FRIEDRICH-LOEFFLER-INSTITUT
FLI
Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit
Federal Research Institute for Animal Health

Amtliche Methode

Verotoxin-bildende *Escherichia coli* (VTEC)/ Shigatoxin-bildende *Escherichia coli* (STEC)

Inhaltsverzeichnis

1. Charakterisierung der Infektion ... 3

1.1 Erreger ... 3

1.2 Klinische Symptomatik ... 3

1.3 Differentialdiagnose ... 4

1.4 Diagnostische Indikation ... 5

1.5 Zuständige Untersuchungseinrichtung ... 5

1.6 Rechtsgrundlagen ... 5

2. Untersuchungsmaterial ... 5

2.1 Untersuchungsmaterial für den Erregernachweis ... 5

2.2 Beförderung der Proben ... 6

3. Untersuchungsgang ... 6

3.1 Erregernachweis ... 6

3.1.1 Vorscreening der Proben auf STEC ... 6

3.2 Charakterisierung STEC-positiver Isolate ... 10

1. Charakterisierung der Infektion

1.1 Erreger

Escherichia coli (*E. coli*) gehören zur Familie der *Enterobacteriaceae*. Sie sind gramnegative, fakultativ anaerobe, häufig peritrich begeißelte, gerade Stäbchenbakterien. Sie besiedeln den Darmtrakt bereits in den ersten Stunden nach der Geburt, stellen aber bei Erwachsenen mit weniger als 1 % nur einen kleinen Anteil der Darmflora dar. Durch ihren sauerstoffverbrauchenden Stoffwechsel spielen sie jedoch eine wichtige Rolle in den symbiotischen Beziehungen zwischen Wirtsorganismus und Darmflora. Neben den kommensalen Darmbewohnern der Art *E. coli* werden zunehmend auch obligat pathogene *E. coli* beschrieben, die auch tödlich verlaufende Krankheiten verursachen können. Dazu zählen neben den Darm- und Durchfallerkrankungen (enteropathogene *E. coli*) auch extraintestinale Infektionen, wie Harnwegsinfektionen (uropathogene *E. coli*, UPEC), akute Entzündungen, Sepsis und neonatale Meningitiden (neonatale Meningitis erregende *E. coli*, NMEC).

Die Identifizierung von verschiedenen Virulenzmarkern bei *E. coli* führte zu einer Einteilung der enteropathogenen *E. coli* in sieben Pathovare, wobei neben der klinischen Symptomatik die von den Stämmen gebildeten Adhäsionsfaktoren und Toxine die Hauptkriterien der Klassifizierung darstellen. Eines der Pathovare sind die Shigatoxin-bildenden *E. coli* (STEC, auch als Verotoxin-bildende *E. coli* (VTEC) bezeichnet), zu denen auch die mit der hämorrhagischen Colitis (HC) und dem hämolytisch-urämischen Syndrom (HUS) assoziierten enterohämorrhagischen *E. coli* (EHEC) gezählt werden. STEC sind zur Produktion von Zytotoxinen („Zellgiften“), den sogenannten Shigatoxinen, befähigt. Aber auch plasmidkodierte Virulenzfaktoren sowie eine Pathogenitätsinsel mit einer Gruppe von über 40 chromosomalen Genen, die auch als “Locus of Enterocyte Effacement” oder LEE-Lokus bezeichnet wird, tragen entscheidend zur Pathogenität von EHEC bei. Besonders das auf dem LEE lokalisierte *eae*-Gen (*E. coli* attaching and effacing), das für einen als Intimin bezeichneten Adhärenzfaktor kodiert, wird, von einigen Ausnahmen abgesehen, regelmäßig bei EHEC-Stämmen gefunden, die schwere klinische Erkrankungen hervorrufen. Weitere non-LEE-kodierte Pathogenitätsfaktoren wurden in jüngerer Zeit vor allem durch die umfassenden genomischen Analysen von EHEC-Bakterien identifiziert. In Deutschland wurde in den vergangenen Jahren ein immer größer werdendes Spektrum an EHEC-Erregertypen registriert.

1.2 Klinische Symptomatik

STEC wurden weltweit nachgewiesen und zählen zu den häufigsten Verursachern bakteriell bedingter Durchfallerkrankungen beim Menschen. Hier führen EHEC im typischen Fall nach vier- bis sechs- (drei- bis neun-) tägiger Inkubationszeit zu plötzlich auftretenden, schmerzhaften, kolikartigen Darmkrämpfen. Brechreiz und Erbrechen können vorhanden sein. Hieran schließt sich wenige Stunden später ein zunächst wässriger Durchfall an, der in eine profuse hämorrhagische Diarrhoe übergehen kann. Schleimbeimengungen oder fä-

kale Leukozyten fehlen in der Regel, auch Fieber über 38 °C ist ungewöhnlich. Bei z. T. schwerem Krankheitsgefühl dauert die Erkrankung etwa acht Tage und heilt bei Ausbleiben von Komplikationen ohne spezifische Therapie ab. Asymptomatische Infektionen und unkomplizierte leichte Durchfälle wurden ebenso beobachtet. In einem gewissen Anteil der klinischen Fälle kann es zu lebensbedrohlichen Komplikationen in Form des hämolytisch-urämischen Syndroms (HUS) und/oder neurologischer Komplikationen kommen. In der Humanmedizin sind in Deutschland nach § 6 des Infektionsschutzgesetzes (IfSG) der Krankheitsverdacht, die Erkrankung sowie der Tod an enteropathischem HUS namentlich meldepflichtig. Vom HUS abgegrenzt werden in der Meldepflicht die anderen EHEC-Erkrankungen. In diesen Fällen ist nach § 7 IfSG der direkte oder indirekte Nachweis von EHEC-Stämmen, soweit er auf eine akute Infektion hinweist, ebenfalls namentlich zu melden.
Das Hauptreservoir für STEC/EHEC stellen Rinder, andere landwirtschaftlich genutzte Wiederkäuer wie Schafe und Ziegen sowie Wildwiederkäuer dar. STEC werden bei diesen Tieren regelmäßig gefunden, diese Tiere erkranken in der Regel nicht. Unzureichend gegartes Rindfleisch, Rohmilch und Rohmilchprodukte bzw. nicht pasteurisierte Milch sowie andere Produkte von Rindern werden als hauptsächliche Infektionsquelle des Menschen beschrieben. Aber auch Kontaminationen, die von Kühlware (Fleisch) auf unbelastete Lebensmittel wie Kochwurst übergingen, kontaminierte kalt gepresste Fruchtsäfte sowie kontaminiertes Gemüse sind als Quellen menschlicher Infektionen beobachtet worden. Weiterhin sind durch erregerhaltigen Rinderkot kontaminierte Weiden sowie mit Rindergülle gedüngte Anbauflächen, auf denen sich STEC/EHEC-Stämme mehrere Monate halten können, als mögliche Infektionsquellen in Betracht zu ziehen. STEC/EHEC, die von dort aus in anliegende Badegewässer bzw. ins Trinkwasser (Brunnenanlagen) gelangen, können ein erhebliches Infektionsrisiko darstellen. Daneben darf aber auch das Risiko von Infektionen durch direkten Kontakt zu Tieren (Streichelzoos), Besuche in landwirtschaftlichen Betrieben („Ferien auf dem Bauernhof“) sowie die fäkal-orale Übertragung von Mensch zu Mensch, besonders in Gemeinschaftseinrichtungen, nicht übersehen werden. Infektionen mit Shigatoxin-bildenden *E. coli* können auch bei Schweinen auftreten. Unter natürlichen Bedingungen werden vor allem bei Absatzferkeln, seltener bei Saugferkeln oder älteren Tieren STEC-Infektionen beobachtet. Sie führen zu Kümmern, katarrhalischer Enterokolitis oder zur Ödemkrankheit. Die Enterokolitis ist durch Nekrosen und fibrinöse Beläge auf der Schleimhaut sowie durch Dilatation und u. U. Atonie der Darmwand charakterisiert. Bei der Ödemkrankheit können zusätzlich Zyanose, Lid- und/oder Mesenterialödeme sowie Stauungen und alveoläre Ödeme der Lunge beobachtet werden.

Auch in der Veterinärmedizin ist der Nachweis von STEC beim Tier nach der Verordnung über meldepflichtige Tierkrankheiten meldepflichtig.

1.3 Differentialdiagnose

entfällt

1.4 Diagnostische Indikation

entfällt

1.5 Zuständige Untersuchungseinrichtung

Zuständig für die Untersuchung auf STEC sind die jeweiligen Landesuntersuchungsämter.
Am Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) ist das Nationales Referenzlabor für *Escherichia coli* einschließlich Verotoxin-bildende *E. coli* etabliert, welches sich vornehmlich mit Untersuchungen im Zusammenhang mit der Lebensmittelproduktion und dem Handel beschäftigt (Leiterin: Dr. Elisabeth Schuh ~~Hauser~~).

Am FLI wurde ebenfalls ein Nationales Referenzlabor für Verotoxin-bildende *E. coli* (VTEC) eingerichtet. Gegenstand der Arbeiten sind u. a.

- Ansprechpartner für Bundes- und Länderbehörden zu Fragen der Epidemiologie und Bekämpfung der Shigatoxin-bildenden *E. coli*
- Überprüfung, Standardisierung und Weiterentwicklung von Untersuchungsmethoden
- Durchführung von Bestätigungsuntersuchungen
- Bereithaltung von Referenzmaterial
- Studien zur Prävalenz von STEC in Tierbeständen
- Charakterisierung von STEC-Isolaten tierischen Ursprungs durch Nachweis von Virulenzmarkern
- Training von Laborpersonal in der STEC/EHEC-Diagnostik
- Mitarbeit bei der Durchführung internationaler Ringversuche, Teilnahme an EU-Ringtests
- Erarbeitung von Kontrollstrategien zur Reduktion der STEC-Belastung in Tierbeständen
- Beteiligung an Arbeitsgruppen und Forschungsprojekten

Friedrich-Loeffler-Institut, Naumburger Str. 96 a, 07743 Jena, Tel. 03641 804-2430~~2100~~

1.6 Rechtsgrundlagen

Der Nachweis von STEC beim Tier ist nach der Verordnung über meldepflichtige Tierkrankheiten meldepflichtig (Verordnung über meldepflichtige Tierkrankheiten in der jeweils gültigen Fassung).

2. Untersuchungsmaterial

2.1 Untersuchungsmaterial für den Erregernachweis

Als Untersuchungsmaterial finden neben kultivierten Bakterienkulturen vor allem auch Materialien wie Kotproben und Milch Verwendung.

2.2 Beförderung der Proben

Die Erreger unterliegen keiner erhöhten Empfindlichkeit gegen äußere Einflüsse, sollten aber trotzdem im gekühlten Zustand und in möglichst kurzer Zeit in die Untersuchungseinrichtung gesendet werden.

3. Untersuchungsgang

3.1 Erregernachweis

Um STEC nachweisen zu können, ist es notwendig, Einzelkolonien des Erregers aus dem Probenmaterial zu isolieren.
Für den Nachweis von STEC muss zunächst die Anzucht von *E. coli* auf gängigen selektiven Nährmedien (z. B. MacConkey-Agar, Gassner-Agar) erfolgen. Dazu wird jeweils 1 g Probenmaterial (Kot) eingewogen und mit 9 ml physiologischer NaCl-Lösung auf dem Vortexer gut gemischt. Anschließend werden von jeder Probe Verdünnungsreihen (10^{-1} bis 10^{-6}) in physiologischer NaCl-Lösung hergestellt und jeweils 100 µl jeder Verdünnung auf dem Selektiv-Agar mittels Drigalski-Spatel ausplattiert. Die Inkubation der Platten erfolgt bei 37 °C über 18 Stunden (Übernachtbebrütung).

3.1.1 Vorscreening der Proben auf STEC

3.1.1.1 DNA-Präparation

Für das Vorscreening der Proben auf STEC wird eine der beiden mit der 10^{-1}-Verdünnung beimpften Platten verwendet.
Auf die Oberfläche der Platte werden 1 ml physiologische NaCl-Lösung pipettiert und anschließend die Bakterienkolonien mittels Drigalski-Spatel in Suspension gebracht. Die Bakteriensuspension wird mittels Pipette in ein Probengefäß (Eppendorf-Tube) überführt.
Die Gewinnung von Bakterien-DNA erfolgt durch Kochlysis. Dazu werden die Bakterien in einer Eppendorf-Zentrifuge (13.000 g, 5 min) pelletiert, anschließend in 1 ml Aqua bidest. resuspendiert und erneut zentrifugiert (13.000 g, 1 min). Dieser Waschschritt wird zweimal wiederholt. Die Bakteriensuspension wird in 200 µl A. bidest. aufgenommen und dann für 10 min bei 95 °C im Thermoblock erhitzt. Nach Abkühlen in Eis für 5 min, zentrifugieren (13.000 g, 1 min). Der Überstand wird in ein neues Eppendorf-Tube überführt und bei 4 °C gelagert.

3.1.1.2 Duplex-PCR zum Nachweis von STEC

Die Duplex-PCR wird unter folgenden Bedingungen durchgeführt:
Pro 25 µl Ansatz werden 5 µl Mastermix (Multiplex PCR Mastermix, New England Biolabs GmbH, Schwalbach, Germany), 2 µl eines Primer-Mixes (Primersequenzen und -konzentrationen – siehe Tabelle 1) und 13 µl A. bidest. eingesetzt. Ergänzt wird der Ansatz durch 5 µl Template-DNA aus der vorher beschriebenen Kochlysis.

Tabelle 1: Charakteristika der Primer für die Duplex-PCR

Primer	Sequenz (5'-3')	Produkt-größe	Primerkonz. (µM)	Annealing-temperatur	Referenz
MP4-stx1A - F	CGATGTTACGGTTTGTTACTGTGACAGC	244	0,2	63	Müller *et al.*, 2007
MP4-stx1A - R	AATGCCACGCTTCCCAGAATTG		0,2		
MP3-stx2A - F	GTTTTGACCATCTTCGTCTGATTATTGAG	324	0,4	63	
MP3-stx2A- R	AGCGTAAGGCTTCTGCTGTGAC		0,4		

Bei jedem Ansatz sind externe Amplifikationskontrollen mitzuführen.

Folgendes Temperatur-Zeit-Programm wird für die Duplex-PCR verwendet:

- Initiale Denaturierung der DNA: 60 sek bei 95 °C
- 35-maliger Durchlauf des folgenden Zyklus:
  - 20 sek bei 95 °C (Denaturierung)
  - 60 sek bei 63 °C (Annealing)
  - 60 sek bei 68 °C (Elongation)
- abschließende Elongation: 5 min bei 68 °C.

Die PCR-Produkte werden auf einem 2%igen Agarose-Gel charakterisiert.
Als STEC-positiv gelten Proben, bei denen entweder eines der beiden Amplifikate (244 bp für *stx1*-Gen bzw. 324 bp für *stx2*-Gen) oder beide Amplifikate detektiert werden.

3.1.1.3 Koloniehybridisierung zur Isolierung von STEC-positiven Einzelkolonien

Einzelkolonien werden von den Proben isoliert, die im Vorscreening als STEC-positiv bewertet wurden. Für die Isolierung werden die Platten mit der Verdünnungsstufe ausgewählt, auf der deutlich abgesetzte Einzelkolonien identifiziert werden können (optional können die Einzelkolonien zur Quantifizierung der gesamten *E. coli*-Zahl ausgezählt werden). Die Isolierung der STEC-positiven Einzelkolonien erfolgt nach folgendem Schema:

Abklatsch der Kolonien auf Nylon-Membranen:

- Agarplatte für mind. 30 min bei 4 °C lagern.
- Nylon-Membran (Nylon Membranes for Colony and Plaque Hybridization, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) kennzeichnen und beschriften.
- Nylon-Membran luftblasenfrei auf die Agarplatte verbringen, ca. 1 min auf den Kolonien liegen lassen, dann vorsichtig abnehmen.
- Die Agarplatten sind als Masterplatten bei 4 °C aufzubewahren.

Lysis der Kolonien und Bindung der DNA an die Nylon-Membranen:

- Denaturierung für 15 min bei Raumtemperatur (Denaturierungslösung: 0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl) auf Filterpapier (Kolonien nach oben).

- Neutralisierung für 15 min bei Raumtemperatur (Neutralisierungslösung: 1,5 M NaCl, 1,0 M Tris-HCl, pH 7,4) auf Filterpapier (Kolonien nach oben).
- Behandlung mit 2 x SSC für 10 min bei Raumtemperatur (2 x SSC - 0,3 M NaCl, 0,03 M Na-Zitrat, pH 7,0) auf Filterpapier (Kolonien nach oben).
- Nylon-Membranen bei Raumtemperatur trocknen lassen, anschließend als „Sandwich“ zwischen zwei Filterpapieren im Vakuumofen bei 80 °C für 30 min unter Vakuum „backen“.

Proteinase K-Behandlung:

- Äquilibrieren der Nylon-Membran mit 2 x SSC für 10 min bei Raumtemperatur auf Filterpapier.
- Filterpapier mit Proteinase K (1 – 2 mg/ml, z. B. Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) in 2 x SSC tränken, Nylon-Membran auf Filterpapier verbringen, Inkubation 1 h bei 37 °C.

Herstellung der *stx1*/*stx2*-markierten DNA-Sonde:

- Die DNA-Sonde wird unter Verwendung der Primer MP4-stx1A - F und MP4-stx1A - R bzw. MP3-stx2A - F und MP3-stx2A - R (siehe oben) mit dem PCR DIG Probe Synthesis Kit (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) nach Vorgaben des Herstellers markiert.
- Die Testung der Sonde erfolgt an definiert Shigatoxin-positiven und -negativen Kolonien.

Vorhybridisierung:

- Hybridisierungsofen auf 42 °C erwärmen.
- Nylon-Membranen in Glasröhren für die Hybridisierung verbringen, Zugabe von auf 42 °C vorgewärmte DIG Easy Hyb-Lösung (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany), die Menge ist von der Größe der Röhren abhängig, ansonsten entsprechend der Vorgaben des Herstellers.
- Inkubation bei 42 °C für 15 - 30 min im Hybridisierungsofen, danach DIG Easy Hyb-Lösung abgießen.

Hybridisierung:

- Hybridisierungslösung vorbereiten (markierte DNA-Sonde + DIG Easy Hyb-Lösung, Sonde in der Konzentration je nach Vorgabe des Herstellers, dazugeben), auf 65 °C 10 min erwärmen, danach sofort auf Eis! (Bei Erstgebrauch der DNA-Sonde ist diese zur Denaturierung auf 95 °C zu erwärmen und danach sofort auf Eis zu verbringen).
- Zugabe der vorbereiteten Hybridisierungslösung in die Glasröhren mit den vorhybridisierten Nylon-Membranen (Menge der Hybridisierungslösung nach Vorgaben des Herstellers).
- Über Nacht bei 42 °C im Hybridisierungsofen hybridisieren.

Waschen

- Nylon-Membranen in 2 x SSC/0,1 % SDS für 5 min bei Raumtemperatur in den Glasröhren im Hybridisierungsofen waschen, Waschvorgang 2 x durchführen.
- Nylon-Membranen in 0,5 x SSC/0,1 % SDS für 15 min bei 68 °C in den Glasröhren im Hybridisierungsofen waschen, Waschvorgang 2 x durchführen.
- Nylon-Membranen in Petrischalen überführen.

- Waschpuffer herstellen (10 x Waschpuffer [Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany] mit A. bidest 1 : 10 verdünnen).
- Nylon-Membranen für 3 – 5 min in 1 x Waschpuffer bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubieren.

Blockierung

- Blockingpuffer herstellen (10 x Maleinsäurepuffer [Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany] mit A. bidest 1 : 10 verdünnen, 10 x Blockingpuffer [Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany] mit 1 x Maleinsäurepuffer im Verhältnis 1 : 10 verdünnen.
- Nylon-Membranen in 6 ml 1 x Blockingpuffer für 30 - 60 min bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubieren.

Detektion

- Anti-Digoxigenin-AP, Fab-Fragmente-Konjugat (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) 1 : 5000 mit 1 x Blockingpuffer verdünnen.
- Nylon-Membranen in 6 ml Konjugatlösung für 30 min unter Schütteln bei Raumtemperatur inkubieren.
- Nylon-Membranen in 1 x Waschpuffer (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) für 15 min unter Schütteln bei Raumtemperatur waschen, Waschvorgang 2 x durchführen.
- Detectionpuffer herstellen (10 x Detectionpuffer [Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany] 1 : 10 mit A. bidest verdünnen.
- Nylon-Membranen für 2 - 5 min unter Schütteln bei Raumtemperatur equilibrieren.
- Substrat herstellen (50 µl 4-nitro blue tetrazolium chloride-[NBT, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany]-Lösung + 37,5 µl 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate-[BICP, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany]-Lösung + 10 ml 1 x Detectionpuffer)
- Nylon-Membranen mit Kolonien nach unten in 5,5 ml Substratlösung legen, Farbreaktion erfolgt unter Ausschluss von Licht bei Raumtemperatur.
- Farbreaktion nach 2 h mit A. bidest stoppen
- Nylon-Membranen mit A. bidest 3 x waschen, lufttrocknen.
- Deutlich violett gefärbte Kolonien sind als STEC-positiv zu bewerten.

Die Shigatoxin-positiven Kolonien sind den Originalkolonien auf den Masterplatten zuzuordnen. Da mehr als ein STEC-Klon pro Probe häufig nachzuweisen ist, sollten, wenn vorhanden, mindestens 10 Kolonien (Döpfer *et al.*, 2008) in die Stammhaltung überführt werden. Die STEC-Isolate können zur weiteren Charakterisierung an das NRL übersandt werden.

3.2 Charakterisierung STEC-positiver Isolate

Die weitere Charakterisierung von STEC-positiven Isolaten sollte dem NRL vorbehalten sein. Folgende Methoden stehen zur Verfügung:

- Charakterisierung von STEC/EHEC-Stämmen mittels konventionellen und real-time PCRs
- Micro-Array basierte Charakterisierung von STEC/EHEC-Stämmen (Nachweis von STEC-Virulenzmarkern, DNA-basierte Serotypisierung, Nachweis von Resistenzgenen)
- Restriktionsfragment-Pattern-Analyse (RFLP) mittels Pulsfeld-Gelelektrophorese
- Multi-Lokus-Sequenz-Typisierung (MLST)
- Genomsequenzierung von STEC/EHEC-Isolaten
- Shigatoxin-Nachweis mittels ELISA
- Shigatoxin-Nachweis mittels Verozelltest kombiniert mit dem Verozellneutralisationstest

Literatur

- Döpfer, D., W. Buist, Y. Soyer, M. A. Munoz, R. N. Zadoks, L. Geue, and B. Engel., 2008. Assessing genetic heterogeneity within bacterial species isolated from gastrointestinal and environmental samples: how many isolates does it take? Appl. Environ. Microbiol. 74:3490-3496.
- Müller, D., L. Greune, G. Heusipp, H. Karch, A. Fruth, H. Tschäpe, and M. A. Schmidt., 2007. Identification of unconventional intestinal pathogenic *Escherichia coli* isolates expressing intermediate virulence factor profiles by using a novel single-step multiplex PCR. Appl. Environ. Microbiol. 73:3380-3390.

Friedrich-Loeffler-Institut, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit
Südufer 10, D-17493 Greifswald – Insel Riems, Homepage des FLI