

SureFast® STEC 4plex-Multiplex real-time PCR zum Nachweis von stx, eae und O157

Enterohämorrhagische *Escherichia coli* sind gramnegative Bakterien, welche die Eigenschaft zur Synthese bestimmter Toxine besitzen. Sie werden unter dem Begriff Shiga-Toxin-bzw. Vero-Toxin-produzierende *E. coli* (STEC bzw. VTEC) zusammengefasst. Basierend auf ihrer Antigen-Struktur werden sie verschiedenen Serogruppen (Einteilung nach Oberflächen O-Antigenen) zugeordnet. Die weltweit am häufigsten isolierte EHEC-Serogruppe ist O157. Die Erreger werden oft durch kontaminierte Lebensmittel übertragen.

Durch STEC verursachte Krankheiten zeigen ein breites Spektrum an Symptomen vom leichten Durchfall bis zum Hämolytisch-urämischem Syndrom (HUS). Im Jahr 2015 wurden laut EU-Zoonosenbericht, der von der Europäischen Behörde für Lebensmittelsicherheit (EFSA) und dem Europäischen Zentrum zur Prävention und Kontrolle von Krankheitsausbrüchen (ECDC) herausgegeben wird, 6025 humane STEC Infektionen berichtet. Mit 41,7% aller bestätigten Fälle ist O157 die am häufigsten vorkommende Serogruppe. Dies spiegelt sich auch in den Befunden der Lebensmittelanalyse wider. Hier wurden 602 Proben positiv detektiert, von denen 45% als O157 identifiziert wurden. Deshalb liegt der Fokus sowohl vieler staatlicher Überwachungsprogramme als auch der Industrie Eigen-Kontrollen auf der Untersuchung dieses Serotyps. Um diesen Bedürfnissen gerecht zu werden, wurde ein real-time PCR System zum simultanen Nachweis der wichtigsten STEC assoziierten Virulenzfaktoren *stx1*, *stx2* und *eae* sowie der Serogruppe O157 entwickelt. In einer In-house-Validierung wurde die Multiplex PCR auf Spezifität, Robustheit, Präzision, Nachweisgrenze und Stabilität getestet. Darüber hinaus erfolgte eine technische Gerätevalidierung auf acht verschiedenen real-time PCR Cyclern. Im Rahmen einer Sensitivitäts-

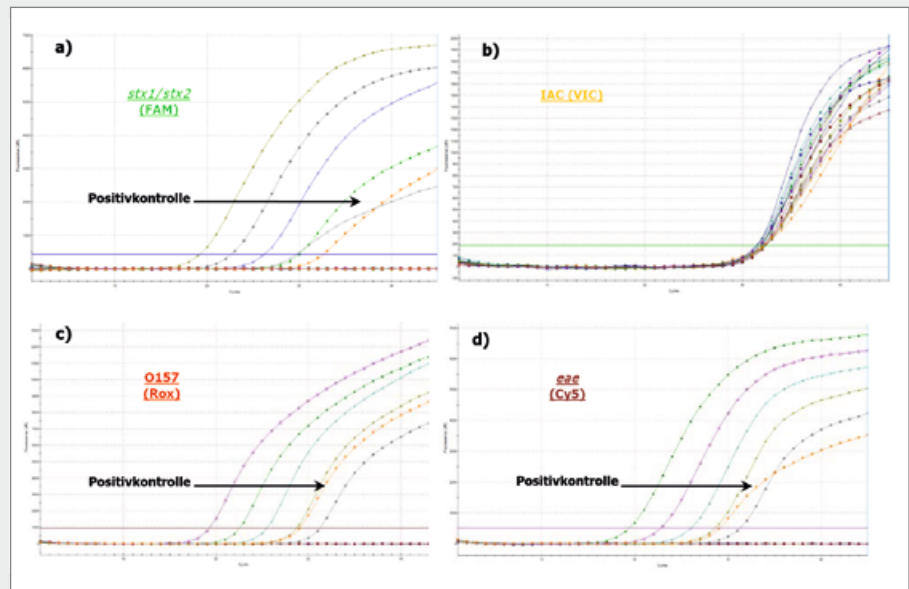


Abb. 1: Real-time PCR mit SureFast® STEC 4plex (Agilent Mx3005P)

- a) zeigt eine Standardreihe ($10^1 - 10^5$ DNA Kopien/ μ l) und Positivkontrolle zum Nachweis von *stx1/stx2* im FAM-Kanal
- b) zeigt die interne Amplifikationskontrolle (IAC) im VIC-Kanal
- c) zeigt eine Standardreihe ($10^1 - 10^5$ DNA Kopien/ μ l) und Positivkontrolle zum Nachweis O157 im Rox-Kanal
- d) zeigt eine Standardreihe ($10^1 - 10^5$ DNA Kopien/ μ l) und Positivkontrolle zum Nachweis *eae* im Cy5-Kanal

studie wurden 15 Lebensmittelmatrizes aus 5 Kategorien (Geflügelfleisch, Fleischprodukte, Milchprodukte, Gemüse und Eiprodukte) mit *E. coli* in unterschiedlichen Konzentrationen kontaminiert. Nach Anreicherung nach DIN CEN ISO/TS 13136 mit modifizierter Trypton-Soja Bouillon mTSB wurde die DNA mit SureFast® PREP Bacteria und SureFast® Speed PREP extrahiert. SureFast® PREP Bacteria realisiert die DNA-Extraktion mit Hilfe eines Spinfilter basierten Systems wohingegen im SureFast® Speed PREP Kit eine Schnellextraktion mit Hilfe eines speziellen Lysepuffers erfolgt. Beide Extraktionsverfahren ermöglichen einen zuverlässigen STEC-Nachweis in der Multiplex PCR (SureFast® STEC 4plex) bei hoch und niedrig inokulierten Matrizes. Die Abbildung 1 zeigt beispielhaft real-time PCR Daten auf dem Agilent Mx3005P.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass der Test die schnelle und sensitive Detektion der wichtigsten STEC assoziierten Virulenzfaktoren und des wichtigsten Serotyps O157 erlaubt und damit als geeignetes Werkzeug für eine sichere und effektive Routineüberwachung eingesetzt werden kann.

Kontakt:

CONGEN Biotechnologie GmbH
Dipl.-Oecotroph. Erika Lorenzen
Robert-Rössle-Str. 10
13125 Berlin
Tel.: +49 (30) 94893500
Fax: +49 (30) 94893510
E-Mail: info@congen.de
www.congen.de