

2. Material und Methodik

2.1. Abriß des Vorgehens

In vorhergehenden Studien erfolgreich getestete Primersequenzen für enteropathogene *E. coli* wurden gesucht und auf ihre Brauchbarkeit in der Diagnostik Enteropathogener *E. coli* mittels Multiplex- PCR getestet.

Der Aufbau der vorliegenden Dissertation von der Literaturrecherche über die Etablierung eines Multiplex- PCR- Panels bis zur Querschnittsuntersuchung von über 200 Patienten ist in Abb. 1 nachgezeichnet:

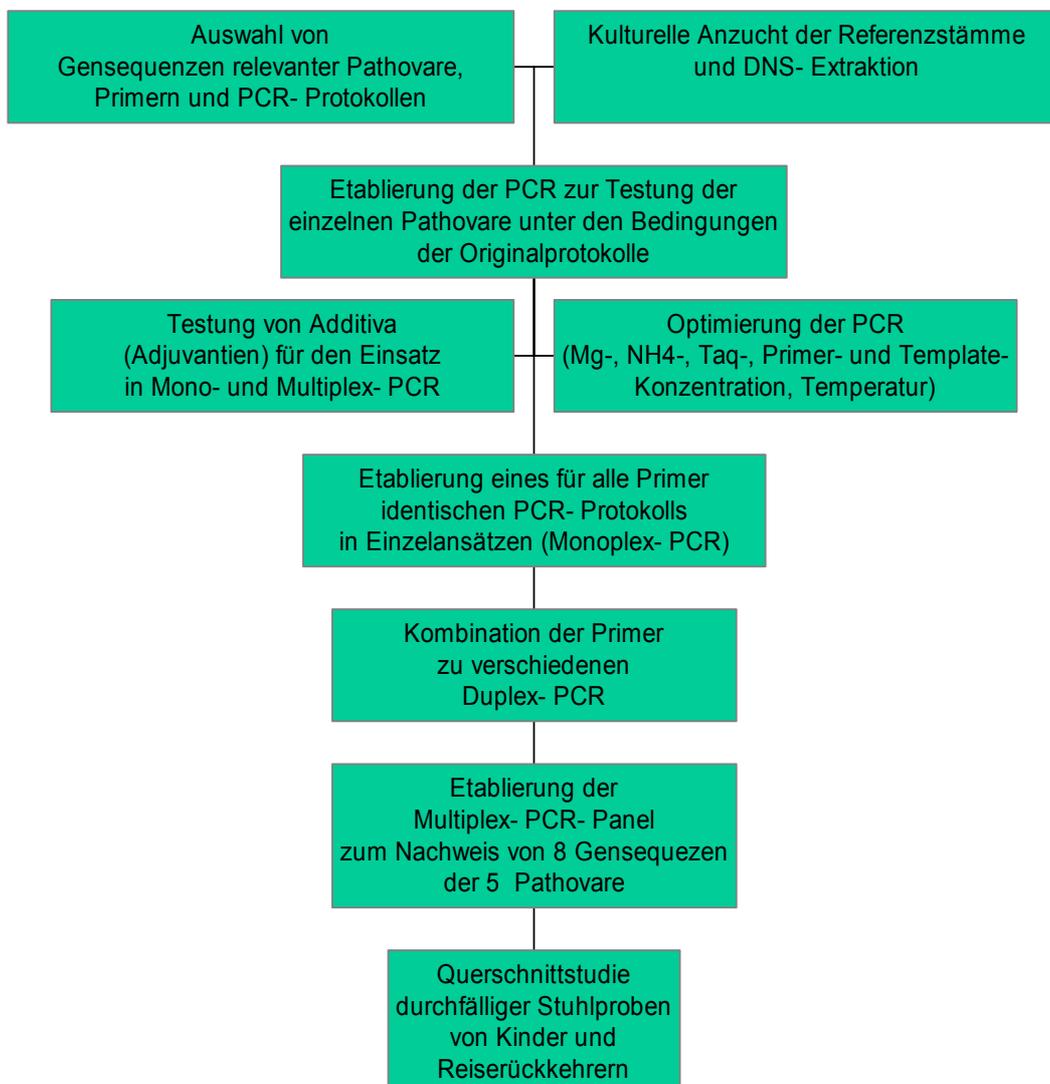


Abb. 1: Vorgehensweise in dieser Arbeit

2.2. *E. coli*- Referenzstämme

Referenzstämme von *E. coli*- Pathovaren wurden von Stichagar (Transportmedium) auf Endo- Agar ausgestrichen und anschließend für 24 h bei 37°C bebrütet. Zur Aufbewahrung wurden Referenzstämme auf Stichagar überimpft und bei Raumtemperatur gelagert.

Bei 4°C konnten *E. coli* auf mit Tesafilm luftdicht verschlossenen Platten bis zu 4 Wochen, auf Stichagar mindestens ein Jahr lebensfähig gehalten werden. Alle drei Monate wurden die Keime erneut überimpft und das Vorhandensein ihrer Virulenzfaktoren mittels PCR kontrolliert. Zur Reaktivierung von Stämmen wurde Brain- Heart- Boullion (Routine-labor, Hausinterner Ansatz) verwendet.

Tabelle 3 zeigt die verwendeten Patho- bzw. Serovare sowie deren Herkunft.

Tab. 3: Referenzstämme von *E. coli*

Pathovar	Serovar / Codename	Herkunft
<i>EHEC</i>	O157:H- E32511	Laborintern
<i>EHEC</i>	O157:H- Nr.3999	Laborintern
<i>EHEC</i>	O157:H- Nr.1665	Laborintern
<i>ETEC</i>	SZ 1158/2000	Hygiene- Institut Hamburg
<i>ETEC</i>	C 76 a (IMT 749)	FU Berlin, FB Veterinärmedizin
<i>ETEC</i>	D 13 (IMT 941)	FU Berlin, FB Veterinärmedizin
<i>EPEC</i>	O18ac,O26,O44:H2,O55,O86,O111, O114, O119,O125ac,O126,O127, O128,O142,O158,O159	Laborintern
<i>EPEC</i>	E 2348/ 69 (IMT 8)	FU Berlin, FB Veterinärmedizin
<i>EIEC</i>	E12860	Hygiene- Institut Hamburg / Rowe
<i>EaggEC</i>	O3:H2 Nr.17-2	Universität Würzburg, Hygiene- Institut

2.3. Aufbereitung der Proben

2.3.1. DNS- Extraktion aus Bakterienkulturen

Nach 24 h Bebrütung auf Endoagar (hausintern) wurden je 5 Einzelkolonien der Enteropathogenen *E. coli* entnommen und in Eppendorff- Gefäßen mit 0.5 ml Aqua tridest verrührt, 5 min bei 96°C über dem Bunsenbrenner gekocht und anschließend 10 min bei 14000g (Eppendorff Centrifuge 5415C) zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert, in 5 Portionen aliquotiert und in Eppendorf- Gefäßen bei – 20°C eingefroren. 2,5µl des so gewonnenen Überstandes (Template) entsprechen ungefähr dem 40. Teil einer 24 h alten Kolonie, d.h. der DNS von etwa 2500 Erregern. Die Güte der Extraktion wurde mittels quantitativen DNS- Nachweises am Photometer (Beckman DU 600) überprüft.

2.3.2. DNS-Gewinnung aus Rektalabstrichen

Rektalabstriche von Säuglingen wurden nach Entnahme vom einsendenden Institut (Vivantes- Klinikum Neukölln) in Selenitboullion überführt und mindestens 24 h bebrütet. Für diese Studie wurde 1 ml der bebrüteten Boullion abgenommen, 1 min bei 10000g zentrifugiert (Eppendorff 5415C) und mit 1 ml PBS aufgefüllt. Nach 5 Waschzyklen mit PBS wurden die Proben mit 0.5 ml Aqua tridest aufgefüllt und wie unter 2.3.1. weiterverarbeitet. Parallel wurde Material zur Verwahrung der Erreger auf Endo ausgestrichen.

2.3.3. DNS- Gewinnung aus Stuhlproben

DNS wurde aus Stuhlproben nach dem Lyse- Protokoll für Bakterien- DNS mit dem QIAmp DNA Stool Mini Kit (Quiagen, Hilden) extrahiert. 200µl Stuhl wurde in mehreren Waschvorgängen von Inhibitionsfaktoren gereinigt und danach mit Proteinase K und Ethanol lysiert. Anschließend wurde die DNS an eine Filtersäule adsorbiert und der Überstand herausgewaschen. Im letzten Arbeitsgang wurde die DNS vom Filter gelöst und abzentrifugiert. Das gewonnene Eluat diente direkt als Templat für die PCR.

2.4. Konventionelle Diagnostik

Sämtliche Proben wurden von den Einsender- Instituten einer konventionellen Diagnostik unterzogen. Die in der PCR positiv getesteten Isolate wurden auf Endo- Agar ausgestrichen, 24 h bebrütet und dann subkultiviert. Sowohl vom ersten Ausstrich auf Endo als auch von *E. coli*- suspekten Reinkulturen wurde mittels Kochens (siehe 2.5.1.) DNS isoliert und erneut in der PCR auf bekannte Virulenzfaktoren (s.u.) getestet. Wenn der Nachweis in der PCR gelang, wurde zur Differenzierung der Kulturisolate eine biochemische Leistungsprüfung mittels API 20 E (bioMerieux, Marcy-l'Etoile, Frankreich) bzw. hauseigener ‚bunter Reihe‘ durchgeführt. Bei Verdacht auf *EHEC* wurde der Toxinnachweis im Stuhl mittels ELISA (HISS Diagnostik, Freiburg) genutzt. Bei Verdacht auf *Shigella ssp.* bzw. *EIEC* wurden die Kolonien zusätzlich zur bunten Reihe mit Polyvalentem *Shigella*- Antiserum I-III (SIFIN, Berlin) agglutiniert.

2.5. Prinzip der Multiplex- PCR

Ziel der PCR ist die Amplifikation eines bekannten DNS- Abschnittes mittels einer hitzestabilen Polymerase und sequenzspezifischen Primern. Initial wird die DNS bei 94- 96°C in der *Denaturierungsphase* in Einzelstränge aufgespalten. Mit Abkühlung auf eine Primerspezifische Temperatur können sich in der *Annealingphase* Primer an die komplementären Einzelstränge anlagern. Durch Erhitzung auf 68- 72°C beginnt die Taq- Polymerase in der *Extensionsphase* an den Primern mit der Polymerisation, d.h. Bindung der komplementären Basen an die Einzelstrang- DNS. Eine erneute Erhitzung leitet die nächste Denaturierungsphase ein, und nach 20- 40 Zyklen ist eine ausreichende Menge des gewünschten Produktes vorhanden. Kühlung auf 4°C beendet die Reaktion.

Während in der *Monoplex- PCR* pro Primerpaar nur eine DNS- Sequenz amplifiziert wird, setzt man bei der *Duplex- PCR* gleichzeitig 2 Primerpaare zum Nachweis zweier Genabschnitte ein. In der *Multiplex- PCR* werden mehrere Sequenzen simultan mit verschiedenen Primerpaaren in einem Ansatz amplifiziert.

2.6. Verwendete Primer und Protokolle

Publizierte Studien zum Nachweis enteropathogener *E. coli* mittels PCR- Technik wurden zur Auswahl von Multiplex- PCR- geeigneten Primerpaaren herangezogen. Weil bei *ETEC* und *EHEC* auch Stämme beschrieben waren, bei denen nur einzelne der jeweils bekannten Virulenzfaktoren nachweisbar waren, wurden für diese Pathovaren je zwei Primerpaare für verschiedene Gene ausgewählt: für *ETEC LT* und *ST*, für *EHEC SLT 1* und ein Haushaltsgen (*uidA*). Da Inhibitoren in der Stuhl- PCR ein bekanntes Phänomen darstellen und apathogene *E. coli* in jeder Stuhlprobe vorhanden sein sollten, wurde 1 Primerpaar für ribosomale *E. coli*- DNS (Normalflora) als Interne Kontrolle eingeführt. Die Primer wurden so ausgewählt, daß sie mindestens 30 Basenpaare auseinanderlagen. Tabelle 4 zeigt die 14 untersuchten Primerpaare und – soweit bekannt – die Originalprotokollbedingungen.

Tab. 4: Primer und Protokolle

Pathovar	Zielgen	Primer	Sequenz 5' - 3'	Reaktionsbedingungen	Produktlänge	Quelle
<i>ETEC</i>	<i>LT I</i>	<i>LT51</i> <i>LT31</i>	Ccgtattacagaaatctga gtgcatgatgaatccagggt	94°C 20'' 60°C 30'' 72°C 30'' + final 72°C 2'; 35 Zyklen	110 bp	47
<i>ETEC</i>	<i>ST I</i>	<i>JW7</i> <i>JW14</i>	cacccggtagaagcaggatt attttattctgtattatctt	95°C 45'' 50°C 45'' 72°C 45'' + final 72°C <10'	190 bp	48
<i>ETEC</i>	<i>ST a</i>	<i>I</i> <i>II</i>	ctgtattgtcttttccact gcacccggtagaagcaggat	Nicht angegeben	182 bp	11
<i>ETEC</i>	<i>LT H</i>	<i>LT H Start</i> <i>LT H Ende</i>	gcgttactactcctctctatg attgggggtttattattcc	94°C 30'' 49°C 1' 72°C 40'' ; 30 Zyklen	312 bp	3, H.Karch unpubliziert
<i>ETEC</i>	<i>ST H</i>	<i>ST H Start</i> <i>ST H Ende</i>	tcctcaggatgctaaac gcaacaggtacatacgt	94°C 30'' 48°C 1' 72°C 40'' ; 30 Zyklen	244 bp	3, H.Karch unpubliziert
<i>EPEC</i>	<i>ECB</i>	<i>ECB 1 (S)</i> <i>ECB 2(AS)</i>	gattgaatctgcaatgggtc ggattactgtcctcacatat	Nicht angegeben	557 bp	45
<i>EPEC</i>	<i>EAF</i>	<i>EAF 1</i> <i>EAF 25</i>	cagggtaaaagaaagatgataa tatggggaccatgtattatca	96°C 40'' 60°C 1' 70°C 45'' ; 30 Zyklen	397 bp	42
<i>EHEC</i>	<i>SLT I</i>	<i>LP 30</i> <i>LP 31</i>	cagttaatgtggtggcgaagg caccagacaatgtaaccgctg	94°C Zeit nicht angegeben 64°C 90'' 72°C 90'' ; 35 Zyklen	348 bp	25
<i>EHEC</i>	<i>SLT II</i>	<i>F</i> <i>R</i>	ccatgacaaaggacagcagtt cctgtcaactgagcactttg	94°C 30'' 56°C 30'' 72°C 30''+ final 72°C 10'	779 bp	7
<i>EHEC</i>	<i>uid A</i>	<i>PT 2</i> <i>PT 3</i>	gcgaaaactgtggaattggg tgatgctccatcacttctg	94°C Zeit nicht angegeben 64°C 90'' 72°C 90''; 35 Zyklen	252 bp	25
<i>STEC</i>	<i>ECW</i>	<i>ECW 1(S)</i> <i>ECW 2(AS)</i>	tgcggcacaacaggcggcga cggtcgccaccaggattc	Nicht angegeben	489 bp	45
<i>EIEC</i>	<i>Shig</i> <i>ipaH</i>	<i>P III</i> <i>P IV</i>	gttccttgaccgccttccgataccgtc gccggtcagccacctctgagagtac	94°C 1' 50°C 90'' 68°C 2-4'; 35 Zyklen	603 bp	50
<i>EaggEC</i>	<i>pCVD</i>	<i>432Start</i> <i>432Stop</i>	ctggcgaaagactgtatcat caatgtatagaaatccgctgtt	94°C 40'' 53°C 1' 72°C 1'; 30 Zyklen	630 bp	53
<i>E.coli</i>	<i>rDNA</i> <i>16s</i>	<i>F</i> <i>R</i>	agagtttgatcatggctcag ggactaccagggtatctaat	94°C 30'' 56°C 30'' 72°C 30''	798 bp	7

2.7. Optimierung der PCR- Bedingungen

Die Primerpaare wurden zunächst nach dem Protokoll der Literatur- Quelle (sofern detailliert angegeben) getestet. Gelang der Nachweis, wurden die unterschiedlichen Annealingtemperaturen zwecks Vereinheitlichung der Reaktionsbedingungen in 1°C-Schritten zunächst auf 58°C, später 60°C, angeglichen (siehe 3.3.). Puffer-, Polymerase-, dNTP-, Template- und Magnesium- Konzentration wurden ebenfalls schrittweise modifiziert, bis ein einheitliches Protokoll entstand. Entsprechend Protokollangaben und Empfehlungen in der Literatur wurden außerdem Versuche mit verschiedenen Additiva (Gelatine, Glycerol, Triton, DMSO) durchgeführt, die als günstige Einflußfaktoren hinsichtlich Ermöglichung eines Duplex- Ansatzes bzw. Verbesserung von Spezifität und Sensitivität in der Multiplex- PCR beschrieben waren. Nach Zusammenstellung der Primer in einer Multiplex- PCR wurden die Magnesium- und Taq- Polymerase- Konzentrationen erneut angepaßt.

2.8. Auswahl der Patienten

Nach Etablierung und Evaluierung der Multiplex- PCR wurden durchgängige Stuhlproben von Säuglingen, Kindern und Reiserückkehrern im Rahmen einer Querschnittstudie im Zeitraum vom 21.07.01- 31.10.01 blind untersucht. Die Proben wurden vom Vivantes Netzwerk für Gesundheit Region Süd Berlin (Hr. Dr. Küchler), vom St. Joseph Krankenhaus Berlin (Hr. Dr. Amir), vom Institut für Tropenmedizin Berlin (Hr. Dr. Burchard) und vom Klinikum Ernst von Bergmann Potsdam (Hr. Dr. Weinke), zur Verfügung gestellt.