

Ergebnisse eines bundesweiten Ringversuchs

Standardisierung eines molekularbiologischen Verfahrens zur Charakterisierung Shigatoxin-bildender *E. coli*

Peter Gallien, Angelika Stahl und Michael Bülte

Die Ergebnisse eines bundesweiten Ringversuches zur Bewertung einer molekularbiologischen Methodenkaskade für die Detektion, spezifische Isolierung und Charakterisierung Shigatoxin-produzierender *Escherichia coli* (STEC) werden vorgestellt. Am Test beteiligten sich 11 Arbeitsgruppen (2 Universitätsinstitute, 2 Bundesinstitutionen, 6 Landesuntersuchungsämter, 1 Unternehmen aus der freien Wirtschaft)¹. Jede Einrichtung erhielt 10 Hackfleischproben, die insgesamt (für alle Teilnehmer) aus 2 Grundmatrices hergestellt wurden. Je 5 Proben wurden einheitlich mit definierten STEC/EHEC-Stämmen in Dosen zwischen 54 KbE und 308 KbE/25 g Hackfleisch artifiziell im Labor kontaminiert. Die Begleitflora lag zwischen 10⁵ und 10⁶ KbE/g und teilweise (transportbedingt) höher. Die Proben 1 bis 9 je Arbeitsgruppe (hergestellt aus einer Grundmasse) waren zusätzlich „natürlich“ (zum Beispiel während des Schlachtprozesses) mit mindestens 3 STEC-Stämmen kontaminiert.

Das PCR-Screening mit den Primern MK 1/MK 2 ergab über alle Gruppen summiert für den Quotienten: Summe aller richtig positiv bestimmten Proben/Summe aller möglich positiven artifiziell im Labor kontaminierten Proben x 100% gleich 100%. Zusätzlich erkannten 10 von 11 Arbeitsgruppen auch 1 oder 2 „natürlich“ kontaminierte Proben. Mittels DNA-Hybridisierungstechnik (DIG-markierte PCR-Produkte als Sonden mit MK-Primern über die PCR hergestellt) detektierten 8 der 11 Gruppen jeweils alle 5 artifiziell kontaminierten Proben richtig positiv.

CODEWÖRTER

Shigatoxin-produzierende *E. coli* · STEC · Methoden-kaskade · Ringversuch · Lebensmittel · Standardisierung

Zur Gruppe der Shigatoxin-produzierenden *Escherichia coli* (STEC) gehören die enterohämorrhagischen *Escherichia coli* (EHEC), die beim Menschen gefährliche Krankheiten, wie das lebensbedrohliche Hämolytisch-Urämische Syndrom (HUS), die Hämorrhagische Colitis (HC) oder die Thrombotisch-Thrombocytopenische Purpura (TTP) hervorrufen können (KAPER und O'BRIEN, 1998; KARCH et al., 1999; RÜSSMANN et al., 1995).

Sowohl STEC als auch EHEC sind im Besitz von Shigatoxingenen (*Stx*) und haben die Fähigkeit, Shigatoxine (*Stx*) zu exprimieren (GALLIEN et al., 1999). Diese können sich an spezielle Zellwandrezeptoren binden, die Proteinbiosynthese blockieren und den Zelltod herbeiführen. Neben dieser Eigenschaft besitzen einige STEC/EHEC einen Typ-III-Sekretionsapparat, dessen Gene auf einer Pathogenitätsinsel, dem LEE (Locus of Enterocyte Effacement), lokalisiert sind. Damit können die Keime in die Lage

Die Werte von 3 Arbeitsgruppen konnten nicht bewertet werden, da einerseits die Proben transportbedingt verdorben waren, so dass die Begleitflora auf ca. 10⁹ KbE/g Hackfleisch anstieg, beziehungsweise in 2 Arbeitsgruppen nachvollziehbare methodische Fehler begangen wurden. Zur Charakterisierung der Isolate waren mittels PCR die Gene *stx 1*, *stx 2* und *eae* zu bestimmen. In 7 von 11 Gruppen wurden die Isolate aus den je 5 artifiziell im Labor kontaminierten Proben in allen 3 Eigenschaften richtig bestimmt. In einem Labor konnte infolge eines methodischen Fehlers bei der Hybridisierung keine Auswertung vorgenommen werden. Bei 3 Arbeitsgruppen wurden nur aus 4 Proben (2 Gruppen) beziehungsweise 3 Proben (1 Gruppe) Isolate gewonnen und auch richtig charakterisiert. Die Gründe hierfür sind Zeit- und Personalmangel für notwendige Nachhybridisierungen bzw. -isolierungen bei im PCR-Screening und in der DNA-Hybridisierung (Detektion) als positiv befundenen Proben beziehungsweise methodische Fehler (z.B. PCR-Inhibition durch Bestandteile des McConkey-Agars). Zusätzlich wurden in 2 Einrichtungen STEC isoliert und charakterisiert, die „natürlich“ im Hackfleisch vorhanden waren. Unter Einsatz anderer DIG-markierter Sonden (hergestellt mittels PCR und den Primern KS 7/ KS 8 sowie LP 43/LP 44) wurde dieser Befund auch in einer 3. Einrichtung erhoben. Auf Grund obiger Ergebnisse wurde die Methodenkaskade in die Methodensammlung nach § 35 LMBG aufgenommen. Eine Übernahme als CEN-Vorschrift wird gegenwärtig geprüft.

versetzt werden, weitere zelltoxische Proteine direkt in die Zielzelle zu applizieren (GALAN und COLLMER, 1999; FRANKEL et al., 1998; YU und KAPER, 1992; SCHMIDT et al., 1994; GALLIEN et al., 2000). Trotz dieser Virulenzsteigerung erlaubt der gegenwärtige Kenntnisstand keine eindeutige Aussage darüber, welche Faktoren einen STEC zum EHEC machen.

Bestimmte Serovare, die zwar häufig mit EHEC-Infektionen beim Menschen gekoppelt sind, wie O157:H-, O157:H7, O26:H11, O111:H-, O103:H2 oder O145:H28 stellen jedoch diese Aussage nicht in Frage, weil derzeit über 50 verschiedene Serovare nach Mitteilung der WHO weltweit an EHEC-Infektionen des Menschen beteiligt waren (BETTELHEIM, 2000).

Um einen effektiven Verbraucherschutz zu gewährleisten, ist der Einsatz einheitlicher, spezifischer und sensitiver Methoden in den Institutionen des Bundes und der Länder notwendig, die sich mit obiger Problematik beschäftigen (BÜLTE et al., 1995; STAHL und BÜLTE, 2000). Aus diesem Grunde wurde im NRL-Ec des BgVV eine molekularbiologische Methodenkaskade entwickelt, die folgende Teilschritte beinhaltet: bakterielle Anreicherung, PCR-Screening, spezifische Isolierung der STEC aus positiv gescreenten Proben mittels DNA-Hybridisierung, Bestätigung der Isolate als STEC und deren Charakterisierung mittels PCR (Abb. 1 und Abb. 2).

¹Am Ringversuch nahmen Arbeitsgruppen aus folgenden Instituten teil: BgVV/NRL-Ec – Dessau; Bundesanstalt für Milchforschung/Institut für Hygiene und Produktsicherheit – Kiel; Institut für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde – Universität Gießen; Institut für Lebensmitteltechnologie/Universität Hohenheim – Stuttgart; Landesuntersuchungsamt für das Gesundheitswesen Nordbayern – Erlangen; Landesuntersuchungsamt für das Gesundheitswesen Südbayern – Ober-schleißheim; Staatliches Untersuchungsamt Hessen/Kassel; Landesveterinär- und Lebensmitteluntersuchungsamt – Halle; Staatliches Lebensmitteluntersuchungsamt/Braunschweig; Chemisches und Veterinäruntersuchungsamt/Freiburg; Fa. Gene-Scan GmbH – Freiburg

Diese Methodenkaskade wurde in der Arbeitsgruppe 1 „Molekularbiologische Methoden/Mikrobiologie“ nach § 35 LMBG im BgVV diskutiert und bestätigt.

In enger Zusammenarbeit zwischen dem NRL-Ec des BgVV und dem Institut für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde der Universität in Gießen wurde ein bundesweiter Ringversuch organisiert, dessen Ergebnisse hier vorgestellt werden.

Material und Methoden

Material

Jede Arbeitsgruppe erhielt 10 Hackfleischproben, die für alle Gruppen einheitlich aus 2 Grundmatrices hergestellt wurden. Je 5 Proben für jede Arbeitsgruppe wurden einheitlich mit definierten STEC- bzw. EHEC-Stämmen in Dosen zwischen 54 KbE und 308 KbE/25g Hackfleisch artifiziell im Labor kontaminiert. Die Belegflora lag zwischen 10^5 und 10^6 KbE/g und teilweise (wahrscheinlich transportbedingt) höher, obwohl alle Proben gekühlt innerhalb 24 Std. den Einrichtungen zugesandt wurden.

Die Proben 1 bis 9 wurden für alle Einrichtungen aus einer Hackfleischgrundmasse hergestellt. Hier war zusätzlich die Möglichkeit einer „natürlichen“ Kontamination mit STEC gegeben, die zum Beispiel beim Schlachtprozess erfolgt sein könnte. Die Daten sind in den Tab. 1 und 2 zusammengefasst.

Methoden

Die einzelnen Arbeitsschritte der Methodenkaskade zur bakteriellen Anreicherung, Screening-PCR, spezifischen Isolierung mittels DNA-Hybridisierung und Charakterisierung der als STEC bestätigten Isolate sind als Übersicht in Abb. 1 und 2 dargestellt. Die Details sind in der Methodenbeschreibung enthalten oder partiell den folgenden Publikationen zu entnehmen (GALLIEN et al., 1996; GALLIEN et al., 1997; GALLIEN et al., 1998).

Ergebnisse

Für die Auswertung der Ergebnisse (PCR-Screening, DNA-Hybridisierung) wurden folgende Auswertequotienten für die artifiziell kontaminierten Proben benutzt:

$$\text{Quotient A} = \frac{\text{Summe aller richtig positiver Proben von allen Gruppen}}{\text{Summe aller möglich positiver Proben von allen Gruppen}}$$

$$\text{Quotient B} = \frac{\text{Summe aller falsch negativer Proben von allen Gruppen}}{\text{Summe aller möglich positiver Proben von allen Gruppen}}$$

$$\text{Quotient C} = \frac{\text{Summe aller falsch positiver Proben von allen Gruppen}}{\text{Summe aller } stx\ 1 \text{ negativen Proben von allen Gruppen}}$$

Aus Gründen der Übersichtlichkeit werden die jeweiligen Quotienten mit 100 % multipliziert.

Folgende Werte wurden erhalten:

PCR-Screening

1 PCR-Screening mit den Primern MK 1/MK 2 (KARCH und MEYER, 1989)

Ein PCR-Screening mit den Primern MK 1/MK 2, wobei mit Ausnahme des *stx 2f* alle *stx*-Subtypen erkannt werden, ergab folgende Ergebnisse:

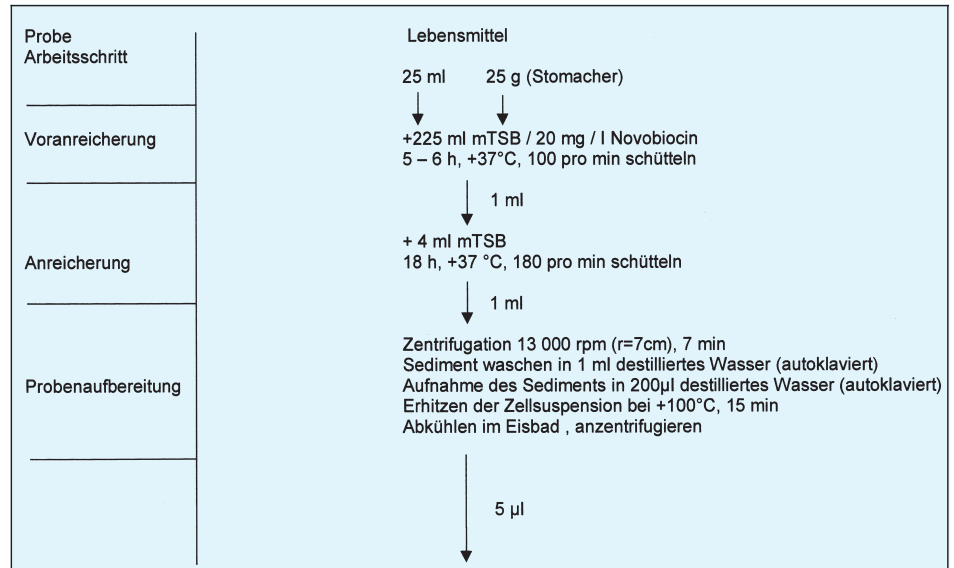


Abb. 1: Allgemeiner Ablaufplan der Methodenkaskade/Teil 1

Fig. 1: General course of operations/part 1

Quotient A: $55/55 \times 100\% = 100\%$

Quotient B: $0/55 \times 100\% = 0\%$

Zusätzlich erkannten 10 von 11 Arbeitsgruppen auch je 1 oder 2 „natürlich“ kontaminierte Proben.

1 PCR-Screening mit den Primern KS 7/KS 8 (SCHMIDT et al., 1993)

Die Primer KS 7/KS 8 detektieren spezifisch das *stx 1*-Gen. Folgende Daten wurden im Rahmen des Ringversuches erhalten:

Quotient A: $43/44 \times 100\% = 97,7\%$

Quotient B: $1/44 \times 100\% = 2,3\%$

Quotient C: $2/11 \times 100\% = 18,2\%$

Da die im Hackfleisch natürlich vorhandenen STEC alle das *stx 2*-Gen besaßen, konnten mit diesem Primersystem keine zusätzlichen Proben als STEC-positiv detektiert werden.

1 PCR-Screening mit den Primern LP 43/LP 44 (CEBULA et al., 1995)

Die Primer LP 43/LP 44 erkennen das *stx 2*-Gen (inklusive aller Subtypen mit Ausnahme des *stx 2f*-Gens) spezifisch. Folgende Quotienten wurden im Ringversuches ermittelt:

Quotient A: $53/55 \times 100\% = 96,4\%$

Quotient B: $2/55 \times 100\% = 3,6\%$

Zusätzlich erkannten 10 von 11 Arbeitsgruppen auch jeweils 1 oder 2 „natürlich“ kontaminierte Proben.

Detektion der STEC mittels DNA-Hybridisierung unter Verwendung von Digoxigenin (DIG)-markierten Sonden

Tab. 1: Zusammenstellung der Eigenschaften der versandten Proben
Tab. 1: Properties of minced beef samples used for interlaboratory comparison

Proben-nummer	Grundmatrix/Datum	mögliche native Kontamination	artifizielle Kontamination Stamm	KbE/ 25 g
1	2 / 20. 02. 2001	X		
2	2 / 20. 02. 2001	X		
3	2 / 20. 02. 2001	X	B2	70
4	2 / 20. 02. 2001	X	C8	54
5	2 / 20. 02. 2001	X	B2	140
6	2 / 20. 02. 2001	X		
7	2 / 20. 02. 2001	X	55/98	308
8	2 / 20. 02. 2001	X	C8	108
9	2 / 20. 02. 2001	X		
10	1 / 07. 02. 2001			

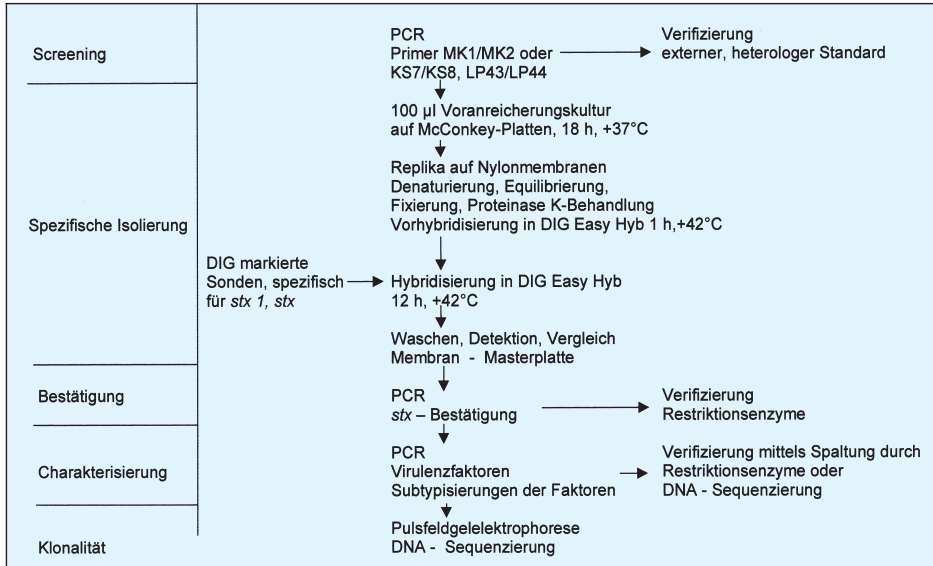


Abb. 2: Allgemeiner Ablaufplan der Methodenkaskade/Teil 2
 Fig. 2: General course of operations/part 2

1 Einsatz DIG-markierter Sonden (GALLIEN et al., 1996), produziert mit den Primern MK 1/MK 2
 Die DIG-markierten Sonden wurden mittels PCR unter Verwendung der Primer MK 1/MK 2 hergestellt. Die Spezifität hinsichtlich *stx 1*-Gen bzw. *stx 2*- Gen wurde durch Einsatz der Referenzstämme C 600 J1 (*stx 1*) und C 600 W34 (*stx 2*) als Target erreicht.

Folgende Quotienten wurden aus den Ergebnissen des Ringversuches errechnet:

Quotient A: $40/40 \times 100\% = 100\%$

Quotient B: $0/40 \times 100\% = 0\%$

Die Werte von 3 Arbeitsgruppen konnten nicht berücksichtigt werden, da nachvollziehbare methodische Fehler auftraten. So wurden von 2 Arbeitsgruppen anstelle der Voranreicherungskulturen (nach 5 Std. Kultivierung) die Anreicherungskulturen (nach 18 Std. Kultivierung) ausgestrichen. Infolge eines Transportproblems war die Begleitflora der Proben für eine Arbeitsgruppe so stark angewachsen, dass eine Hybridisierung nicht mehr für alle Proben erfolgen konnte.

1 Einsatz DIG-markierter Sonden, produziert mit den Primern KS 7/KS 8.
 Die DIG-markierten Sonden wurden mittels PCR unter Verwendung der Primer KS 7/KS 8 und dem Referenzstamm C 600 J1 hergestellt. Somit wurde eine Spezifität zum *stx 1*-Gen erreicht. Folgende Ergebnisse wurden im Ringversuch erzielt:

Quotient A: $25/28 \times 100\% = 89,3\%$

Quotient B: $3/28 \times 100\% = 10,7\%$

Quotient C: $1/28 \times 100\% = 3,6\%$

Auch hierbei konnten die Ergebnisse von 3 Arbeitsgruppen aus oben bereits dargelegten Gründen nicht berücksichtigt werden

1 Einsatz DIG-markierter Sonden, produziert mit den Primern LP 43/LP 44.

Die DIG-markierten Sonden wurden mittels PCR unter Verwendung der Primer LP 43/LP 44 und dem Referenzstamm C 600 W 34 produziert. Damit wurde eine Spezifität zum *stx 2*-Gen erreicht. Folgende Daten wurden im Ringversuch erhalten:

Quotient A: $39 / 40 \times 100\% = 97,5\%$

Quotient B: $1 / 40 \times 100\% = 2,5\%$

Wiederum konnten die Resultate der 3 Arbeitsgruppen aus oben bereits dargelegten Gründen nicht berücksichtigt werden.

Charakterisierung der Isolate

Die einzelnen Arbeitsgruppen hatten die Aufgabe, als letzten Schritt der Methodenkaskade die jeweils mit den oben beschriebenen Sonden gewonnenen Isolate hinsichtlich des Vorkommens der Gene *stx 1*, *stx 2*, und *eae* zu charakterisieren. Hierzu kam ausschließlich die PCR zum Einsatz.

1 Charakterisierung der mittels DIG-markierten

Sonden (Basis MK 1/MK 2) gewonnenen Isolate
 Die Ergebnisse sind in Tab. 3 zusammengefasst.

1 Charakterisierung der mittels DIG-markierten Sonden (Basis KS 7 / KS 8) gefundenen Isolate

Die Ergebnisse sind in Tab. 4 zusammengefasst.

1 Charakterisierung der mittels DIG-markierten Sonden (Basis LP 43 / LP 44) gewonnenen Isolate

Die Ergebnisse sind in Tab. 5 zusammengefasst.

Diskussion

Die Infektionsdosis für eine EHEC-Infektion ist mit ca. 100 Kbe absolut extrem niedrig (BEUTIN und NIEMER, 1995). Somit ist der Einsatz einheitlicher, spezifischer und vor allem sensitiver Methoden in den Institutionen des Bundes und der Länder, die sich mit der EHEC-Problematik beschäftigen müssen, für die Gewährleistung eines effektiven Verbraucherschutzes notwendig. Die oben dargestellte Methodenkaskade erfüllt nach jetzigem Kenntnisstand diese Anforderungen.

Besonders effizient haben sich im Rahmen des PCR-Screenings die Primer MK 1/MK 2 erwiesen. Schließlich wurden mit diesem Primerpaar alle artifiziell im Labor kontaminierten Proben von jedem Teilnehmer am Ringversuch erkannt. Da die „natürliche“ Kontamination (beispielsweise während des Schlachtprozesses erfolgt) nur mit *stx 2*-tragenden STEC verbunden war, ist die Aussage hinsichtlich falsch positiver Resultate in Verbindung sowohl mit diesem Primerpaar als auch mit dem Primern LP43/LP 44 für die Proben 1 bis 9 je Arbeitsgruppe nicht möglich. Die Probe 10 jeder Arbeitsgruppe resultierte aus der *stx*-negativen Grundmatrix 1 (Tab. 1) und wurde von allen Gruppen mit allen Primerpaaren als negativ befunden. Außerdem wurden von 10 der 11 Teilnehmergruppen auch 1 oder 2 der „natürlich“ kontaminierten Proben sowohl mit den Primern MK 1/MK 2 als auch LP 43/LP 44 detektiert. Eine Arbeitsgruppe, die keine zusätzliche Probe durch die „natürliche“ Kontamination bedingt, mit beiden Primersystemen detektierte, hatte die gesamte Methodenkaskade erst einige Wochen vor dem Ringversuch erlernt. Allerdings ist auch eine sogenannte „Nesterbildung“ als Ursache hierfür nicht auszuschließen, wie die spätere Charakterisierung gewonnener „natürlicher“ Isolate zeigte.

Die Primer KS 7/KS 8 und LP 43/LP 44 zeigten im Screening etwas schlechtere Werte für die im Ergebnisteil postulierten Quotienten A, B beziehungsweise C. Dennoch sprechen aber auch diese Daten für eine Sensitivität, die einen Einsatz im Rahmen eines Screenings rechtfertigt. Allerdings ist zu berücksichtigen, dass nur jeweils das *stx 1* beziehungsweise *stx 2* (und Subtypen mit Ausnahme des *stx 2f*) bestimmt werden, so dass dadurch bedingt 2 Ansätze für einen Test pro Probe erforderlich wären.

Tab. 2: Charakteristika der eingesetzten STEC Stämm zur Kontamination der Proben aus Rinderhackfleisch
 Tab. 2: Characterization of STEC strains used for contamination of minced beef samples

Stamm	Herkunft	Eigenschaften	Serovar
B2	HUS	<i>stx 1, stx 2, eae, hly</i>	O157:H7
C8	HUS	<i>stx 1, stx 2, eae, hly</i>	O157:H7
55 / 98	Hackfleisch	<i>stx 2</i>	O113:H4

stx 1, stx 2 = Shigatoxin-Gen 1 beziehungsweise 2
eae = Gen kodiert das Protein Intimin
hly = Gen kodiert das EHEC-Hämolysin

Tab. 3 : Ergebnisse des Ringversuches zur Charakterisierung der mittels DIG-markierten Sonden (Basis MK 1 /MK 2) gewonnenen Isolate
 Tab. 3: Results of characterization of isolated STEC by using DIG-labelled probes (primer pair : MK 1 /MK 2)

Labor Parameter	A	B	C	D	E	F	G*	H	I**	J**	K***
Anzahl artifiziiell kontaminierter Proben, aus denen Isolate erhalten wurden/mögliche Proben	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5		4 / 5			3 / 5
Anzahl gewonnener, als richtig positiv bestätigter Isolate	20	18	20	18	16	20		6			3
Prozent richtig bestimmte Eigenschaften von allen Isolaten je Arbeitsgruppe+	100	100	100	100	93,75	96,67		77,78			100
Anzahl gewonnener, nicht bestätigter Isolate	0	0	0	0	0	0		0			0
Prozent falsch positiv bestimmte Eigenschaften (summiert über alle Isolate je Arbeitsgruppe)	0	0	0	0	0	0		0			0
Prozent falsch negativ bestimmte Eigenschaften (summiert über alle Isolate je Arbeitsgruppe)	0	0	0	0	6,25	3,33		22,22			0
Isolate, die aus der natürlichen Kontamination resultieren	0	0	4	2	0	0		0			0

+ Berechnungsbeispiel : Die Isolate aus 4 artifiziiell kontaminierten Proben besitzen *stx 1*; *stx 2*, *eeae*, jedoch aus einer Probe nur *stx 2*. Somit ergeben sich bei je 4 Isolaten aus 5 Proben (4 Isolate x 3 Eigenschaften x 5 Proben = 60) für 60 summierten Eigenschaften für alle Isolate dieser Arbeitsgruppe 100 %. In diese Berechnung wurden auch die als richtig negativ bestimmten Eigenschaften integriert.
 * Proben für diese Arbeitsgruppe durch Transport verdorben. Isolierung der STEC durch die zu hohe Begleitflora nicht möglich
 ** Keine Auswertung möglich, da nachvollziehbare methodische Fehler begangen wurden. (Ausstreichen der 18 Stunden Anreicherungskultur anstelle der 5 Stunden Voranreicherungskultur.)
 *** Aus personell kapazitiven Gründen konnte bei dieser Arbeitsgruppe keine Nachhybridisierung und -isolierung von den im PCR-Screening als positiv gefundenen aber in der DNA-Hybridisierung oder besonders nach der Isolierung nicht als STEC bestätigten Proben erfolgen.

Die oben getroffene Einschätzung hinsichtlich der verwendeten Primer trifft auch für die mit diesen Sequenzen hergestellten DNA-Sonden unter Verwendung entsprechender Referenzstämmen für die DNA-Hybridisierung (Detektion) zu. Auch hier wurden mit den auf Basis der Primer MK 1/MK 2 produzierten Sonden die besten Resultate erzielt. Diese Fest-

stellung trifft auch für die Detektion der STEC zu, die aus der „natürlichen“ Kontamination stammten. Innerhalb von 2 Arbeitsgruppen traten nachvollziehbare methodische Fehler auf. So wurden nicht zwecks Durchführung der Replikate Verdünnungen der Voranreicherungskulturen (nach 5 Std.), sondern der Anreicherungskulturen (also nach 18 Std.) auf McConkey-Platten ausgestrichen. Bei einer weiteren Arbeitsgruppe war die Begleitflora der Proben durch einen Transportfehler so stark angestiegen, dass auch hier keine Werte erhalten werden konnten. Im Rahmen der Charakterisierung der als STEC bestätigten Keime haben die Arbeitsgruppen zahlenmäßig die meisten Isolate aus Hybridisierungen mit den markierten Sonden gewonnen, die auf Basis der Primer MK 1/MK 2 produziert wurden (Tab. 3 bis 5) Detektion der STEC mittels DNA-Hybridisierung unter Verwendung von Digoxigenin (DIG)-markierten Sonden (GALLIEN et al., 1996). Allerdings sind hierzu noch folgende Zusatzbemerkungen erforderlich: Infolge personell kapazitiver Schwierigkeiten konnte nicht immer eine erneute Hybridisierung der Proben durchgeführt werden, die im Screening positiv waren, aber bei der ersten Hybridisierung keine Resultate lieferten. Außerdem treffen die bereits oben genannten Feststellungen für die 3 Arbeitsgruppen, die nicht in die Auswertung einbezogen wurden, auch für diesen Schritt zu.

Tab. 4 : Ergebnisse des Ringversuches zur Charakterisierung der mittels DIG-markierten Sonden (Basis KS 7/KS 8) gewonnenen Isolate
 Tab. 4: Results of characterization of isolated STEC by using DIG-labelled probes (primer pair : KS 7/KS 8)

Labor/Parameter	A	B	C**	D	E	F	G*	H	I**	J**	K***
Anzahl artifiziiell kontaminierter Proben, aus denen Isolate erhalten wurden/mögliche Proben	3 / 4	1 / 4		4 / 4	5 / 4	5 / 4		1 / 4			3 / 4
Anzahl gewonnener, als richtig positiv bestätigter Isolate	6	1		8	8	9		2			3
Prozent richtig bestimmte Eigenschaften von allen Isolaten je Arbeitsgruppe+	100	100		100	87,5	85,18		100			66,67
Anzahl gewonnener, nicht bestätigter Isolate	0	0		0	1	1		0			1
Prozent falsch positiv bestimmte Eigenschaften (summiert über alle Isolate je Arbeitsgruppe)	0	0		0	12,5	11,11		0			33,33
Prozent falsch negativ bestimmte Eigenschaften	0	0		0	0	3,70		0			0
Isolate, die aus der natürlichen Kontamination resultieren	0	0		0	0	0		0			0
Prozent nicht bestimmter Eigenschaften summiert	0	0		0	0	0		0			0

+ Berechnungsbeispiel : analog Tab. 3
 * Proben für diese Arbeitsgruppe durch Transport verdorben. Isolierung der STEC durch die zu hohe Begleitflora nicht möglich
 ** Keine Auswertung möglich, da methodische Fehler begangen wurden. (Ausstreichen der 18 Stunden Anreicherungskultur anstelle der 5 Stunden Voranreicherungskultur beziehungsweise versehentliches Mischen dieser Sonden mit den für die *stx 2* Detektion.)
 *** Aus personell kapazitiven Gründen konnte bei dieser Arbeitsgruppe keine Nachhybridisierung und -isolierung von den im PCR-Screening als positiv gefundenen aber in der DNA-Hybridisierung oder besonders nach der Isolierung nicht als STEC bestätigten Proben erfolgen.

Die molekularbiologische Methodenkaskade wurde nach diesem Ringversuch in die Methodensammlung nach § 35 LMBG aufgenommen². Des Weiteren wird gegenwärtig eine Übernahme als DIN- und im europäischen Rahmen als CEN-Vorschrift geprüft.

Literatur
 1. BEUTIN, L. und U. NIEMER (1995): Erkennung, Verhütung und Bekämpfung von Infektionen durch enterohämorrhagische E.coli (EHEC). Bundesgesundhbl. 11, 422-427. – 2. BETTELHEIM, K. A. (2000): Role of non-O157 VTEC. J. Appl. Microbiol. Symposium Suppl. 88, 38-50. – 3. BÜLTE, M., S. HECKÖTTER, P. KEIL, C. SCHUY, A. MÜLLER und S. ALEKSIC (1998): Enterohämorrhagische E. coli (EHEC) – Aktuelle Lebensmittelinfektionserreger auch in der Bundesrepublik Deutschland? 4. Nachweismöglichkeiten für VTEC und EHEC. Fleischwirtsch. 78, 146-151. – 5. CEBULA, T. A., W. L. PAYNE und P. FENG (1995): Simultaneous identification of strains of *Escherichia coli* Serotype O157:H7 and their shiga-like toxin type by mismatch amplification mutation assay-multiplex PCR. J. Clin. Microbiol. 33, 248-250. – 6. FRANKEL, G., A. D. PHIL-

² Die gesamte Arbeitsvorschrift mit allen Detailschritten kann von den Autoren bezogen werden.

LIPS, I. ROSENSHINE, G. DOUGAN, J. B. KAPER and S. KNOTTON (1998): Enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli* more subversive elements. *Molecular Microbiol.* 30, 911-921. – 7. GALLIAN, J. E. and A. COLLMER (1999): Type III secretion machines : Bacterial devices for protein delivery into host cells. *Science* 284, 1322-1328. – 8. GALLIEN, P., H. KLIE, K.-W. PERLBERG und D. PROTZ (1996): Einsatz von Nylon Membranen zur gezielten Isolierung und Charakterisierung Verotoxin-bildender *Escherichia coli* mittels DNA-Sonden. *Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.* 109, 431-433. – 9. GALLIEN, P., H. RICHTER, CHR. MUCH, I. FRÖBE, K.- W. PERLBERG und D. PROTZ (1997): Optimierung der Polymerasekettenreaktion (PCR) zum Nachweis und zur Charakterisierung von Shigatoxin produzierenden *Escherichia coli* (STEC) in Lebensmitteln. *Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.* 110, 422-426. – 10. GALLIEN, P., H. RICHTER, H. KLIE, M. TIMM, H. KARCH, S. LEHMANN, K.-W. PERLBERG, P. TEUFEL und D. PROTZ (1998): Nachweis von Shigatoxin-produzierenden *Escherichia coli* (STEC) in Lebensmitteln und Charakterisierung der Isolate. *Bundesgesundhbl. Sonderheft EHEC in Deutschland*, S. 26-30. – 11. GALLIEN, P., CHR. MUCH, K.- W. PERLBERG, D. PROTZ (1999): Subtypisierung von stx- Genen in Shigatoxinproduzierenden *Escherichia coli* (STEC). *Fleischwirtsch.* 79 (6), 99-103. – 12. GALLIEN, P., H. KARCH, CHR. MUCH, H. STEINRÜCK, S. LEHMANN, M. TIMM, H. RICHTER, K.- W. PERLBERG, D. PROTZ (2000): Subtypisierung von eae- Genen in Shigatoxin-produzierenden *Escherichia coli* (STEC). *Fleischwirtsch.* 80 (2), 84-89. – 13. KARCH, H., M. BIELASZEWSKA, M. BITZAN, H. SCHMIDT (1999): Epidemiology and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 34, 229-243. – 14. KARCH, H. und T. MEYER (1989): Single primer pair for amplifying segments of distinct Shiga-like-toxin genes by polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 27, 2751-2757. – 15. KAPER, J.B. und A. D. O'BRIEN (1998): *Escherichia coli* O157:H7 and other shigatoxin-producing *E. coli* strains. ASM press, Washington, D.C. – 16. RÜSSMANN, H., E. KOTHE, H. SCHMIDT, S. FRANKE, D. HARMSEN, A. CAPRIOLI and H. KARCH (1995). Genotyping of Shiga-like toxin genes in non - O157 *Escherichia coli* strains associated with haemolytic uraemic syndrome. *J. Med. Microbiol.* 42, 404-410. – 17. SSSCHMIDT, H., H. RÜSSMANN, A. SCHWARZKOPF, A. ALEKSIC, J. HEESEMANN und H. KARCK (1994): Prevalence of attaching and effacing *Escherichia coli* in stoolsamples from patient and controls. *Zbl. Bact.* 281, 201-203. – 18. SCHMIDT, H., H. RÜSSMANN, and H. KARCH (1993): Virulence determinants in non-toxinogenic *Escherichia coli* O157 strains that cause infantile diarrhoea. *Infect. Immun.* 61, 4894-4898. – 19. STAHL, A. und M. BÜLTE (2000): Verotoxin bildende *Escherichia coli* (VTEC) in Lebensmitteln. *Fleischwirtsch.* 80 (11), 99-101. – 20. YU, J. and J. B. KAPER (1992): Cloning and characterization of the eae gene of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O 157:H7. *Molec. Microbiol.* 3, 411-417.

Anschrift der Verfasser

Dr. habil. Peter Gallien, BgVV Nationales veterinärmedizinisches Referenzlabor für *E. coli*/Dessau, Jahnstraße 8, D-06846 Dessau, email: p.gallien@bgvv.de; Angelika Stahl und Prof. Dr. habil. Michael Bülte, Institut für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde der Universität Gießen, Frankfurter Straße 92, D-35392 Gießen, email: angelika.s.stahl@vet-med.uni-giessen.de, michael.buelte@vetmed.uni-giessen.de

An interlaboratory comparison

Standardization of a molecularbiological method cascade of characterization of shigatoxin-producing *E. coli*

P. Gallien – Dessau; A. Stahl and M. Bülte – Giessen / Germany

Code words : Shigatoxin-producing *E. coli* · STEC · cascade of methods · interlaboratory comparison · foods · standardization

The results of an interlaboratory comparison in Germany for the evaluation of a molecularbiological method cascade for detection, specific isolation and characterization of Shigatoxin-producing *Escherichia coli* (STEC) in foods are given. 11 groups took part (2 university institutes, 2 federal institutes, 6 institutes in different Federal Laender of Germany and 1

Tab. 5: Ergebnisse des Ringversuches zur Charakterisierung der mittels DIG-markierten Sonden (Basis LP 43/LP 44) gewonnenen Isolate

Tab. 5: Results of characterization of isolated STEC by using DIG-labelled probes (primer pair: LP 43/LP 44)

Labor Parameter	A	B	C**	D	E	F	G*	H	I**	J**	K***
Anzahl artifizell kontaminierter Proben, aus denen Isolate erhalten wurden/mögliche Proben	5 / 5	5 / 5		5 / 5	4 / 5	5 / 5		2 / 5			3 / 5
Anzahl gewonnener, als richtig positiv bestätigter Isolate	9	9		10	7	10		4			3
Prozent richtig bestimmte Eigenschaften von allen Isolaten je Arbeitsgruppe+	100	100		100	100	96,67		100			100
Anzahl gewonnener, nicht bestätigter Isolate	0	0		0	0	0		0			0
Prozent falsch positiv bestimmte Eigenschaften (summiert über alle Isolate je Arbeitsgruppe)	0	0		0	0	0		0			0
Prozent falsch negativ bestimmte Eigenschaften (summiert über alle Isolate je Arbeitsgruppe)	0	0		0	0	3,33		0			0
Isolate, die aus der natürlichen Kontamination resultieren	1	0		1	0	0		0			0
Prozent nicht bestimmter Eigenschaften summiert über alle Isolate je Arbeitsgruppe	0	0		0	0	0		0			0

+ Berechnungsbeispiel: analog Tab. 3
 * Proben für diese Arbeitsgruppe durch Transport verdorben. Isolierung der STEC durch die zu hohe Begleitflora nicht möglich
 ** Keine Auswertung möglich, da methodische Fehler begangen wurden. (Ausstreichen der 18 Stunden Anreicherungskultur anstelle der 5 Stunden Voranreicherungskultur beziehungsweise versehentliches Mischen dieser Sonden mit den für die stx1-Detektion.)
 *** Aus personell kapazitiven Gründen konnte bei dieser Arbeitsgruppe keine Nachhybridisierung und -isolierung von den im PCR-Screening als positiv gefundenen aber in der DNA-Hybridisierung oder besonders nach der Isolierung nicht als STEC bestätigten Proben erfolgen.

institute of an enterprise in Germany)¹. 10 ground beef samples were sent to each group. These samples were produced from 2 basic matrices for all groups. Five samples were contaminated artificially in a laboratory. The infection doses were between 54 cfu and 308 cfu/25 g ground beef. The whole content of microorganisms per g ground beef was between 10⁵ and 10⁶ cfu. In addition the samples 1 to 9 (produced from basic ground beef matrix 1) for each group were contaminated with STEC naturally. This contamination could happen during the slaughtering process. The PCR Screening by using the primer pair MK1/MK 2 showed for the quotient: sum of all right positive detected samples of all groups/sum of all positive artificially contaminated samples the value 1. In addition 10 of 11 working groups detected 1 or 2 naturally contaminated samples. The PCR Screening by using the primer pairs KS 7/KS 8 and LP 43/LP 44 showed the values 0,9773 and 0,9636, respectively. 8 of 11 working groups detected 5 artificially contaminated samples by using the DNA Hybridisation technique with DIG labelled probes produced by using PCR and the primer pair MK 1/MK 2. The results of 3 participants could not be used for the evaluation. On one hand the samples spoiled during the transport and on the other hand 2 working groups made methodical mistakes. They used the 18 hrs enriched cultures instead of the 5 hrs preenriched cultures for preparing McConkey plates. All participants had to detect the following genes in STEC isolates by using PCR: *stx 1*, *stx 2*, and *eae*. 7 of 11 working groups detected all factors of their isolates from all 5 artificially contaminated samples in the right manner. One participant made a mixture of marked probes. This working group produced their own marked probes later. The results were excellent but we did not use them in the evaluation of the interlaboratory comparison. 3 other working groups isolated STEC only from 4 artificially contaminated samples and 1 participant from 3 artificially contaminated samples. These groups were understaffed. So it was not possible for them to repeat the DNA Hybridisation of those samples which were positive in screening PCR but negative in DNA Hybridisation. In addition 3 working groups isolated and characterised STEC from naturally contaminated samples. On the basis of these results the methode cascade is a standard procedure in the collection of methods of § 35 LMBG in Germany now. At present it is discussed whether the molecularbiological method cascade could be a standard CEN procedure, too.