

Multiplex real-time PCR zum Nachweis von EHEC/EPEC

Escherichia coli (*E. coli*) sind gram-negative, durch peritriche Begeißelung bewegliche, fakultativ anaerobe Stäbchenbakterien und gehören zur Familie der *Enterobacteriaceae*. Das *E. coli* Bakterium ist Teil der humanen Darmflora, aber auch vieler landwirtschaftlicher Nutztiere und in der Regel nicht pathogen. *E. coli* zeichnet sich wie viele Bakterien durch eine hohe genetische Variabilität aus und kann daher durch den Erwerb spezifischer Pathogenitätsfaktoren human-pathogen sein. Die Pathogenität zeigt sich in Darmerkrankungen wie Gastroenteritis bis hin zum hämolytisch-urämisches Syndrom (HUS), welches im Ernstfall bis zum Nierenversagen und Tod führen kann. Der Ausbruch des bis dato unbekanntes Stammes O104:H4 im Jahre 2011 mit mehr als 40 Todesopfern zeigte schwerwiegende Krankheitsverläufe auch bei jungen und gesunden Personen, die bis dahin nicht zur Risikogruppe zählten. Die Übertragung erfolgte damals erstmalig über kontaminiertes Pflanzenmaterial (Sprossen) und nicht nur, wie bisher bekannt, über tierische Lebensmittel. Die Lebensmittelüberwachung wurde daraufhin deutlich verschärft. Aufgrund der hohen Anpassungsfähigkeit der Bakterien ist ein neues Ausbruchgeschehen jedoch jederzeit denkbar.

Die Pathogenität ist abhängig von den jeweiligen Pathogenitätsfaktoren und deren genetischer Grundlage: Gene für die Toxinbildung (Shigatoxine), Gene für die Anheftung an Zielzellen etc. Die sechs bekannten darm-pathogenen *E.coli*: enterohämorrhagische *E. coli* (EHEC), enteropathogene *E. coli* (EPEC), enterotoxische *E. coli* (ETEC), enteroinvasive *E. coli* (EIEC), EAEC enteroaggregative *E. coli* und diffus adhärenente *E. coli* (DAEC) lassen sich durch die spezifischen Pathogenitätsfaktoren differenzieren. EHEC sind eine Untergruppe der Shigatoxin- bzw. Verotoxinbildenden *E. coli* (STEC bzw. VTEC) und haben die Fähigkeit zur Bildung zweier Zytotoxine, Verotoxin 1 und 2. Wegen der Ähnlichkeit der Verotoxine zum Shigatoxin von *Shigella dysenteriae* werden die VTEC synonym auch als STEC bezeichnet. Ein weiterer wichtiger diagnostischer EHEC

Tabelle 1 zeigt eine Übersicht zur Interpretation der Ergebnisse:

Pathogenitätsfaktor-Gene			VIC Kanal ICD	Ergebnis
FAM-Kanal <i>stx1/stx2</i>	ROX -Kanal <i>ipaH</i>	Cy5-Kanal <i>eae</i>		
positiv	negativ	negativ	positiv	STEC (EHEC)
positiv	negativ	positiv	positiv	EHEC
negativ	negativ	positiv	positiv	EPEC
negativ	positiv	negativ	positiv	EIEC/ <i>Shigella</i> spp.
positiv	positiv	negativ	positiv	<i>Shigella dysenteriae</i> Typ 1
negativ	negativ	negativ	positiv	negativ (Virulenzfaktor-Gene sind nicht nachweisbar)
negativ	negativ	negativ	negativ	nicht auswertbar

Pathogenitätsfaktor ist neben *stx1/stx2* (Shigatoxin-Gene) das *eae*-Gen (*E. coli* attaching and effacing Gen), welches ein 90 kDa Protein, das Intimin codiert. Intimin befähigt den Erreger u.a. sich an die Darmepithelzellen anzuheften. Durch den Nachweis des *ipaH* Gens (invasion plasmid antigen H Gen) können EHEC/STEC gegen Shigellen/EIEC abgegrenzt werden. Enteropathogene *E. coli* (EPEC) verursachen vor allem bei (Klein-)Kindern Durchfallerkrankungen. Der EPEC Pathogenitätsfaktor ist das *eae*-Gen.

Molekularbiologische Analysemethoden sind neben den klassischen mikrobiologischen Untersuchungsverfahren etablierte Schnellmethoden zur Untersuchung von Lebensmitteln auf Bakterien. Die DNA-basierte Analytik bietet gegenüber anderen Analysemethoden den Vorteil eines stabilen Zielmoleküls, welches mittels spezifischer Primer und Sonden sehr sensitiv detektiert werden kann. Darüber hinaus kann mit nur einer DNA-Extraktion pro Probe gleichzeitig auf mehrere Analyten untersucht werden. Dadurch lässt sich die Bearbeitungszeit auf ein Minimum reduzieren. Mittels Multiplex real-time PCR können die Gene, welche für die einzelnen Pathogenitätsfaktoren kodieren, sicher und spezifisch in Lebensmitteln nachgewiesen werden. Es werden alle *E.coli* erfasst, die zur Bildung o.g. Virulenzfaktoren in der Lage sind. Die Firma CONGEN hat mit dem Sure-

Fast EHEC/EPEC 4plex ein Multiplex System entwickelt, welches den gleichzeitigen Nachweis von *stx1/stx2* (FAM Kanal), *eae* (ROX Kanal) und des *ipaH*-Gens(Cy5 Kanal) in einer Reaktion erlaubt. Drei *stx1* Subtypen (*stx1 a-d*) und sieben *stx2* Subtypen (*stx2 a-g*) werden mit dem Test erfasst. Neben dem Nachweis von EHEC, STEC und EPEC werden darüber hinaus auch EIEC und *Shigella Spezies* detektiert. Der SureFast EHEC/EPEC Test ist außerdem mit einer Internal Control DNA (ICD) ausgestattet, die zusätzlich das Ergebnis absichert. Die Internal Control DNA (ICD) kann entweder nur als Inhibitionskontrolle oder als Extraktionskontrolle für die Probenpräparation und Inhibitionskontrolle verwendet werden.

Der Test kann auf allen gängigen real-time PCR Geräten eingesetzt werden, die über mindestens vier Detektionskanäle verfügen (z.B. CFX96, Qiagen Rotorgene Q, Light Cycler® 480, ABI 7500, Agilent MX 3005P).

Kontakt:
 CONGEN Biotechnologie GmbH
 Robert-Rössle-Str. 10
 13125 Berlin
 Tel 030/9489 3500
 Fax 030/9489 3510
 E-Mail info@congen.de
www.congen.de