

3. Ergebnisse

3.1. Einzeltestung der Primer

Die in Tab. 3 aufgeführten Primer wurden – sofern in der Literatur angegeben – zunächst unter Originalbedingungen, mit DNS- Proben von Referenzstämmen (siehe 2.4.) der jeweiligen Pathovare, getestet. Bei *LT I*, *ST I* und *ST H* (*ETEC*), *EAF* und *ECW* (*EPEC*) sowie *SLT II* (*EHEC*) war jedoch weder unter Originalbedingungen noch unter Absenken der Annealing- Temperatur bis auf 38°C in 1°C- Schritten ein Nachweis der Virulenzgene in den o.g. Referenzstämmen möglich. Sie wurden deshalb durch andere Primer für das selbe Virulenzgen ersetzt.

Im Gegensatz dazu konnte mit *ST a* und *LT H* (*ETEC*), *ECB* (*EPEC*), *SLT I* und *uidA* (*EHEC*), *Shig ipaH* (*EIEC*), *pCVD* (*EaggEC*) und *rDNA 16s* (alle *E. coli*) unter Bedingungen der Originalprotokolle der Nachweis der entsprechenden Genabschnitte geführt werden. Die Annealingtemperaturen lagen zwischen 49°C und 64°C. Zum Erreichen größtmöglicher Spezifität setzten wir die Zieltemperatur der Annealingphase im oberen Mittelfeld, bei 58°C bzw. 60°C, an.

Für *LT H*, *Shig ipaH*, *pCVD* und *rDNA 16s* wurde die Annealingtemperatur in 1°C- Schritten bis auf 60°C angehoben. Eine weiteres Anheben führte zum Verlust positiver Amplifikationen. Für *SLT I* und *uidA* wurde die Temperatur von 64°C bis auf 56°C abgesenkt. Dabei zeigte sich ab 58°C eine langsam zunehmende Unspezifität (siehe 3.3. und 4.1.), weshalb im weiteren Verlauf eine Annealingtemperatur von 60°C eingesetzt wurde.

Die Temperaturen der Denaturierungs- und Extensionsphase unterschieden sich hingegen bei den verwendeten Protokollen kaum (siehe 2.8.). Nach erfolgreicher Testung unter den Originalbedingungen gelang die Amplifikation auch unter den von uns festgelegten mittleren Temperaturen (Denaturierung 94°C, Extension 70°C, siehe 3.4.). Für *St a* und *ECB* waren keine Reaktionsbedingungen angegeben. Sie wurden daher unter den gleichen Reaktionsbedingungen wie die anderen Primer getestet und zeigten ebenfalls die gewünschte Sensitivität und Spezifität (siehe 3.2.6. und 3.3.).

Die Anzahl der Zyklen wurde nach Empfehlungen in der Literatur auf 35 festgesetzt (12, 13).

Die 8 Primerpaare, die schon in den Originalansätzen erfolgreich getestet wurden (*SLT I*, *uidA*, *LT H*, *STa*, *shig ipaH*, *ECB*, *pCVD*, *16s rDNA*), führten auch in Einzelansätzen unter vereinheitlichten Reaktionsbedingungen zur Amplifikation spezifischer Genabschnitte.

3.2. Optimierung der PCR

Der erste Reaktionsansatz orientierte sich am Protokoll von Cebula et al. (25) für 100- µl-Ansätze zum Nachweis von *EHEC* (Tab. 5):

Tab. 5: Reaktionsprotokoll für den Nachweis von *EHEC* nach Cebula et al.

MgCl₂	2,5 mM
dNTP's	0,2 mM
Taq- Polymerase	2,5 U
Primer	0,5 µmol/ µl
Reaktionsbedingungen	94°C (keine Zeitangabe) 64°C 90“ 72°C 90“; 35 Zyklen

Entsprechend laborinterner Erfahrungen und Ergebnissen der Studie wurde das Protokoll ergänzt bzw. optimiert.

3.2.1. Magnesium- Konzentration

Mit den positiv getesteten Primerpaaren *SLT I*, *LT H* und *ST a*, sowie dem bislang nicht nachweisbaren *EAF* wurde der Einfluß der MgCl₂- Konzentration auf die PCR überprüft. Ein Absenken der Konzentration von 2,5 mM auf 1,25 und 0,75 mM führte zum Funktionsverlust, wogegen die Erhöhung der Konzentration auf 5 mM keine Veränderung des Ergebnisses im Einzelansatz zeigte.

Im Multiplex- Ansatz waren bei 2,5 mM MgCl₂ 3 Banden schwer unterscheidbar, demgegenüber gelang im Ansatz mit 5 mM MgCl₂ der Nachweis von 4 verschiedenen Banden. Entsprechend wurden im Weiteren für den Einzelansatz 2,5 mM Mg²⁺ und im Multiplex- Ansatz 5 mM Mg²⁺ eingesetzt.

3.2.2. **NH₄ Puffer- Konzentration**

Nach laborinternen Erfahrungen mit der Duplex- PCR (z.B. bei Toxoplasma- PCR, persönliche Mitteilung von A. Maletz, AG Liesenfeld) wurden 5.0 µl des 10x NH₄- Puffers im 50 µl- Ansatz eingesetzt.

3.2.3. **Taq- Polymerase- Konzentration**

Cebula et al. (25) verwendeten 2,5 U Taq- Polymerase/ 100 µl- Ansatz im Duplex- Verfahren. Für den Einzelansatz reduzierten wir die Menge auf 1U / 50 µl. Im Duplex- Ansatz wurden allerdings die Banden bei Verdoppelung der Taq- Konzentration stärker und besser abgrenzbar. Ähnliche Erfahrungen sind in der Literatur beschrieben (5). Im Folgenden wurden daher 1 U Taq- Polymerase/ 50 µl im Einzelansatz (Monoplex- PCR) und 2 U / 50 µl in den Duplex- und Multiplex- PCR- Ansätzen verwendet.

3.2.4. **Additiva**

In der internationalen Literatur wird über den Einsatz diverser Additiva zur Vermeidung der Interaktionen von Primern, PCR- Drift oder PCR- Selektion berichtet. Tsen et al. (47) beschrieben den Einsatz von Triton X100 für eine Multiplex- PCR zum Nachweis von *LT I*, *LT II*, *SLT I* und *SLT II* in Trinkwasser. Phipps et al. (48) beschrieben den Einsatz von 5% Glycerol und 100µg Gelatine/ ml Ansatz zum Nachweis von *ST I* in einer Multiplex- PCR. Nach den ersten Duplex- Ansätzen ohne Additiva wurden demzufolge Triton X100 (Merck), Glycerol (Merck) und Gelatine (Merck) unter den aus der Literatur bekannten Konditionen mit bekannten Stämmen und Primern in einer Duplex- PCR getestet:

Tab. 6: Testung der Duplex- PCR bei Verwendung von Triton, Glycerol und Gelatine

Template	Primer	Triton X100	Glycerol	Gelatine	Gelatine+ Glycerol
<i>EHEC</i>	<i>SLT I</i>	1 neg.	5 neg.	9 Schmier	13 Schmier
<i>ETEC + EPEC</i>	<i>LTH + ECB</i>	2 neg.	6 neg.	10 Schmier	14 Schmier
<i>EaggEC + EHEC</i>	<i>pCVD + SLT I</i>	3 neg.	7 neg.	11 Schmier	15 Schmier
<i>EaggEC + ETEC</i>	<i>pCVD + LTH</i>	4 Schmier	8 neg.	12 schwach, spezifische Banden	16 Schmier

Bei Verwendung von Triton zeigte sich lediglich in Probe 4 für *EaggEC* eine breitgeschmierte Bande, sonst wurde keine DNS nachgewiesen. Zusätzlich fand sich Triton X100 als Ölflecken im Elektrophorese- Bad wieder, so daß vom Einsatz von Triton abgesehen wurde.

Glycerol wurde zunächst einzeln getestet, wobei sich keine DNA nachweisen ließ.

Gelatine wurde einzeln und zusammen mit Glycerol getestet. Hier kam es lediglich zu zwei schwachen Banden bei Probe 12 im Gelatine- Ansatz. Die übrigen Proben zeigten breitgeschmierte Banden falscher Produkte als Ergebnis unspezifischer Amplifikation und Dimerisation der Primer. Auch die gegenüber dem Originalprotokoll 2- und 4- fache Erhöhung der Gelatine- Konzentration (s.o.) und die Verdoppelung der $MgCl_2$ - Konzentration erbrachten keine positiven Ergebnisse.

Entsprechend Empfehlungen in einem Multiplex- PCR- Protokoll (5) und einem PCR- Produkthandbuch (13) wurde auch Dimethylsulfoxid (DMSO) getestet. Tabelle 7 zeigt den Ansatz zur Testung von DMSO (5% DMSO im Ansatz) (13).

Tab. 7: Testung der Duplex- PCR unter Verwendung von DMSO (5% im Ansatz)

Probe	Template	Primer	Bande	Ergebnis
1	<i>EHEC</i> O157H-(pos. Kontr.)	<i>SLT I + Aqua tridest</i>	348 bp (pos. Kontr.)	<i>SLT I</i> positiv
2	Aqua tridest (neg. Kontr.)	<i>SLT I + LTH</i>	- (neg. Kontr.)	negativ
3	<i>ETEC + EPEC</i>	<i>LTH + ECB</i>	-	negativ
4	<i>ETEC + EaggEC</i>	<i>LTH + pCVD</i>	630 bp	nur <i>pCVD</i> positiv
5	<i>ETEC + ETEC</i>	<i>LTH + ST a</i>	-	negativ
6	<i>ETEC + EHEC</i>	<i>LTH + SLT I</i>	348 bp	nur <i>SLT I</i> positiv
7	<i>ETEC + EHEC</i>	<i>LTH + uid A</i>	-	negativ
8	<i>ETEC + EIEC</i>	<i>LTH + shig ipaH</i>	603 bp	nur <i>shig ipaH</i> positiv

9	<i>EPEC + EaggEC</i>	<i>ECB + pCVD</i>	630 bp	nur <i>pCVD</i> positiv
10	<i>EPEC + ETEC</i>	<i>ECB + ST a</i>	-	negativ
11	<i>EPEC + EHEC</i>	<i>ECB + SLT 1</i>	348 bp	nur <i>SLT 1</i> positiv
12	<i>EPEC + EHEC</i>	<i>ECB + uidA</i>	-	negativ
13	<i>EPEC + EIEC</i>	<i>ECB + shig ipaH</i>	603 bp	nur <i>shig ipaH</i> positiv
14	<i>EaggEC + ETEC</i>	<i>pCVD + ST a</i>	630 bp	nur <i>pCVD</i> positiv
15	<i>EaggEC + EHEC</i>	<i>pCVD + SLT 1</i>	-	negativ
16	<i>EaggEC + EHEC</i>	<i>pCVD + uid A</i>	-	negativ
17	<i>EaggEC + EIEC</i>	<i>pCVD + shig ipaH</i>	603 bp	nur <i>shig ipaH</i> positiv
18	<i>ETEC + EHEC</i>	<i>ST a + SLT 1</i>	-	negativ
19	<i>ETEC + EHEC</i>	<i>ST a + uid A</i>	-	negativ
20	<i>ETEC + EIEC</i>	<i>ST a + shig ipaH</i>	603 bp + Schmier ab 350 bp	nur <i>shig ipaH</i> positiv
21	<i>EHEC + EHEC</i>	<i>SLT 1 + uid A</i>	348 bp + 252 bp	<i>SLT 1</i> und <i>uidA</i> positiv
22	<i>EHEC + EIEC</i>	<i>SLT 1 + shig ipaH</i>	603 bp	nur <i>shig ipaH</i> positiv

Eine erfolgreiche Duplex- PCR unter Verwendung von DMSO gelang lediglich für *EHEC* mit *SLT 1* und *uidA* (Probe 21). *Uid A* war in der Kombination mit allen anderen Primern nicht nachweisbar. Der Primer für *EIEC* (*shig ipaH*) unterdrückte jede andere Bande, so dass keine Amplifikationen zustande kamen. Auch der Primer für *EaggEC* (*pCVD*) unterdrückte andere Banden. Bemerkenswert an den Ansätzen mit DMSO waren die sehr sauberen Einzelbanden sowie das Ausbleiben von Dimeren und falschen Produkten. Der Einsatz von DMSO brachte jedoch keinen wesentlichen Fortschritt, so daß auf eine weitere Verwendung verzichtet wurde. Die Testung der Additiva zeigte insgesamt keinen förderlichen Einfluß auf die Duplex- PCR.

3.2.5. Thermocycler- Einstellungen

Mit dem Ziel, einen für alle Primer verwendbaren Reaktionsansatz zu etablieren, wurden die von Cebula et al. (siehe 2.6. und 3.2.) für den Nachweis von *EHEC* (*SLT 1* und *uidA*) angegebenen Temperatur- und Zeiteinstellungen mit den Protokollen aller übrigen Primer (siehe 2.8.) verglichen. Die Temperatur der Denaturierungsphase wurde, entsprechend den Angaben in fast allen verwendeten Protokollen, bei 94°C angesetzt. 45'' Denaturierungsdauer erwiesen sich als hinreichend. Das Optimum der Annealingtemperatur wurde, wie unter 3.1. und 3.3. beschrieben, bei 60°C gefunden, 45'' Dauer wurden hierbei festgesetzt. Für die Extensionsphase wurden, entsprechend den weitgehend identischen

Angaben der Protokolle (siehe 2.8.), 70°C über 45'' eingesetzt. Die Anzahl der Reaktionszyklen wurde nach Cebula et al. (25) mit 35 festgesetzt.

3.2.6. Prüfung der Sensitivität

Der Template- Einsatz orientierte sich am o.g. Protokoll mit 2.5 µl Template im 50 µl-PCR- Ansatz. Eine Verdopplung der Template- Menge hatte keinen nennenswerten Einfluß auf das Ergebnis. Für die DNS- Gewinnung aus Stuhlproben wurden zur Prüfung der Sensitivität mit Referenzstämmen ‚gespickte‘ Stuhlproben mit dem QIAmp DNA Stool Mini Kit (QIAGEN) aufbereitet. Dafür wurden von jedem Pathovar je 1, 10 und 100 (24 h alte) Kolonien in 1 g Stuhl eingerührt. Alle ‚gespickten‘ Proben zeigten einen gleichsensitiven Nachweis der spezifischen DNS.

Template- Verdünnungsreihen ergaben für *ETEC*, *EHEC* und *EaggEC* eine Sensitivität bis 1000 Keimen/ g Stuhl, für *EPEC* und *EIEC* bis zu 100 Keimen/ g Stuhl.

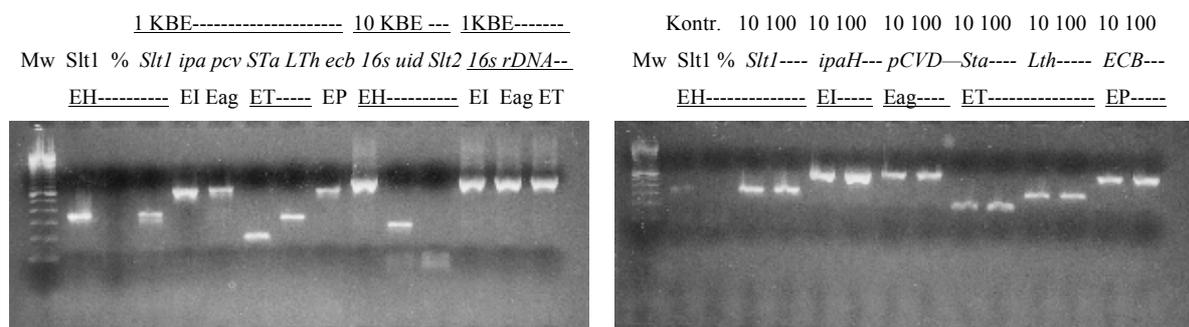


Abb. 2: Sensitivität der Monoplex- PCR in mit 1 bzw. 10 KBE *E. coli* gespickten Stühlen

MW= Molecular Weight Marker

SLT1 = Positivkontrolle, % = Negativkontrolle

EH= *EHEC*, EI= *EIEC*, Eag= *EaggEC*, ET= *ETEC*, EP= *EPEC*

Abb. 3: Sensitivität der Monoplex- PCR in mit 10 bzw. 100 KBE *E. coli* gespickten Stühlen

3.3. Prüfung der Spezifität

Die in dieser Studie verwendeten Primer für Virulenzfaktoren enteropathogener *E. coli* wurden bereits in vorhergehenden Studien auf Sensitivität und Spezifität hin untersucht. Zur Überprüfung dessen wurden die Primer zunächst mit allen *E. coli*- Pathovaren getestet. Wie in Tabelle 8 aufgeführt, zeigten sich ausschließlich spezifische Reaktionen der Primer mit den entsprechenden Pathovaren.

Tab. 8: Überprüfung der Spezifität der Primer zum Nachweis enteropathogener *E. coli* bei 58° Annealingtemperatur

Pathovar	<i>SLT I</i>	<i>Uid A</i>	<i>LTH</i>	<i>ST a</i>	<i>Shig ipaH</i>	<i>ECB</i>	<i>pCVD</i>
<i>ETEC</i>	-	-	312 bp	182 bp	-	-	-
<i>EPEC</i>	-	-	-	-	-	557 bp	-
<i>EHEC</i>	348 bp	252 bp	-	-	-	-	-
<i>EIEC</i>	-	-	-	-	603 bp	-	-
<i>EaggEC</i>	-	-	-	-	-	-	630 bp

- = kein Amplifikat

Weiterhin wurden auch laborinterne Isolate anderer enteropathogener Erreger auf Kreuzreaktivität hin untersucht. Amplifikationsprodukte identischer Länge wurden in dieser Studie bei der Testung von *EIEC* und *Shigella sonnei*, *-flexneri* und *-dysenteriae* mit *Shig ipaH* beobachtet.

SLT I zeigte in dieser Studie bei 58°C Annealingtemperatur reproduzierbar ein Produkt von ~310bp für *Salmonella Enteritidis*, *-Infantis*, *-Montevideo* und *-Typhimurium*, nicht jedoch für *Salmonella Paratyphi*.

Weiterhin zeigte SLT 1 bei 58°C Annealingtemperatur reproduzierbar für *Shigella sonnei*, *-flexneri* und *-dysenteriae* ein ~400 bp langes Amplifikationsprodukt.

Tabelle 9 zeigt Ergebnisse der Testung verschiedener enteropathogener Erreger mit den *E. coli*- Pathovar- spezifischen Primern bei einer Annealingtemperatur von 58°C.

Tab. 9: Testung der Primer gegenüber anderen Erregern gastrointestinaler Infektionen bei 58°C Annealingtemperatur

Keim	<i>SLT I</i>	<i>UidA</i>	<i>LTH</i>	<i>ST a</i>	<i>Shig ipaH</i>	<i>ECB</i>	<i>pCVD</i>
<i>Salmonella Enteritidis</i>	~310 bp	-	-	-	-	-	-
<i>Salmonella Infantis</i>	~310 bp	-	-	-	-	-	-
<i>Salmonella Montevideo</i>	~310 bp	-	-	-	-	-	-
<i>Salmonella Typhimurium</i>	~310 bp	-	-	-	-	-	-
<i>Salmonella Paratyphi</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>Shigella sonnei</i>	~400 bp	~310 bp	-	~180 bp	~600 bp	-	-
<i>Shigella flexneri</i>	~400 bp	~310 bp	-	~180 bp	~600 bp	-	-
<i>Shigella dysenterie</i>	~400 bp	-	-	-	~600 bp	-	-
<i>Campylobacter jejunii</i>	-	-	-	-	-	-	~800 bp
<i>Yersinia enterocolitica</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>Vibrio parahämolyticus</i>	~190 bp	-	-	-	-	-	-
<i>Vibrio cholerae, El Tor</i>	450,170bp	-	-	-	~350 bp	-	-
<i>Vibrio cholerae</i>	450,170bp	-	-	-	~350 bp	-	-
<i>Citrobacter freundii</i>	-	-	-	-	-	-	-

Nach Erhöhung der Annealingtemperatur auf 60°C unterblieben die bei 58°C beobachteten Mismatchpaarungen (siehe 3.1. und 4.1.) mit Ausnahme der Reaktion von *Shigella ssp.* mit *Shig ipaH*.

3.4. Kombination der Primer und Erstellung eines Multiplex- Panels

Um die Primer in einem Multiplex- Protokoll zusammenzuführen, wurden die positiv getesteten Primer in verschiedenen Kombinationen mit unterschiedlichen Templates getestet. Abbildung 4 zeigt Ansätze mit allen 8 eingesetzten Primern in jedem Ansatz bei Verwendung verschiedener Templates (Proben 1- 5 Einzeltestung der Pathovare, Probe 6 alle Pathovare in einem Ansatz) . Abbildung 5 zeigt eine Reihe von Duplex- PCR- Ansätzen, die in Tabelle 10 (Seite 26) aufgeführt sind.

Mw 1 2 3 4 5 6 %
alle

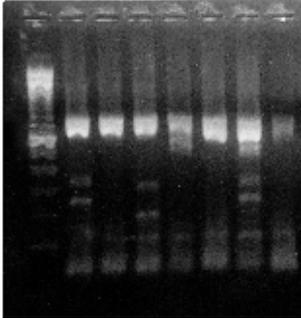


Abb. 4: Ansätze mit allen Primern und unterschiedlichen Templates

oberste Bande in Probe 1- 6 = rDNA

1= *EHEC*, 2= *EPEC*, 3= *ETEC*, 4=*EIEC*

5= *EaggEC*, 6= alle Pathovare

Mw + % *Slr1 Slr1 uid uid uid pcvd Slr1 uid Slr1 STa*
Sta Lth Sta Lth Slr1 ecb ecb ecb uid Lth

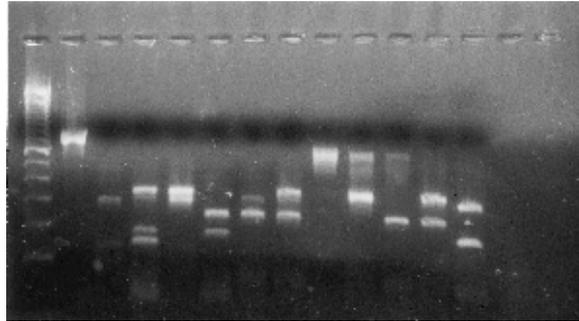


Abb. 5: Duplex- PCR- Ansätze (siehe Tab. 10)

+ = Positiv- Kontrolle, % = Negativ- Kontrolle

Mw= Molekulargewichtsmarker (100bp)

Als interne Positivkontrolle wurden Primer für ribosomale DNS (rDNA 16s) von *E. coli* eingeführt.

Bei den Ansätzen mit allen Primern (Abb. 4) kam es nur beim Einsatz von *EHEC* oder *ETEC* (Abb. 4, Proben 1 und 3) zu spezifischen, abgrenzbaren Banden. Beim Einsatz der *EPEC* (Probe 2) fehlte die pathovarspezifische Bande, im Ansatz mit *EIEC* oder *EaggEC* (Proben 4 und 5) waren die einzelnen Banden nicht abgrenzbar. In einem gemeinsamen Ansatz mit allen Primern und Templates (Probe 6) waren nur die *EHEC*- Banden abgrenzbar, die anderen Banden fehlten (*ETEC*, *EPEC*) oder waren nicht abgrenzbar (*EIEC*, *EaggEC*, *rDNA 16s*).

In den Duplex- Testungen (Abb. 5 und Tab. 10) zeigten sich positive Nachweise, d.h. spezifische Banden (*uidA / Sta*, *uidA / LTH*, *uidA / SLT1*, *Sta / LTH*), aber auch kaum abgrenzbare Banden (z.B. *SLT 1 / LT H*, *pCVD / rDNA16s*, *pCVD / ECB*) und falsche Produkte (z.B. *ST a / SLT 1*: zusätzliche Bande bei ~150bp neben den erwarteten Banden bei 182 und 348bp). In weiteren Testungen (ohne Abb.) wurde PCR- Selektion beobachtet, z.B. die bevorzugte Amplifikation von *shig ipaH* in Kombination mit den anderen Primern.

Tabelle 10 zeigt eine Aufstellung der Ergebnisse der Duplex- PCR- Testung.

Tab. 10: Ergebnisse der Kombination der Primer in der Duplex- PCR

Primer	<i>SLT I</i>	<i>uid A</i>	<i>ST a</i>	<i>LTH</i>	<i>pCVD</i>	<i>ECB</i>	<i>Shig ipaH</i>	<i>rDNA16s</i>
<i>SLT I</i>	*****	+	Falsche Banden	Schlecht abgrenzbar		+	+	Falsche Banden
<i>uid A</i>	+	*****	+	+	+	+	+	+
<i>ST a</i>	Falsche Banden	+	*****	+			Nur <i>shig ipaH</i>	+
<i>LTH</i>	Schlecht abgrenzbar	+	+	*****			Nur <i>shig ipaH</i>	Falsche Banden
<i>pCVD</i>		+			*****	Schmier	Nur <i>shig ipaH</i>	Schmier
<i>ECB</i>	+	+			Schmier	*****	Nur <i>shig ipaH</i>	ECB schwach
<i>shig ipaH</i>	+	+	Nur <i>shig ipaH</i>	Nur <i>shig ipaH</i>	Nur <i>shig ipaH</i>	Nur <i>shig ipaH</i>	*****	+
<i>rDNA16s</i>	Falsche Banden	+	+	Falsche Banden	Schmier	ECB schwach	+	*****

+ = positives Ergebnis, d.h. Nachweis von zwei spezifischen Banden

Aufbauend auf den bestehenden Kombinationsmöglichkeiten wurden nun weitere Primerpaare mit zugehörigen Templates zu den etablierten Duplex- Ansätzen hinzugefügt:

Tab. 11: Ergebnisse der Testung der Triplex/ Quadruplex/ Quintuplex- PCR

Probe	Template	Primer	Ergebnis
1	<i>EHEC + EPEC</i>	<i>SLT 1 + uid A + ECB</i>	nur <i>SLT 1</i> - und <i>uid A</i> - Bande
2	<i>EHEC + EIEC</i>	<i>SLT 1 + uid A + shig ipaH</i>	alle 3 Banden gut abgrenzbar
3	<i>EHEC</i>	<i>SLT 1 + uid A + rDNA 16s</i>	alle 3 Banden gut abgrenzbar
4	<i>ETEC</i>	<i>LTH + ST a + rDNA 16s</i>	alle 3 Banden gut abgrenzbar
5	<i>EHEC + ETEC</i>	<i>SLT 1 + ST a</i>	beide Banden gut abgrenzbar
6	<i>EHEC + ETEC</i>	<i>SLT 1 + uid A + LTH</i>	<i>SLT1/LTH</i> nicht abgrenzbar
7	<i>EHEC + ETEC</i>	<i>SLT 1 + uid A + ST a</i>	alle 3 Banden gut abgrenzbar
8	<i>EHEC + ETEC</i>	<i>SLT 1 + uid A + LTH + ST a</i>	<i>SLT1/LTH</i> nicht abgrenzbar
9	<i>EHEC + ETEC</i>	<i>SLT 1 + uid A + LTH + ST a + rDNA 16s</i>	<i>SLT1/ LTH</i> nicht abgrenzbar, andere Banden gut abgrenzbar

Duplex- Ansätze der Primer von *EHEC* (*SLT1*, *uidA*) und *EIEC* (*shig ipaH*) ergaben untereinander und in Kombination mit *rDNA 16s* abgrenzbare, spezifische Banden (Tab. 10). Tab. 11 zeigt die Ergebnisse der Kombination von 3,4 oder 5 Primerpaaren in der Triplex, Quadruplex und Quintuplex- PCR. Spezifische Banden entstanden beim Einsatz der *EHEC*-spezifischen Primer in Triplex- PCR- Ansätzen mit Primern für *EIEC* und *E. coli* (*rDNA16s*).

Der Quadruplex- PCR- Ansatz mit *SLT 1*, *uid A*, *shig ipaH* und *rDNA 16s* (Abb. 7) ergab ebenfalls spezifische und abgrenzbare Banden. Somit waren alle Primer für Pathovare, die blutige Diarrhoen auslösen können, in einem Ansatz zusammen mit der internen Positivkontrolle nachweisbar.

Die Duplex- und Triplex- PCR- Ansätze für *EHEC*, *ETEC* und *rDNA 16s* (Tab.11, Proben 3, 4 und 7) boten die Möglichkeit des Einsatzes in einem Panel für Pathovare, die wässrige Diarrhoen auslösen. Eine Kombination o.g. Primer mit dem Primer für *EIEC* erbrachte keine positiven Resultate (Tab. 10), weshalb er als Einzelansatz diesem Panel hinzugefügt wurde.

Für die Entwicklung eines Panels für Säuglinge bzw. Kinder wurde in Anlehnung an bisher bekannte Daten über relevante Pathovare ein Duplex- und Monoplex- Panel etabliert (Tab. 12).

In einer Quintuplex- PCR mit *SLT 1*, *uid A*, *ST a*, *LT H* und *rDNA 16s* (Tab.11, Probe 9) ließen sich *SLT 1* und *LT H* schlecht abgrenzen. Weitere Kombinationen der Primer waren aufgrund der Ergebnisse der Duplex- Testung (Tab. 10) nicht sinnvoll.

Die interne Positiv- Kontrolle (*rDNA 16s*) wurde in jedem Ansatz zum Ausschluß inhibitorischer Substanzen in Patientenproben mitgeführt.

Basierend auf den möglichen Primer- Kombinationen, der klinischen Symptomatik und den bisher bekannten epidemiologischen Daten wurden 3 unterschiedliche Suchpanel erarbeitet: Panel W für wässrige Durchfälle inklusive Reiserückkehrer, Panel B für Patienten mit blutigen Durchfällen und Panel C für Kinder. Tabelle 12 zeigt die Panel im Überblick:

Tab. 12: PCR- Suchpanel zum Nachweis enteropathogener *E. coli* aus Patientenmaterialien

Multiplex- Panel	Nachweisbare Pathovare	Primer
W (wässrige Diarrhoen)	I <i>EHEC</i> + <i>ETEC</i> + Positiv- Kontrolle	<i>UidA</i> + <i>LT H</i> + <i>ST a</i> + <i>rDNA16s</i>
	II <i>EHEC</i> + <i>EPEC</i>	<i>SLT I</i> + <i>ECB</i>
	III <i>EIEC</i>	<i>Shig ipaH</i>
B (blutige Diarrhoen)	<i>EHEC</i> + <i>EIEC</i> + Positiv- Kontrolle	<i>SLT I</i> + <i>uidA</i> + <i>Shig ipaH</i> + <i>rDNA16s</i>
C (Kinder)	I <i>EHEC</i> + <i>EPEC</i>	<i>SLT I</i> + <i>ECB</i>
	II <i>EHEC</i> + Positiv- Kontrolle	<i>uidA</i> + <i>rDNA16s</i>
	III <i>EaggEC</i>	<i>pCVD</i>

Abb. 6 zeigt den Einsatz des B-, W- und C- Panels bei Stuhlproben, die mit allen Pathovaren gespickt wurden. Tabelle 13 führt die Größen der Amplifikationsprodukte innerhalb der einzelnen Multiplex- PCR- Suchpanel auf.

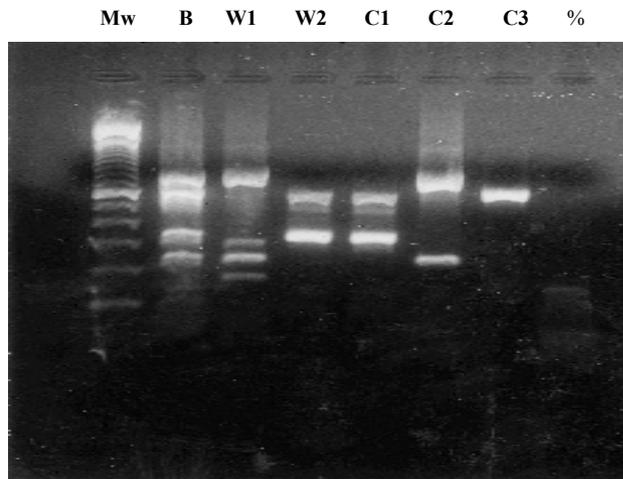


Abb. 6: B-, W- und C- Panel zum Nachweis enteropathogener *E. coli* aus Patientenproben

% = Negativkontrolle, Mw = 100bp- Molekulargewichtsmarker

Tab.13: Produktlängen in den Suchpaneln B, W und C

B	W1	W2	C1	C2	C3
798bp <i>rDNA16s</i>	798bp <i>rDNA16s</i>			798bp <i>rDNA16s</i>	
603bp <i>shig ipaH</i>		557bp <i>ECB</i>	557bp <i>ECB</i>		630bp <i>pCVD</i>
348bp <i>SLT1</i>	312bp <i>LT H</i>	348bp <i>SLT1</i>	348bp <i>SLT1</i>		
252bp <i>uidA</i>	252bp <i>uidA</i>			252bp <i>uidA</i>	
	182bp <i>ST a</i>				

Da eine Kombination aller Primer in einem PCR- Ansatz nicht möglich war, wurde nach erfolgreicher Testung und Zusammenstellung der Panel ein rationelles Vorgehen für das Screening von Patientenproben erwogen. Die Prävalenzen enteropathogener *E.coli* in Deutschland sind mit Ausnahme der *EHEC* nur unzureichend mit Daten belegt. Daher wurde in dieser Studie routinemäßig der Nachweis aller Pathovaren durchgeführt. Das dafür eingesetzte Suchpanel besteht aus 4 Ansätzen, die den Paneln W1, W2, W3 sowie C3 entsprechen (siehe unter 4.3.).

Für die Einzel- und Multiplex- PCR wurden zwei separate Ansätze entwickelt. Für die herkömmliche Monoplex- PCR wurde 1 Unit Taq/ 50µl Ansatz verwendet, im Duplex- und Multiplex- PCR- Ansatz wurden 2 Units Taq/ 50µl Ansatz eingesetzt. MgCl₂, NH₄- Puffer,

dNTP's, Aqua ad inj. und Taq- Polymerase wurden im Mastermix auf Eis vorgemischt. Nach Pipettierung der Primer und Templates in die Eppendorff- Röhren auf Eis wurde der Mastermix zugegeben. Die Proben wurden mit je einem Topfen Immersionsöl versiegelt, anzenrifugiert und unverzüglich in den Cycler verbracht.

Die Ansätze wurden wie folgt hergestellt:

Tab. 14: Endgültiges Monoplex- und Multiplex- Protokoll der PCR zum Nachweis enteropathogener *E. coli*

	Monoplex- Ansatz	Multiplex- Ansatz
MgCl₂ 25mM	10,0 µl	10,0µl
NH₄- Puffer	5,0 µl	5,0 µl
dNTP's	3,2 µl	3,2 µl
Taq- Polymerase	0,2 µl	0,4 µl
Primer	0,5 µl	je 0,5 µl
Template (DNA)	2,5 µl	je 2,5 µl
Aqua ad inj.	28,6 µl	ad 50µl
Mastermix pro Ansatz	47,0 µl	

Tabelle 15 führt die Einstellungen für einen Zyklusablauf am Perkin Elmer Cetus auf :

Tab.15: Cyclereinstellungen für den Nachweis enteropathogener *E. coli* mittels PCR

	Zieltemperatur	Dauer
Vorlauf	94°C	1“
Denaturierung	94°C	45“
Vorlauf	60°C	1“
Annealing	60°C	45“
Vorlauf	70°C	1“
Extension	70°C	45“

1 Zyklus wurde 35 mal durchlaufen, danach kühlte das Gerät die Reaktionsgefäße zur Beendigung der Reaktion sofort auf 4°C. Bis zur Auswertung wurden die Gefäße maximal 24h bei 4°C gekühlt gelagert. Die Auswertung erfolgte mittels Gel- Elektrophorese. Als Träger wurde Argarose- Gel verwendet (Ansatz: 2,0g Argarose- HGT + 50ml TBE- Puffer 0,5- fach + 50ml TBE- Puffer mit 5µl Ethidiumbromid). Je 20 µl des 50µl- PCR- Ansatzes wurden mit 5µl Färbelösung gemischt und in die Gelkammer gegeben. Bei 120mV betrug die Laufzeit im LKB Bromma Makrodrive (Firma Biorad) zwischen 30 und 60 min. Die Sichtung erfolgte unter UV- Licht am CAMAG Reprostar II mittels Polaroidkamera auf Kodak- Spezialpapier.

3.5. Ergebnisse des Screenings von Patientenproben

Insgesamt wurden 225 durchfällige Stuhlproben bearbeitet, davon 52 Rektalabstriche (in Selenitboullion) aus dem Vivantes- Klinikum Neukölln, 31 Stühle aus dem Klinikum E. v. Bergmann Potsdam, 70 Stühle aus dem Tropeninstitut Berlin und 72 Stühle aus dem St.-Joseph- Krankenhaus Berlin- Tempelhof. Die Stuhlproben wurden ohne Kenntnis der Einsender- Diagnosen, wie unter 2.5.ff. beschrieben, aufgearbeitet und im Routineansatz mittels der Multiplex- Panel W1, W2, C3 und W3 (siehe 2.10.) auf Virulenzfaktoren aller 5 o.g. Pathovare enteropathogener *E. coli* hin untersucht. Die Abbildungen 7 und 8 zeigen exemplarisch das Screening von Patientenproben mit dem o.g. Routineansatz:

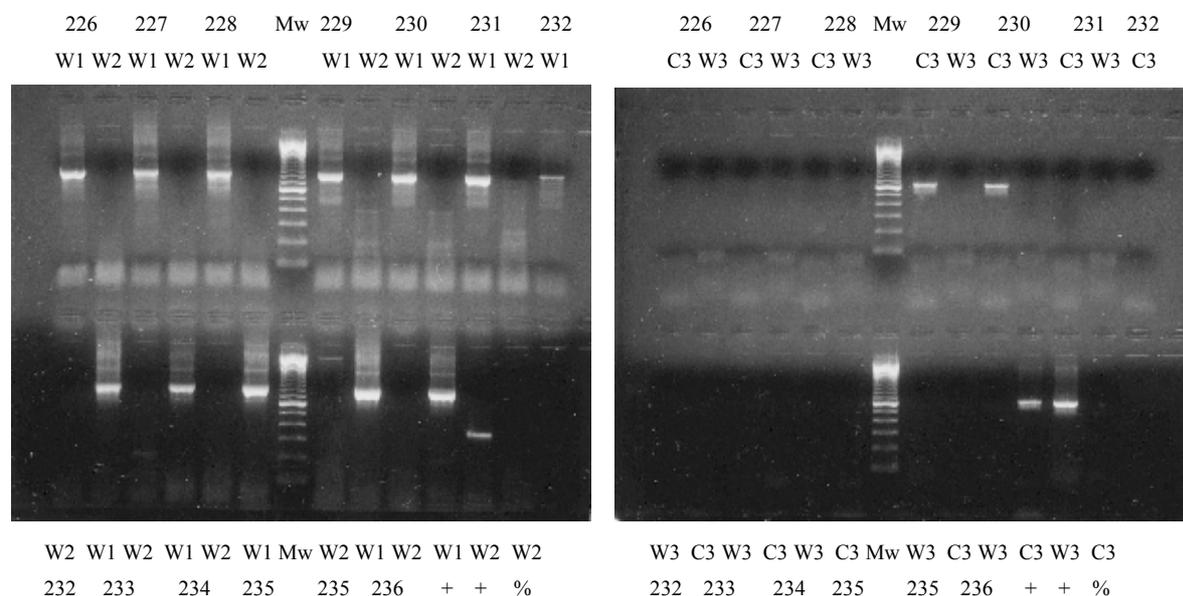


Abb. 7: Screening von Patientenproben (Probe 226- 236) Panel W1 und W2 **Abb. 8 Screening von Patientenproben (Probe 226- 236) Panel C3 (=pCVD) und W3 (=shig ipaH)**

Mw= 100-bp Molekulargewichtsmarker

+= Positivkontrolle (für W1 und W2 = EHEC, für C3= EaggEC, für W3= EIEC), %= Negativkontrolle

Bei jeder Probe wurde in W1 eine interne Positivkontrolle (*rDNA16s*) mitgeführt, um eine mögliche Inhibition der PCR erkennen zu können. Insgesamt kam es bei PCR aus Stuhlproben 10 mal zu Inhibition. In diesen Fällen wurde der PCR- Ansatz und die Aufarbeitung wiederholt, wobei das Ergebnis jedoch in allen Fällen unverändert blieb. Ebenso kam es bei der Aufarbeitung der 52 Rektalabstriche 3 mal zu negativem Ausfall der Positivkontrolle, wobei bei parallel auf Endoagar durchgeführten Ausstrichen kein Wachstum von *E. coli* oder anderen Bakterien nachzuweisen war. Insgesamt wurden 13 Patientenproben

wegen Inhibition nicht in die Auswertung mit einbezogen. Somit verblieben 212 Proben, die in die Berechnung eingeschlossen wurden.

Tabelle 16 stellt die Ergebnisse der Probenuntersuchung zusammen:

Tab. 16: PCR- Ergebnisse von 212 Stuhlproben und Rektalabstrichen

Ergebnis der PCR	Anzahl	Anteil an positiv getesteten Pathovaren n = 46	Anteil an Proben insgesamt n = 212
<i>ETEC</i>	7	15.2 %	3.3 %
<i>EPEC</i>	1	2.2%	0.5 %
<i>EHEC</i>	3	6.5 %	1.4 %
<i>EIEC/Shig. Ssp.</i>	13	28.3%	6.2%
<i>EaggEC</i>	22	47.8%	10.6%

41 von 212 untersuchten durchfälligen Stuhlproben zeigten pathovartypische Banden. 175 Proben zeigten keine oder unspezifische Banden. 4 Patientenproben zeigten Virulenzfaktoren mehrerer Pathovare (Tab. 17):

Tab. 17: Nachweis von Virulenzfaktoren mehrerer Pathovare in einer Patientenprobe

1 x <i>ETEC</i> + <i>EaggEC</i> + <i>EIEC/Shig.ssp.</i>
2 x <i>ETEC</i> + <i>EIEC/Shig.ssp.</i>
1 x <i>EaggEC</i> + <i>EIEC/Shig.ssp.</i>

Bei den positiv getesteten Stuhlproben wurden parallel die Isolierung der Erreger und der Nachweis von Virulenzfaktoren mittels PCR aus dem Kulturoisolat angestrebt. Die isolierten Kulturen wurden einer biochemischen Leistungsprüfung mittels API 20E (biomerieux) bzw. hauseigener Bunter Reihe unterzogen. Stark ausgetrocknete Proben wurden nicht weiter untersucht. Tabelle 18 stellt die Ergebnisse von kultureller Aufarbeitung und PCR-Bestätigung zusammen:

Tab. 18: Überprüfung der PCR mittels Anzucht und biochemischer Leistungsprüfung

Pathovar	Multiplex- PCR aus dem Stuhl	PCR aus dem 1. Ausstrich auf Endo	PCR aus dem Kulturisolat auf Endo	API / Bunte Reihe
<i>ETEC</i>	4 x <i>LTH</i> + <i>STa</i> pos. 1 x <i>STa</i> pos. 2 x <i>LTH</i> pos.	1 x <i>STa</i> pos. 3 x neg. 1 x <i>STa</i> pos. 2 x neg.	1 x <i>ETEC</i> <i>STa</i> pos. 1 x neg.	<i>E. coli</i>
<i>EPEC</i>	1 x <i>ECB</i> pos.	1 x negativ		
<i>EHEC</i>	3 x <i>SLT1</i> + <i>uidA</i> pos. 1 x <i>SLT 1</i> pos.	1 x <i>SLT1</i> + <i>uidA</i> pos.. 2 x kein Material 1 x neg.		
<i>EIEC/ Shig. ssp.</i>	13 x <i>Shig ipaH</i> pos.	2 x <i>Shig ipaH</i> pos. 3 x kein Material 8 x neg.	2 x neg.	
<i>EaggEC</i>	22 x <i>pCVD</i> pos.	16 x <i>pCVD</i> pos. 3 x kein Material 3 x neg.	12 x <i>EaggEC</i> pos., 4 x neg.	<i>E. coli</i>

pos.= Nachweis spezifischer Banden, neg.= kein Nachweis spezifischer Banden

Von den o.g. 41 mittels Stuhl- PCR positiv getesteten Proben wurden 36 auf Endoagar ausgestrichen, davon gelang bei 20 Proben = 55,6% die Bestätigung aus der Kultur mittels PCR im Einzelansatz, bzw. bei 21 aus der Kultur nachgewiesenen Pathovaren von 37 im Stuhl nachgewiesenen Pathovaren = 56,8%. Bei einer auf Endo ausgestrichenen Probe wurde eine in der Stuhl- PCR festgestellte Simultaninfektion, d.h. die gleichzeitige Infektion mit 2 verschiedenen Pathovaren, bestätigt. Bei 13 von 21 mittels PCR nachgewiesenen Pathovaren = 65% konnten Reinkulturen gewonnen und mit API bzw. hauseigener Bunter Reihe und PCR als Pathovare von *E. coli* identifiziert wurden (1 x *ETEC*, 12 x *EaggEC*) (siehe Tab. 18).

Bei *EaggEC* wurde von 22 im Stuhl nachgewiesenen Infektionen 16 mal der Nachweis von Virulenzfaktoren in der Kultur geführt = 72,7% und in 12 Fällen Pathovare isoliert, wohingegen *EIEC* nur in 2 von 13 Fällen = 15,4% im 1. Ausstrich auf Endo mittels PCR nachweisbar waren, danach aber in keiner weiteren Subkultur. Bei *ETEC* ließ sich nur in 2 von 7 Fällen= 28,6% der Nachweis von Virulenzfaktoren nach der ersten Kultivierung führen. Von den 4 *ETEC*- Proben, die in der Stuhl- PCR *LTH*- und *STa*- positiv waren, ließ sich nur noch in einem Fall der Nachweis aus der Kultur erbringen, und dies nur mit einem Virulenzfaktor (*STa*). Bei 2 untersuchten *EHEC*- Proben gelang in einem Fall der Nachweis beider untersuchter Virulenzfaktoren aus dem Kulturisolat.

Bei Verdacht auf *EIEC* wurden Kulturen zusätzlich mit Shigella- Antiserum agglutiniert, allerdings gelang es in keinem Fall, Reinkulturen zu erzielen, und die Agglutination der

Mischkulturen blieb negativ. Bei *EHEC* wurde in einem Fall mit positivem PCR- Resultat ein Toxinnachweis mittels ELISA aus dem Stuhl durchgeführt, allerdings ohne Erfolg. Bei *EHEC*- Nachweis aus Rektalabstrichen wurde der ELISA nicht durchgeführt.

Der häufig beobachtete Verlust von Virulenzfaktoren, insbesondere bei *EIEC*, *ETEC* und *EHEC* durch die Passage hatte aufwendige Re- Passagen zur Folge und führte trotzdem oft nicht zur Isolierung eines Pathovars (Tab. 18 Spalte ‚PCR aus dem Kulturisolat‘). Bei *EIEC* und *ETEC* wurde meist schon nach dem 1. Ausstrich auf Endo (= Mischkultur) kein bzw. nur noch ein Virulenzfaktor nachgewiesen (siehe Tab. 18 Spalte ‚PCR aus dem 1. Ausstrich auf Endo‘).

Die Häufigkeit der *E. coli*- Pathovare wurde für die Gesamtheit des Patientenmaterials, für Kinder, Fernreiserückkehrer und Sonstige berechnet. Weil Doppelmeldungen (Kinder mit Fernreiseanamnese) auftraten, wurden Kinder bis 10 Jahre aus der Gruppe der Fernreisenden ausgeschlossen. Letzlich ergab sich ein Probenanteil für Kinder bis zu 10 Jahren von 48.6% (n = 102), für Fernreisende von 28.6% (n = 61) und für Patienten ohne o.g. Anamnese von 23.1% (n = 49). Davon ausgehend, ergaben sich folgende Häufigkeiten:

Tab. 19: Häufigkeit des Nachweises enteropathogener *E. coli* in dieser Studie

Pathovar	Positive Proben und Anteil in % (n = 212)	Anteil an pos. Proben in % (n = 46)	Positive Proben: Kinder und Anteil in % (n = 102)	Anteil an pos. Proben in % (n = 22)	Positive Proben: Fernreise und Anteil in % (n = 61)	Anteil an pos. Proben in % (n = 16)	Positive Proben: Sonstige Patienten und Anteil in % (n = 49)	Anteil an pos. Proben in % (n = 3)
<i>ETEC</i>	7 (3,3%)	15.2	4 (3,9%)	18.2	2 (3,3%)	12.5	1 (2,0%)	33.3
<i>EPEC</i>	1 (0,5%)	2.2	1 (1,0%)	4.5	0	0	0	0
<i>EHEC</i>	3 (1,4%)	6.5	1 (1,0%)	4.5	2 (3,3%)	12.5	0	0
<i>EIEC</i>	13 (6,2%)	28.3	6 (5,9%)	27.3	6 (9,9%)	37.5	1 (2,0%)	33.3
<i>EaggEC</i>	22 (10,6%)	47.6	13 (12,8%)	59.7	7 (11,5%)	43.8	2 (4,1%)	66.7
Alle <i>E.coli</i> Pathovare	41* (19,3%)		22** (21,6%)		16*** (26,2%)		3**** (6,1%)	

* = 41 positiv getestete Proben insges., dabei drei Doppel- und eine Dreifachinfektion

** = 22 positiv getestete Proben (Kinder), dabei eine Doppel- und eine Dreifachinfektion

*** = 16 positiv getestete Proben (Fernreisende), dabei 1 Doppelinfektion

****= 3 positiv getestete Proben (weder Kinder noch Fernreisende), eine Doppelinfektion

Insgesamt konnten in 41 von 212 untersuchten Proben (=19,3%) Pathovaren enteropathogener *E. coli* nachgewiesen werden. Darunter waren drei Doppel- und eine Dreifachinfektion mit verschiedenen Pathovaren. Am häufigsten wurden mit 22 positiv getesteten Proben (10,6%) *EaggEC* nachgewiesen, gefolgt von *EIEC* mit 13 positiv getesteten Proben (6,2%) und *ETEC* mit 7 positiv getesteten Proben (3,3%). *EHEC* (3 Fälle, 1,4%) und *EPEC* (1 Fall, 0,5%) wurden nur selten nachgewiesen.

Innerhalb der drei Gruppen von Patienten (Fernreisende, Kinder bis 10 Jahren, Sonstige) traten signifikante Unterschiede in der Verteilung der Pathovaren auf. Bei Kindern wurden *EaggEC* mit 12,8% aller Proben doppelt so häufig nachgewiesen wie *EIEC* (5,9%). *ETEC* machten hier 3,9% der Fälle aus. Insgesamt wurden bei 21,6% der Proben von Kindern Pathovaren von *E. coli* nachgewiesen. 14 Proben von Säuglingen wurden seitens der Einsender ausschließlich einer Virusdiagnostik unterzogen, bei denen mittels Multiplex-PCR ein *EIEC* (7,1%) und 3 *EaggEC* (21,4%) nachgewiesen wurden. Betrachtet man die Proben, bei denen keine enteropathogenen Viren nachgewiesen wurden, d.h. 9 von 14 der o.g. Proben, konnten 33,3% *EaggEC* nachgewiesen werden, sowie 11,1% *EIEC*. Damit lag die Häufigkeit von *EaggEC*-Infektionen hier 2,5 mal höher als in der Gruppe der Kinder und 3 mal höher als bei allen Patienten. Virus- und *E. coli*-Pathovar-Nachweise waren in keinem Fall bei derselben Probe positiv. Wegen des besonderen Interesses an *EPEC* (Dyspepsie-Coli) bei Säuglingen wurden Kinder unter 1 Jahr als eine Subgruppe der Kinder genauer ausgewertet: bei insgesamt 47 Kindern unter einem Jahr wurde nur in einem Fall ein *EPEC* (2,1%) gefunden, allerdings 5 *EaggEC* (10,5%), 2 *ETEC* (4,3%), 1 *EIEC* (2,1%) und kein *EHEC*. Die Ergebnisse bei Kindern unter einem Jahr waren also, bei einem geringeren Anteil an *EIEC*, ähnlich denen der Gesamtgruppe. Hingegen lagen bei Fernreisenden *EaggEC* mit 11,5% fast gleichauf mit *EIEC* (9,9%). *ETEC* waren mit 3,3% aller Proben vertreten. Mit 26,2% positiv getesteten Proben lag der Anteil von *E. coli*-Pathovaren bei Fernreisenden insgesamt am höchsten. Patienten, die weder Kindern noch Fernreisenden zugeordnet wurden, zeigten mit 6,1% aller Proben einen deutlich geringeren Anteil an positiv getesteten Proben, wobei diese in 60% der Fälle Doppelinfectionen waren. Am häufigsten waren wiederum *EaggEC* mit 4,1% vertreten, danach folgten *EIEC* mit 2% und *ETEC* mit 2%.