daarmee tot het "*Fusarium oxysporum* species complex" (FOSC); de overige stammen behoren tot het *Fusarium dimerum* species complex (FDSC, 8%) en *Fusarium incarnatum* complex (7%, FIESC). Als deze verdeling van soorten wordt vergeleken met de soortenverdeling van *Fusarium* infecties bij mensen wordt een vergelijkbare verdeling van de verschillende "species-complexen" gevonden. Bovendien is een deel van de stammen uit gootstenen genetisch zeer verwant met de stammen uit patiënten, zodat een verband tussen het voorkomen van *Fusarium* soorten in water en ziektegevallen waarschijnlijk is. Ook bij een onderzoek in een Braziliaans ziekenhuis (Scheel et al. 2013) zijn aanwijzingen gevonden voor de relatie tussen *Fusarium* soorten die voorkomen op oppervlakten die in contact komen met water (zoals douchekoppen, douchevloeren en gootstenen) en *Fusarium* bij patiënten. Bij patiënten worden, net als in de studie van Short et al. (Short et al. 2011), vooral infecties met FSSC (ca. 90%) en FOSC (ca. 6%) aangetoond en worden deze soorten ook op verschillende plaatsen in het ziekenhuis waarin deze patiënten zijn opgenomen aangetoond (36% FSSC en 50% FOSC).

Ook bij een studie in Italië (Migheli et al. 2010), waarbij *Fusarium* stammen zijn geïdentificeerd bij dermatologische aandoeningen, zijn vooral FSSC en FOSC stammen aangetroffen, maar in deze studie zijn ook *Fusarium fujikuroi* (GFSC) stammen geïsoleerd.

Deze onderzoeksresultaten geven sterke aanwijzingen voor de het belang van FSSC en FOSC als veroorzakers van *Fusarium* infecties bij mensen en geven ook aan dat er een relatie is tussen de aanwezigheid van FSSC en FOSC in drinkwaterinstallaties (bij ziekenhuizen) en het optreden van infecties. Het onderzoek naar het voorkomen van mens-pathogene *Fusarium* soorten in drinkwaterinstallaties zal zich dus vooral moeten richten op soorten behorende tot FSSC en FOSC.

2 Methoden

Voor de ontwikkeling van qPCR methoden waarmee *Fusarium* schimmels kunnen worden gekwantificeerd in watermonsters is eerst in de wetenschappelijke literatuur gezocht naar methoden voor het detecteren van "alle" *Fusarium* soorten en methoden waarmee specifiek de soorten kunnen worden aangetoond die behoren tot de *Fusarium solani* (FSSC) en *Fusarium oxysporum* (FOSC) complexen. De mogelijkheden van de beschreven methoden zijn in detail bestudeerd door de beschreven resultaten kritisch te bekijken en door de mogelijkheden en beperkingen van de beschreven synthetische DNA-moleculen (primers), m.b.v. bioinformatica-software en sequentiedatabases, te onderzoeken.

2.1 Literatuuronderzoek: qPCR methoden voor detectie van FOSC en FSSC

Edel et al. 2000: *Fusarium oxysporum*

In het artikel van Edel et al. (Edel et al. 2000) worden twee PCR primers en een probe beschreven voor specifieke detectie van *Fusarium oxysporum*. Met de twee primers (PFO3 en PFO2) wordt een fragment van het 28S rRNA gen geamplificeerd. Een probe HFO1 wordt gebruikt om het gevormde PCR-fragment specifiek te kleuren m.b.v. een dot blot hybridisatie. De specificiteit van de PCR is, in combinatie met de probe, bevestigd op het DNA van een groot aantal *Fusarium* stammen. De methode is bedoeld om gekweekte stammen te identificeren, niet voor het direct detecteren van *Fusarium* in milieumonsters. Voor zover bekend is de methode niet verder toegepast in gepubliceerd vervolgonderzoek. De sequenties van de primers en probe:

Primer PFO2: 5'-CCCAGGGTATTACACGGT-3'

Primer PFO3: 5'-CGGGGGATAAAGGCGG-3'

Probe HFO1: 5'-TAGCCCACCGTGTAAATACCC-3'

Met het uitvoeren van een Blast analyse is de specificiteit van de primers in meer detail onderzocht. De PFO2 primer is vrij specifiek voor *Fusarium oxysporum*, de sequenties van enkele andere schimmels (*Scytalidium*, *Colletotrichum*) en enkele andere *Fusarium* soorten (*Fusarium beomiform*, *Fusarium inflexum*, *Fusarium concolor*, *Fusarium polyphialidicum*, *Fusarium nisikadoi*) komen volledig overeen met de sequentie van PFO2 en bij een aantal andere (o.a. *Fusarium commune*, *Fusarium redolens*) *Fusarium* soorten is het sequentieverschil slechts één nucleotide. De PFO3 primer is niet specifiek voor *Fusarium oxysporum* maar de sequentie van deze primer komt volledig overeen met de corresponderende sequentie van een groot aantal verschillende schimmels, waaronder *F. oxysporum*. Ook de sequentie van de HFO1probe komt voor in het 23S rRNA gen van een groot aantal verschillende schimmels (inclusief *F. oxysporum*).

Conclusie:

Vanwege de beperkte specificiteit van de PFO3 primer en de HFO1 probe is niet te verwachten dat deze methode geschikt zal zijn voor het specifiek detecteren van *Fusarium oxysporum* in watermonsters. Er wordt verwacht dat met dit primerpaar en deze probe ook andere schimmels zullen worden gedetecteerd. De Blast analyse maakt wel duidelijk dat er zeer veel 23S rRNA gensequenties van *Fusarium* soorten en andere schimmels beschikbaar zijn. Wellicht is het mogelijk om een alternatieve PFO3 primer en een andere probe te ontwerpen waarmee, i.c.m. PFO2, *Fusarium oxysporum* wel specifiek kan worden gedetecteerd.

Arif et al. 2012: *Fusarium* en *Fusarium solani* (FSSC)

In het artikel van Arif et al. (Arif et al. 2012) worden primersets beschreven voor algemene detectie van "alle" *Fusarium* soorten en voor specifieke detectie van alleen de soorten die behoren tot het *Fusarium solani* complex (FSSC). Bij de vijf PCR methoden die in dit artikel worden beschreven, is gebruikt gemaakt van primers waarmee een fragment van het gen dat codeert voor de "Transcription elongation factor 1a" (TEF-1a) en fragmenten van de ITS subunit van het 18S rRNA gen worden vermenigvuldigd. De methoden zijn ontwikkeld voor het identificeren van gekweekte schimmels en zijn slechts getest op een beperkt aantal schimmelstammen.

Primer TEF-Fs4f: 5'-ATCGGCCACGTCGACTCT-3'

Primer TEF-Fs4r: 5'-GGCGTCTGTTGATTGTTAGC-3'

Fragment 658 bp, zou specifiek voor TEF-1A gen van FSSC moeten zijn.

Uit een analyse met het programma Blast volgt dat de TEF-Fs4F primer specifiek is voor *Fusarium*, dus niet voor FSSC alleen. De TEF-Fs4r primer is wel specifiek voor FSSC. Maar, met deze primer is het te verwachten dat (t.g.v. één mismatch in het laatste nucleotide van de primer) het DNA van een deel van de FSSC soorten minder efficiënt wordt geamplificeerd. Mogelijk kan de sequentie van deze primer enigszins worden aangepast en kan deze primer i.c.m. een alternatieve forward primer (voor amplificatie van een kleiner fragment) zorgen voor betere en specifiekere detectie van *F. solani*.

Primer ITS-Fu2f: 5'-CCAGAGGACCCCCTAACTCT-3''

Primer ITS-Fu2r: 5'-CTCTCCAGTTGCGAGGTGTT-3'

Fragment 595 bp, zou specifiek voor ITS1 regio van rRNA gen van FSSC moeten zijn

Uit een analyse met het programma Blast volgt dat de ITS-Fu2f primer vooral specifiek is voor *Fusarium*, dus niet voor FSSC alleen, deze primer is, in combinatie met een andere reverse primer ook toegepast voor directe detectie van *Fusarium* in grondmonsters in recenter onderzoek (Mishra et al. 2013a, Mishra et al. 2013b). De ITS-Fu2r primer is vooral specifiek voor *F. solani* maar er worden ook "hits" gevonden met DNA van schimmels met andere namen. Het is echter niet duidelijk of dit problemen zijn met naamgeving van de databasesequenties of dat dit het gevolg is van niet-specifieke primersequenties. Van beide primers kunnen verder onderzocht worden of er mogelijkheden zijn voor de ontwikkeling van primers waarmee een korter fragment met grotere specificiteit kan worden geamplificeerd.

Primer ITS-Fs5f: 5'-CGTCCCCAAATACAGTGG-3''

Primer ITS-Fs5r: 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGCTT-3'

Fragment 485 bp, zou specifiek voor ITS regio van rRNA gen van *F. solani* moeten zijn.

Uit een analyse met het programma Blast volgt dat de ITS-Fs5f primer vooral specifiek is voor FSSC. De ITS-Fs5r is zeer algemeen, deze primer bindt aan zeer veel verschillende schimmelsoorten waaronder *Fusarium*. De ITS-Fs5f is, in combinatie met een andere reverse primer mogelijk toepasbaar voor de ontwikkeling van een specifieke qPCR voor *F. solani*.

Primer TEF-Fu3f: 5'-GGTATCGACAAGCGAACCAT-3''

Primer TEF-Fu3r: 5'-TAGTAGCGGGGAGTCTCGAA-3'

Fragment 420 bp, zou specifiek voor TEF-1a gen van *Fusarium* spp, moeten zijn

Uit een analyse met het programma Blast volgt dat de TEF-Fu3r primer goed past op een sequenties van een grote collectie *Fusarium* soorten, bij een beperkt aantal soorten is een mismatch in het midden van de primer (dit heeft wellicht weinig invloed op de efficiëntie van amplificatie). De TEF-Fu3f primer is ook zeer specifiek voor *Fusarium*. Met deze PCR lijkt het dus mogelijk om een *Fusarium*-specifiek fragment van het TEF-1a gen te amplificeren, de sequentie van dit fragment is ook geschikt om *Fusarium* tot soortsniveau te identificeren.

Conclusie:

De, door Arif et al. (2012), ontwikkelde primers zijn, vanwege amplificatie van lange fragmenten, niet direct geschikt voor gevoelige kwantitatieve detectie met qPCR. De primers kunnen mogelijk wel als startpunt dienen voor de ontwikkeling van qPCR methoden voor detectie van *Fusarium* en *Fusarium solani*.

He et al. 2011: *Fusarium solani*

In dit artikel (He et al. 2011) wordt een primerpaar beschreven waarmee een kenmerkend fragment van *Fusarium solani* wordt geamplificeerd. Deze methode is vooral ontwikkeld voor het identificeren van schimmels bij ooginfecties

Primer fFuso1: 5'-CTCTGTTAATAATGCAACTC-3''

Primer rFuso2: 5'-TGGTACTATAGCTGGAGGA-3'

Fragment 330 bp, zou specifiek voor *Fusarium solani* moeten zijn.

Uit een Blast analyse van de primersequenties blijkt dat de sequentie van de rFuso2 primer overeenkomt met een sequentiefragment van het mitochondriaal genoom van *Fusarium solani*. In de database is echter maar één sequentie van één *Fusarium solani* bekend, er is dus niet te beoordelen of deze primer bruikbaar is voor detectie van alle *Fusarium solani* stammen. De sequentie van de fFuso1-primer heeft geen "perfecte-match" met een sequentie uit de database.

Conclusie:

Het is niet geheel duidelijk wat er te verwachten is van dit primerpaar, voor verder onderzoek is het niet aan te bevelen om de mogelijkheden van dit primerpaar uitgebreid te onderzoeken.

2.1.1 Conclusies gepubliceerde methoden

Op basis van bovenstaande analyse van gepubliceerde methoden voor detectie van *Fusarium* spp., FSSC en FOSC is niet te verwachten dat deze methoden geschikt zullen zijn voor gevoelige en specifieke detectie van pathogene *Fusarium* soorten in (drink)water. De in de literatuur beschreven PCR methoden voor detectie van FOSC en FSSC zijn vooral ontwikkeld voor het identificeren van gekweekte *Fusarium* stammen (in situaties waar veel DNA van *Fusarium* aanwezig is), maar deze methoden zijn waarschijnlijk niet in staat zijn om *Fusarium* met hoge gevoeligheid te detecteren in (drink)watermonsters (met weinig DNA van *Fusarium* en veel DNA van andere organismen).

2.2 Verbeterde qPCR methoden voor detectie van FSSC en FOSC

Het is te verwachten dat de gepubliceerde methoden niet geschikt zijn voor het specifiek en gevoelig detecteren van pathogene *Fusarium* soorten in (drink)water. Daarom is gezocht naar alternatieve mogelijkheden voor de ontwikkeling van primers waarmee specifieke en gevoelige qPCR methoden kunnen worden ontwikkeld voor detectie van FOSC en FSSC. Voor deze ontwikkeling is in eerste instantie de mogelijkheid onderzocht voor de ontwikkeling van primers op basis van twee verschillende genen waar sequenties van het 18S rRNA gen en TEF-1a gen van een groot aantal *Fusarium* soorten beschikbaar zijn in de internationale database.

Primers op basis van het 18S rRNA gen

Het 18S rRNA gen is het meest gebruikt gen op basis waarvan eukaryote organismen kunnen worden geclassificeerd en dit gen is toegepast voor de ontwikkeling van PCR-methoden voor een groot aantal eukaryoten. Het bioinformatica programma "ARB" (Ludwig et al. 2004) bevat een database met 18S rRNA sequenties (en bacteriële 16S rRNA) van een groot aantal

verschillende eukaryote organismen en software om deze sequenties te vergelijken en allignen. Om te beoordelen of het mogelijk is om FOOSC en FSSC specifieke primers te ontwikkelen waarmee een fragment van het 18S rRNA gen wordt geamplificeerd, is eerst de beschikbare ARB-database uitgebreid met een groot aantal 18S rRNA gensequenties van *Fusarium* soorten (afkomstig van de Silva database (Pruesse et al. 2007, Quast et al. 2013). Vervolgens zijn deze toegevoegde gensequenties gealligned met de sequenties in de ARB-database en is een phylogenetische boom gemaakt waaraan deze *Fusarium* sequenties zijn toegevoegd. Op basis van de allignment en de phylogenetische boom is onderzocht of er regio's in de sequenties zijn op basis waarvan de ontwikkeling van FOOSC en FSSC specifieke primers mogelijk is.

De positionering van 18S rRNA gensequenties van verschillende FOOSC laat zien dat de sequenties van deze stammen niet clusteren op één plaats in de phylogenetische boom, de sequenties komen verspreid over een deel van de boom voor en worden onderbroken door 18S rRNA gensequenties van andere *Fusarium* soorten. De clustering van 18S rRNA gensequenties van FSSC is vergelijkbaar, ook deze sequenties komen verspreid over de boom voor. Dit betekent dat de 18S rRNA sequenties van FOOSC en FSSC stammen niet geconserveerd zijn waardoor er geen FOOSC en FSSC specifieke primers te ontwikkelen zijn. Mogelijk is dit onverwachte resultaat het gevolg van onvolkomenheden in de databases en onjuiste naamgeving van verschillende *Fusarium* stammen.

Conclusie:

Op basis van bovenstaande analyses lijkt het 18S rRNA gen niet geschikt voor het ontwikkelen van FOOSC en FSSC specifieke primers.

Primers op basis van het TEF-1a gen

Het TEF-1a gen is één van de genen waarvan de sequentie gebruikt wordt voor het classificeren van *Fusarium* stammen met MLST (O'Donnell et al. 2010, Geiser et al. 2004). Van een groot aantal *Fusarium* stammen, behorende tot verschillende "species complexen", zijn de sequenties van het TEF-1a gen beschikbaar en data van een aantal publicaties (O'Donnell et al. 2010, O'Donnell et al. 2004) maakt duidelijk dat deze sequenties bruikbaar zijn voor het identificeren van *Fusarium* stammen uit verschillende "species complexen". Een beperkt aantal gepubliceerde TEF-1a gensequenties zijn verzameld in een database van het programma Bionumerics en een allignment is geconstrueerd van deze verzamelde sequenties. Deze allignment maakt duidelijk dat er veel sequentievariatie is tussen TEF-1a gensequenties van verschillende *Fusarium* soorten, waardoor deze sequenties bruikbaar zijn voor het ontwerpen van soort-specifieke primers, maar niet voor het ontwikkelen van primers waarmee alle *Fusarium* soorten kunnen worden gedetecteerd. De allignment is daarom gebruikt voor het ontwerpen van FOOSC en FSSC specifieke primers en probes. Om enig inzicht te krijgen in de mogelijke specificiteit van de ontworpen primers zijn er aansluitend Blast analyses uitgevoerd met de sequenties van de ontworpen primers op de sequentiedatabase van NCBI. Er zijn veel TEF-1a gensequenties van een groot aantal verschillende *Fusarium* soorten in de NCBI database, zodat te verwachten is dat deze Blast analyse een vrij goed inzicht geeft in de specificiteit van de primers.

FOOSC specifieke primers

Forward primer: 5'-CTCGAGACCAAAAATTTTGAAT-3'

- o De primersequentie is zeer specifiek voor FOOSC. De primer zal perfect passen op alle bekende sequenties van FOOSC stammen en niet op de bekende sequenties van andere *Fusarium* soorten. De primer past gedeeltelijk op het DNA van een aantal andere *Fusarium* soorten maar het laatste deel (3'uiteinde) van de primer (de laatste 2 nucleotiden) passen

echter niet, zodat te verwachten is dat deze primer niet in staat is om een PCR-fragment te vormen met andere *Fusarium* soorten.

Reverse primer: 5'-GTTGAATGGTTAGTACTGC-3'

- o Ook deze primer is zeer specifiek voor FOSC. De primer past perfect op het DNA van alle FOSC stammen waarvan sequenties in de database beschikbaar zijn. Een beperkt aantal andere *Fusarium* soorten heeft minimaal 2 nucleotiden verschil aan het 5'uiteinde. Het kan daardoor niet worden uitgesloten dat de primer ook kan binden aan het DNA van deze andere soorten, maar het is valt te verwachten dat de efficiëntie dan beduidend lager is.

Probe: 5'-TGACCGTAATTTTTTGGTGGGGCA-3'

- o De sequentie van deze probe komt perfect overeen met de TEF-1a gensequentie van FOSC en is dus bruikbaar om FOSC-specifieke PCR fragmenten zichtbaar te maken. Deze sequentie komt echter ook overeen met de TEF-1a sequentie van een aantal andere *Fusarium* soorten behorende tot het *Gibberella fujikuroi* Fusarium-species complex GFSC groep (o.a. *F. proliferatum*, *F. temperatum*, *F. subglutinans*, *F. nyagamae*). In combinatie met de zeer specifieke PCR-primers valt echter niet te verwachten dat de probe aanleiding zal geven tot vals-positieve reacties. Wellicht geeft de lange keten van T-nucleotiden in het midden van de primer enige problemen met de efficiëntie van de PCR.

Fragment: met deze primers wordt er een fragment van ca. 90 bp. geamplificeerd, een optimale lengte voor een efficiënte qPCR.

Conclusie:

Het is te verwachten dat deze primersequenties in combinatie met de probesequentie de basis kunnen vormen voor de ontwikkeling van een specifieke en gevoelige qPCR methode. Voor de uiteindelijke ontwikkeling kunnen, t.b.v. optimalisatie van de reactieomstandigheden, meerdere primer-sequentievataties die op kleine onderdelen afwijken van de hierboven voorgestelde primersequenties worden getest.

FSSC specifieke primers

Forward primer: 5'-CATTTACCCCGCCACTCGGG-3'

- o De sequentie van deze primer komt perfect overeen met de TEF-1a gensequentie van een zeer groot aantal FSSC stammen. Vreemd genoeg komt de sequentie ook overeen met een sequenties van meerdere isolaten van *Nectria ipamoeae* (een zeer zeldzame paddenstoel: kasmeniezwammetje), maar DNA van deze paddenstoel wordt niet verwacht in drinkwater. Sequenties van andere *Fusarium* soorten hebben in alle gevallen mismatches aan het 3'-uiteinde van de primer zodat amplificatie in die gevallen zeer onwaarschijnlijk wordt.

Reverse primer: 5'-AGCGGCTTCCTATTGTTG-3'

- o De sequentie van deze primer komt perfect overeen met de TEF-1a gensequentie van FSSC stammen. Maar ook enkele andere *Fusarium* soorten hebben een TEF-1a gensequentie waaraan deze primer kan binden. De primer kan ook binden aan een *Nectria*-soort, maar is waarschijnlijk niet in staat om te binden aan het DNA van *Nectria ipamoeae*.

Probe: 5'-ACAAAGCCCTGATCCCTGCACAC-3'

- o De sequentie van deze probe is zeer specifiek voor FSSC maar de probe zal ook kunnen binden aan het DNA van *Nectria ipamoeae*.

Conclusie:

Het is te verwachten dat deze combinatie van forward- en reverse-primer bruikbaar is voor specifieke detectie van FSSC. De reverse primer kan ook binden aan het DNA van een aantal andere *Fusarium* soorten, maar in combinatie met de forward primer, die zeer specifiek is voor FSSC, is niet te verwachten dat het DNA van andere *Fusarium* soorten efficiënt kan worden vermenigvuldigd en vervolgens kan worden gedetecteerd met de specifieke probe. Mogelijk kunnen er kruisreacties optreden met het DNA van de *Nectria ipamoeae* paddenstoel maar, door een reverse primer die niet optimaal bindt is niet te verwachten dat dit efficiënt zal kunnen gebeuren. Daarnaast is het ook zeer onwaarschijnlijk dat er cellen of sporen van deze zeldzame paddenstoel voorkomen in het drinkwater.

Primers op basis van andere genetische targets

Op basis van bovenstaand onderzoek lijken TEF-1a genspecifieke primers geschikt voor de ontwikkeling van de mens-pathogene *Fusarium* soorten FOSC en FSSC. Maar, uit experimenteel werk moet nog blijken of dit werkelijk zo is. Als de specificiteit van de TEF-1a primers niet voldoet aan de verwachtingen, dan zijn er nog diverse andere genetische targets beschikbaar op basis waarvan de ontwikkeling van alternatieve primers wellicht mogelijk is. De MLST databases die gebruikt worden voor (o.a.) het identificeren van gekweekte *Fusarium* stammen (<http://isolate.fusariumdb.org> en <http://www.cbs.knaw.nl/fusarium/>) bevatten sequenties van een aantal genen van een groot aantal verschillende *Fusarium* soorten. De sequenties uit deze databases kunnen eventueel gebruikt worden voor de ontwikkeling van alternatieve primersets, maar dit valt buiten het doel van dit kort verkennend onderzoeksproject.

2.2.1 Conclusies nieuw ontworpen primer

De nieuw ontworpen primersequenties zijn waarschijnlijk bruikbaar voor de ontwikkeling van qPCR methoden waarmee de mens-pathogene *Fusarium* soorten complexen FOSC en FSSC specifiek en kwantitatief kunnen worden gedetecteerd. Experimenteel werk moet uitwijzen of dit werkelijk het geval is.

2.3 Vervolgstappen voor ontwikkeling van qPCR methoden

De volgende stappen zullen moeten worden ondernomen voor de ontwikkeling van qPCR methoden voor detectie van mens-pathogene *Fusarium* in (drink)water:

- Optimalisatie van primersequenties en reactieomstandigheden:
 - o Op basis van bovenstaande primersequenties worden verschillende primervariaties getest op DNA van *Fusarium*.
 - o Verschillende reactieomstandigheden worden getest om de PCR-reacties zo efficiënt mogelijk te laten verlopen.
- Testen van de specificiteit:
 - o Hiervoor worden PCR-reacties uitgevoerd op DNA van verschillende *Fusarium* soorten en op DNA van andere organismen.
 - o Bij onvoldoende specificiteit zullen er nieuwe primersequenties moeten worden ontworpen.
- Ontwikkeling van een ijklijn t.b.v. kwantificatie:
 - o DNA-suspensies, waarin het kenmerkende PCR-fragment van *Fusarium* aanwezig is, wordt nauwkeurig gekwantificeerd en verdunningsreeksen van deze suspensie worden gebruikt voor het genereren van ijklijnen.
- Toepassing in de praktijk:
 - o De methode wordt in de praktijk getest: bij voorkeur op watermonsters waarin *Fusarium* is aangetoond en monsters waarin geen *Fusarium* verwacht wordt.

3 Conclusies

- De *Fusarium* soorten behorende tot het *Fusarium solani* en het *Fusarium oxysporum* species complex (FSSC en FOSC) zijn de belangrijkste mens-pathogene *Fusarium* soorten.
- Van FSSC en FOSC kan de relatie met infecties via contact met (drink)water met FSSC en FOSC niet worden uitgesloten.
- Voor specifieke directe detectie van FSSC en FOSC in water zijn geen goede qPCR methoden beschreven in de wetenschappelijke literatuur. Wel zijn er methoden beschikbaar voor het identificeren van gekweekte *Fusarium* schimmels.
- De ontwikkeling van primersequenties voor FOSC en FSSC specifieke qPCR methoden op basis van sequenties het 18S rRNA gen is onderzocht, maar lijkt niet mogelijk.
- Voor de ontwikkeling van FOSC en FSSC specifieke qPCR methoden op basis van het TEF-1a gen zijn de mogelijkheden onderzocht en zijn veelbelovende primer- en probe-sequenties ontworpen.
- Experimenteel vervolgonderzoek moet uitwijzen of deze primersequenties bruikbaar zijn voor de ontwikkeling van specifieke qPCR methoden voor gevoelige detectie van FOSC en FSSC in (drink)water.

4 Literatuur

- Anaissie, E.J., Kuchar, R.T., Rex, J.H., Francesconi, A., Kasai, M., Muller, F.M., Lozano-Chiu, M., Summerbell, R.C., Dignani, M.C., Chanock, S.J. and Walsh, T.J. (2001) Fusariosis associated with pathogenic fusarium species colonization of a hospital water system: a new paradigm for the epidemiology of opportunistic mold infections. *Clin Infect Dis* 33(11), 1871-1878.
- Short, D.P., O'Donnell, K., Zhang, N., Juba, J.H. and Geiser, D.M. (2011) Widespread occurrence of diverse human pathogenic types of the fungus *Fusarium* detected in plumbing drains. *J Clin Microbiol* 49(12), 4264-4272.
- Scheel, C.M., Hurst, S.F., Barreiros, G., Akiti, T., Nucci, M. and Balajee, S.A. (2013) Molecular analyses of *Fusarium* isolates recovered from a cluster of invasive mold infections in a Brazilian hospital. *BMC Infect Dis* 13, 49.
- Mesquita-Rocha, S., Godoy-Martinez, P.C., Goncalves, S.S., Urrutia, M.D., Carlesse, F., Seber, A., Silva, M.A., Petrilli, A.S. and Colombo, A.L. (2013) The water supply system as a potential source of fungal infection in paediatric haematopoietic stem cell units. *BMC Infect Dis* 13(1), 289.
- Walsh, T.J., Groll, A., Hiemenz, J., Fleming, R., Roilides, E. and Anaissie, E. (2004) Infections due to emerging and uncommon medically important fungal pathogens. *Clin Microbiol Infect* 10 Suppl 1, 48-66.
- Anaissie, E., Kantarjian, H., Jones, P., Barlogie, B., Luna, M., Lopez-Berestein, G. and Bodey, G.P. (1986) *Fusarium*. A newly recognized fungal pathogen in immunosuppressed patients. *Cancer* 57(11), 2141-2145.
- O'Donnell, K., Sutton, D.A., Rinaldi, M.G., Sarver, B.A., Balajee, S.A., Schroers, H.J., Summerbell, R.C., Robert, V.A., Crous, P.W., Zhang, N., Aoki, T., Jung, K., Park, J., Lee, Y.H., Kang, S., Park, B. and Geiser, D.M. (2010) Internet-accessible DNA sequence database for identifying fusaria from human and animal infections. *J Clin Microbiol* 48(10), 3708-3718.
- Nucci, M. and Anaissie, E. (2007) *Fusarium* infections in immunocompromised patients. *Clin Microbiol Rev* 20(4), 695-704.
- Migheli, Q., Balmas, V., Harak, H., Sanna, S., Scherm, B., Aoki, T. and O'Donnell, K. (2010) Molecular phylogenetic diversity of dermatologic and other human pathogenic fusarial isolates from hospitals in northern and central Italy. *J Clin Microbiol* 48(4), 1076-1084.
- Edel, V., Steinberg, C., Gautheron, N. and Alabouvette, C. (2000) Ribosomal DNA-targeted oligonucleotide probe and PCR assay specific for *Fusarium oxysporum*. *Mycol. Res.* 104(5).
- Arif, M., Chawla, S., Zaidi, N.W., Rayar, J.K., Variar, M. and Singh, U.S. (2012) Development of specific primers for the genus *Fusarium* and *F. solani* using rDNA sub-unit and transcription factor (TEF-1a) gene. *African Journal of Biotechnology* 11(2), 444-447.
- Mishra, R.K., Pandey, B.K., Muthukumar, M., Pathak, N. and Zeeshan, M. (2013a) Detection of *Fusarium* wilt pathogens of *Psidium guajava* L. in soil using culture independent PCR (ciPCR). *Saudi J Biol Sci* 20(1), 51-56.
- Mishra, R.K., Pandey, B.K., Singh, V., Mathew, A.J., Pathak, N. and Zeeshan, M. (2013b) Molecular detection and genotyping of *Fusarium oxysporum* f. sp. *psidii* isolates from different agro-ecological regions of India. *J Microbiol* 51(4), 405-412.
- He, D., Hao, J., Zhang, B., Yang, Y., Song, W., Zhang, Y., Yokoyama, K. and Wang, L. (2011) Pathogenic spectrum of fungal keratitis and specific identification of *Fusarium solani*. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 52(5), 2804-2808.
- Ludwig, W., Strunk, O., Westram, R., Richter, L., Meier, H., Yadhukumar, Buchner, A., Lai, T., Steppi, S., Jobb, G., Forster, W., Brettske, I., Gerber, S., Ginhart, A.W., Gross, O., Grumann, S., Hermann, S., Jost, R., Konig, A., Liss, T., Lussmann, R., May, M., Nonhoff, B., Reichel, B., Strehlow, R., Stamatakis, A., Stuckmann, N., Vilbig, A., Lenke, M., Ludwig, T., Bode, A. and Schleifer, K.H. (2004) ARB: a software environment for sequence data. *Nucleic Acids Res* 32(4), 1363-1371.

- Pruesse, E., Quast, C., Knittel, K., Fuchs, B.M., Ludwig, W., Peplies, J. and Glockner, F.O. (2007) SILVA: a comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB. *Nucleic Acids Res* 35(21), 7188-7196.
- Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., Peplies, J. and Glockner, F.O. (2013) The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res* 41(Database issue), D590-596.
- Geiser, D.M., Jimenez-Gasco, M., Kang, S., Makalowska, I., Veeraraghavan, N., Ward, T.J., Zang, N., Kuldau, G.A. and O'Donnell, K. (2004) Fusariu-ID v. 1.0: A DNA sequence database for identifying *Fusarium*. *European Journal of Plant Pathology* 110, 473-479.
- O'Donnell, K., Sutton, D.A., Rinaldi, M.G., Magnon, K.C., Cox, P.A., Revankar, S.G., Sanche, S., Geiser, D.M., Juba, J.H., van Burik, J.A., Padhye, A., Anaissie, E.J., Francesconi, A., Walsh, T.J. and Robinson, J.S. (2004) Genetic diversity of human pathogenic members of the *Fusarium oxysporum* complex inferred from multilocus DNA sequence data and amplified fragment length polymorphism analyses: evidence for the recent dispersion of a geographically widespread clonal lineage and nosocomial origin. *J Clin Microbiol* 42(11), 5109-5120.