

Charité-Universitätsmedizin Berlin  
Campus Benjamin Franklin  
Aus dem Institut für Infektionsmedizin  
Geschäftsführender Direktor  
Prof. Dr. med. Dr. h.c. Helmut Hahn  
Abteilung: Medizinische Mikrobiologie und  
Infektionsimmunologie  
Abteilungsleiter: Prof. Dr. med. Dr. h.c. Helmut Hahn  
Arbeitsgruppe Prof. Dr. med. Oliver Liesenfeld

**Entwicklung einer Multiplex-PCR zum Nachweis  
Enteropathogener *Escherichia coli***

Inaugural- Dissertation  
zur Erlangung der  
Medizinischen Doktorwürde  
der Charité-Universitätsmedizin Berlin  
Campus Benjamin Franklin

vorgelegt von Guido Mewis  
aus Berlin

Referent: Prof. Dr. med. Oliver Liesenfeld

Korreferent: Prof. Dr. med. J.-D. Schulzke

Gedruckt mit Genehmigung der Charité-Universitätsmedizin  
Berlin Campus Benjamin Franklin

Promoviert am 02.04.2004

## Zusammenfassung

### Entwicklung einer Multiplex-PCR zum Nachweis enteropathogener *Escherichia coli*

5 verschiedene Pathovaren enteropathogener *E. coli* sind beschrieben: *EHEC*, *EPEC*, *ETEC*, *EIEC* und *EaggEC*. Die unterschiedlichen klinischen Bilder beruhen auf einer differierenden Ausstattung der Pathovaren mit Virulenzfaktoren. Serotyping ist nutzlos für die Diagnostik, und Methoden auf DNA- Ebene müssen entwickelt werden. Da die Diagnostik in Deutschland im wesentlichen serologisch geführt wird, gibt es noch keine validen Prävalenzen. Wir entwickelten ein Multiplex-PCR-Panel, um mindestens 1 Virulenzfaktor für jeden Pathovar nachzuweisen, zuzüglich einer Positivkontrolle zum Erkennen von Inhibition der PCR. Die Pathovaren wurden direkt aus Stuhlproben bzw. Rektalabstrichen nachgewiesen. Der Einsatz in der Routine- Diagnostik wurde anschließend anhand von 225 Proben von Kindern und Reiserückkehrern getestet. In 13 Proben trat Inhibition auf. In 19.3% aller Proben wurden Pathovaren enteropathogener *E. coli* nachgewiesen. Reiserückkehrer waren dabei mit 26.2% häufiger betroffen als Kinder mit 21.6%. *EaggEC* war der dominierende Pathovar mit einem Anteil von 47.6% an allen positiven Proben (bei Kindern 59.7%, bei Reiserückkehrern 43.8%), gefolgt von *EIEC* mit 28.3% und *ETEC* mit 15.2%. Nur in einer Minderheit der positiven Proben fanden sich *EHEC* (6.5%) und *EPEC* (2.2%). Unsere Studie zeigt, dass enteropathogene *E. coli* ein wichtiger Auslöser von Durchfällen in Deutschland sind. *EaggEC* spielen eine weit größere Rolle als bisher angenommen. Wir etablierten eine Methode zum simultanen Nachweis der 5 Pathovaren von *E. coli* auf DNA- Ebene und schlossen die diagnostische Lücke hinsichtlich des Nachweises der *EaggEC*. Die Multiplex- PCR bewies sich als schnelle, kostengünstige, höchst sensitive und höchst spezifische Methode und somit als sinnvolle Ergänzung der mikrobiologischen Diagnostik.

# Entwicklung einer Multiplex- PCR zum Nachweis Enteropathogener *Escherichia coli*

## Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung
  - 1.1. Stand der Forschung
    - 1.1.1. Enteropathogene *Escherichia coli*
    - 1.1.2. Klinik, Epidemiologie und Virulenzfaktoren Enteropathogener *Escherichia coli*
      - 1.1.2.1. Enterotoxigene *Escherichia coli*
      - 1.1.2.2. Enteropathogene *Escherichia coli*
      - 1.1.2.3. Enterohämorrhagische *Escherichia coli*
      - 1.1.2.4. Enteroinvasive *Escherichia coli*
      - 1.1.2.5. Enteroaggregative *Escherichia coli*
      - 1.1.2.6. Diffus- Adhärierende *Escherichia coli*
    - 1.1.3. Stand der Diagnostik
    - 1.1.4. Fragestellung
  2. Material und Methodik
    - 2.1. Abriß des Vorgehens
    - 2.2. *Escherichia coli*- Referenzstämme
    - 2.3. Aufbereitung der Proben
      - 2.3.1. DNA- Gewinnung aus Bakterienkulturen
      - 2.3.2. DNA- Gewinnung aus Rektalabstrichen
      - 2.3.3. DNA- Gewinnung aus Stuhlproben
    - 2.4. Konventionelle Diagnostik
    - 2.5. Prinzip der Multiplex- PCR
    - 2.6. Verwendete Primer und Protokolle
    - 2.7. Optimierung der PCR
    - 2.8. Auswahl der Patienten
  3. Ergebnisse
    - 3.1. Einzeltestung der Primer

- 3.2. Optimierung der PCR
  - 3.2.1. Magnesium- Konzentration
  - 3.2.2. NH<sub>4</sub>-Puffer- Konzentration
  - 3.2.3. Taq- Polymerase- Konzentration
  - 3.2.4. Additiva
  - 3.2.5. Thermocycler- Einstellungen
  - 3.2.6. Prüfung der Sensitivität
- 3.3. Prüfung der Spezifität
- 3.4. Kombination der Primer und Erstellung eines Multiplex- Panels
- 3.5. Auswertung der Proben: Ergebnisse des Screenings von 225 Proben

4. Diskussion
  - 4.1. Sensitivität und Spezifität
  - 4.2. Ergebnisse des Patienten- Screenings
  - 4.3. Anwendungsmöglichkeiten des Multiplex- Panels-  
diagnostische, medizinische und epidemiologische Relevanz
  - 4.4. Schlußfolgerung und Ausblick

5. Zusammenfassung

6. Literaturnachweis

7. Appendix

- 7.1. Ergebnislisten
- 7.2. Vergleich mit den Einsenderdiagnosen
- 7.3. Poster DGHM (10/2002)
- 7.4. Tabellarischer Lebenslauf
- 7.5. Danksagung