

Isolierung und Charakterisierung von Shigatoxinproduzierenden *E. coli*-Stämmen aus Stuhlproben: Ergebnisse einer Sentinel-Studie

Von R. Prager, R. Reissbrodt, H. Holler, B. Gericke, S. Aleksic, H. Claus, H. Wagner und H. Tschäpe

Zusammenfassung

Zur Erfassung der Häufigkeit und des Typenspektrums von Shigatoxin-produzierenden *E. coli*-Stämmen (EHEC-Bakterien) sowie zur Evaluierung der Praktikabilität, Spezifität und Sensitivität eines Verfahrens zur Diagnostik von EHEC wurde eine Sentinel-Studie im Einzugsbereich (1,1 Mio. Einwohner) eines privat niedergelassenen Untersuchungslabors durchgeführt. Von 3835 untersuchten Durchfallstühlen konnten in ca. 3 % EHEC-Bakterien nachgewiesen werden, die zu einem ungewöhnlich breiten Spektrum von Serovaren und Klonen mit sehr verschiedenen Virulenzfaktoren gehörten. So ließen sich nur ca. 10 % der isolierten EHEC-Stämme als O157 identifizieren, aber ebenso häufig auch O103, O26, O8 oder Ont-Stämme. Ein kombiniertes Verfahren von bestimmten kulturellen und molekularen Methoden erwies sich als praktikabel für die Routinediagnostik unter den zeitlichen und ökonomischen Anforderungen und Bedingungen von privat niedergelassenen Laboratorien.

Summary

Isolation and characterization of shigatoxin producing *E. coli* strains isolated from stool samples: results of a Sentinel-study

In order to record the incidence and clonal types of shigatoxin-producing *E. coli* of human origin (EHEC) and to evaluate the feasibility, sensitivity and specificity of a protocol for screening and isolation of EHEC under conditions clinical stool diagnostics a pilot study (Sentinel-study) was carried out with private clinical laboratory (covering 1.1 Mio. inhabitants). 3 % EHEC bacteria were detected among 3835 stool samples investigated from patients suffering with watery and bloody diarrhoea. These isolates belong to a broad range of serovars and clones with a spectrum of various virulence factors. Thus, about 10 % of the isolates have been identified as *E. coli* O157:H7⁻, only, but with the same frequency *E. coli* O103:H2, O26:H11⁻, O8:H or Ont. The protocol of combined bacterial enrichment and molecular methods turned out to be valuable and feasible under conditions and economic requests of private diagnostic laboratories covering ca. 85 % of primary diagnostics.

1 Einleitung

Shigatoxin(Verotoxin)-produzierende *E. coli*-Stämme (STEC), auch als enterohämorrhagische *E. coli* (EHEC) bezeichnet [1], können ein breites Spektrum von Durchfällen erzeugen. Das Vorhandensein einer Reihe zusätzlicher Virulenzfaktoren sowie die Disposition der Patienten sind für die Prognose des Erkrankungsverlaufs wichtig, der von asymptomatischen Bildern über wäßrige bis blutige Durchfälle bis zu dem lebensbedrohlichen postinfektiösen Hämolytisch-urämischen Syndrom reicht [2–4]. Diese Virulenzfaktoren wie das EaeA-Protein (Intimin), das EHEC-Hämolysin, die Katalase/Peroxidase oder das hitzestabile Enterotoxin EAST-1 sowie die Shigatoxine 1 und 2 werden von mobilen genetischen Elementen kodiert, wie die Pathogenitätsinsel LEE, das 60 Md große sog. IncF-Virulenzplasmid oder die lambdoiden Bakterienphagen [5–9]. Da diese mobilen genetischen Elemente in unterschiedlichen Bakterienwirten auftreten und sich evolutionär frei kombinieren können, liegt naturgemäß eine breite

Palette von EHEC-Varianten vor [10–17]. Deshalb ist nicht zu erwarten, daß man die Isolierung und Charakterisierung von Shigatoxin-produzierenden *E. coli*-Stämmen mit kulturellen Methoden allein leisten könnte. Lediglich beim »klassischen« *E. coli* O157:H7/H korrelieren die biochemischen Eigenschaften (fehlende Säurebildung aus Sorbitol und fehlende β -D-glucuronidase-Produktion) zu ca. 80 % mit diesem EHEC-Serovar [18]. Diese Eigenschaften werden zur Isolierung von *E. coli* O157 mit Hilfe des Sorbitol-MacConkey-Agars (SMAC) oder mit chromogenen Nährmedien wie z. B. dem BCM™ *E. coli* O157:H7 (+) culture medium (Biosynth AG, Staad, Schweiz) ausgenutzt. Aber auch mit dem sog. Enterohämolysin-Agar können EHEC-Varianten verschiedener Serovare (O157, O26, O111 etc.) durch ihre charakteristische Fähigkeit zur opaken Hämolyse identifiziert werden [8]. Allerdings besteht bei diesen *E. coli*-Serovaren zwischen Shigatoxinbildung und EHEC-Hämolysinproduktion nur eine Korrelation von 60 bis 80 %, bei vielen anderen Serovaren fehlt sie dagegen völlig [8, 9, 15–17].

Die Shigatoxine wirken schon in pg-Mengen zytotoxisch, so daß bereits geringe Keimzahlen Durchfälle auslösen können. Deshalb ist zur Isolierung der verdächtigen EHEC-Bakterien eine Anreicherung in oder auf geeigneten Nährmedien unbedingt erforderlich. Aber nicht nur für die Isolierung Shigatoxin-produzierender *E. coli*-Stämme, sondern auch für das Screening auf Shigatoxinogenität mit Hilfe der PCR oder ELISA hat sich eine Voranreicherung bzw. Anreicherung der betreffenden Bakterien als notwendig erwiesen. Der Direktnachweis aus dem Stuhl sowohl mit Hilfe der PCR aufgrund eines extrem hohen Anteils falsch negativer als auch mit Hilfe der ELISA durch einen hohen Anteil falsch positiver, aber auch durch einige falsch negative Ergebnisse ist ungeeignet bzw. nicht praktikabel.

Aus diesen diagnostischen Schwierigkeiten ist gegenwärtig ein sog. Stufenprogramm zur Erfassung von Shigatoxin bildenden *E. coli*-Bakterien vorgeschlagen worden [19], in dem in der ersten Stufe nach Anreicherung der Stuhlprobe das Shigatoxinbildungsvermögen

mit Hilfe der PCR oder der ELISA geprüft wird und erst in einer zweiten und dritten Stufe die relevanten Erreger isoliert und charakterisiert werden.

Um die Praktikabilität, Spezifität und Sensitivität des Stufenprogramms zur Erfassung von Shigatoxin-produzierenden *E. coli*-Stämmen zu evaluieren und die Häufigkeit sowie das Typenspektrum von EHEC-Stämmen zu erfassen, wurde eine Sentinel-Studie im Einzugsbereich eines privat niedergelassenen Untersuchungslabors durchgeführt. In den hier vorgestellten Ergebnissen der Sentinel-Studie an 3835 Durchfallstühlen konnten die kombinierten Verfahren der kulturellen und molekularen Methoden evaluiert und als praktikabel für Routinelaboratorien nachgewiesen werden. Als Ergebnis dieser Studie erwiesen sich ca. 3 % der Durchfälle durch

EHEC-Bakterien bedingt, die ein breites Spektrum von Serovaren und Virulenzfaktoren zeigten.

2 Material und Methoden

2.1 Probenauswahl

Insgesamt wurden 3835 Durchfallstühle (wässrige, blutig-wässrige Stühle) von Durchfallpatienten und solche mit der klinischen Angabe hämolytisch-urämisches Syndrom oder Hämorrhagische Colitis untersucht, die aus dem Einzugsbereich eines niedergelassenen Laborarztes (Sentinel-Labor) mit ca. einer Million Einwohnern zur Untersuchung gelangten.

2.2 Anreicherung

Ca. 1 g Stuhlprobe wurde im Verhältnis 1:10 im EHEC-Anreicherungsmedium

mit den Antibiotika Novobiocin und Cefsulodin (heipha) suspendiert (Vortex) und sechs Std. bei 37 °C geschüttelt (ca.150 rpm). Daraus wurden eine Enterohämolyisin-Agarplatte mit den Antibiotika Novobiocin und Cefsulodin und eine viertel Platte BCM™ *E. coli* O157:H7(+) culture medium fraktioniert beimpft und 18-20 Std. bei 36 +/- 1 °C bebrütet. Die Impföse wurde zusätzlich in den Enterohämolyisin-Agar eingestochen, um die α -Hämolyisinbildung besser erkennen zu können.

2.3 Isolierung der gewachsenen Kolonien

2.3.1 Enterohämolyisin-Agar mit Antibiotika

Die auf Enterohämolyisin-Agar mit Antibiotika (Novobiocin 0,01 g/l; Cefsulodin 0,006 g/l) gewachsenen hämolyti-

Tabelle 1: PCR-Primer und PCR-Bedingungen zum Nachweis von Virulenzeigenschaften der EHEC- Bakterien

Primer	Primer-Sequenz	Ziel-Sequenz	PCR-Bedingungen denaturing/annealing/extension/Zyklen	Länge des PCR- Produktes	Referent
KS7	5'-CCC GGA TCC ATG AAA AAA ACA TTA TTA ATA GC-3'	stx-1B	94 °C, 30s/52 °C, 60 s/72 °C, 40s/30	285 bp	[11]
KS8	5'-CCC GAA TTC AGC TAT TCT GAG TCA ACG-3'				
GK3	5'-ATG AAG AAG ATG TTT ATG-3'	stx-2B	94 °C, 30s/52 °C, 60 s/72 °C, 40s/30	260 bp	H. Karch (pers. Mitt.)
GK4	5'-TCA GTC ATT ATT AAA CTG-3'	srx-2cB stx-2vhaB srx-2vhbB			
SK1	5'-CCC GAA TTC GGC ACA AGC-3'	caeA	94 °C, 30s/52 °C, 60 s/72 °C, 60s/30	863 bp	[32]
SK2	5'-CCC GGATCC GTCTCG CCAGTA TTC GC-3'				
HlyA1	5'-GGT GCA GCA GCA GAA AAA GTT GTAG-3'	ehxA	94 °C, 30s/57 °C, 60 s/72 °C, 90s/30	1550 bp	[8]
HlyA4	5'-TCT CGC CTG ATA GTG TTT GGT A-3'				
wkat-B	5'-CTT CCT GTT CTG ATT CTT CTG G-3'	katP	94 °C, 30s/56 °C, 60 s/72 °C, 150s/30	2125 bp	[33]
wkat-F	5'-AAC TTA TTT CTC GCA TCA TCC -3'				
astA-1	5'-GCC ATC AAC ACA GTA TAT CCG-3'	astA	94 °C, 30s/57 °C, 60 s/72 °C, 40s/30	107 bp	[17]
astA-2	5'-GCG AGT GAC GCC TTT GTA GT-3'				

Verwendete Abkürzungen:

- stx1: Gen für das Shigatoxin 1 (zur Nomenklatur vgl. [1])
- stx2: Gen für das Shigatoxin 2
- stx2v: Gen für das Shigatoxin 2v, Variante von Stx2 [11]
- stx1B: Genbereich für die Untereinheit B des Shigatoxins 1
- stx2B: Genbereich für die Untereinheit B des Shigatoxins 2
- stx2v: Genbereich für die Untereinheit B des Shigatoxins 2v, Variante von Stx2 [14]
- caeA: Gen für das EAE-Protein, Teil des TypIII-Sekretionssystems
- ehxA: Gen für das EHEC-Hämolyisin
- katP: Gen für die Katalase/Peroxidase in EHEC-Stämmen
- astA: Gen für das hitzestabile Enterotoxin EAST-1
- bp: Basenpaare

schen Kolonien zeigen eine typische opake Hämolyseform, manchmal erst nach dem Entfernen der Kolonien. α -Hämolytinbildner erkennt man dagegen an der klaren Hämolyse um die Kolonie und durch eine klare Hämolyse im Einstich.

Die Qualität des eingesetzten Enterohämolytin-Agars wurde vor dem Einsatz mit künstlich und natürlich kontaminierten Stuhlproben überprüft.

2.3.2 BCMTM-*E. coli* O157:H7(+) culture medium

Das BCMTM-*E. coli* O157:H7(+) culture medium (Biosynth AG, Staad, Schweiz) wurde nach Angaben von Biosynth AG (allerdings nur mit 0,2 mg/l Kaliumtelurit) hergestellt.

E. coli O157:H7/H⁻-Stämme erscheinen als blauschwarze Kolonien mit blauschwarzer Präzipitationszone auf pinkfarbenem Nährboden. Non-O157 *E. coli* wachsen als grüne Kolonien, oft mit bräunlichem Zentrum auf gelbem Nährboden. Die in den Stuhlproben gefundenen blauschwarzen *E. coli*-Kolonien wurden mit Anti-*E. coli*-O157-Seren oder mittels *E. coli*-O157-Latex-Tests (Murex, Oxoid) auf ihre Zugehörigkeit zum Serovar O157 überprüft.

2.3.3 Immunoblot

Zur Isolierung shigatoxinogener *E. coli*-Stämme aus der Anreicherung wurde die Abschwemmung mit Hilfe des von Timm et al. 1996 [20] beschriebenen Immunoblots angewandt. Dazu wurden Abschwemmungen (Enterohämolytinplatte) oder Anreicherungen auf die Zellulose-Azetat-Membran fraktioniert aufgebracht und über Nacht bebrütet. Das weitere Vorgehen für die Isolierung der Einzelkolonien erfolgte wie bereits beschrieben [20]. Jede isolierte positive Einzelkolonie wurde in der Shigatoxin-PCR überprüft.

2.4 Charakterisierung gewachsener Kolonien

2.4.1 PCR zum Nachweis der Gene für Shigatoxine, Eae-Protein, Enterohämolytin, Katalase/Peroxidase und hitzestabile Enterotoxin

Zum Nachweis shigatoxinogener Bakterien in der Primärkultur (Enterohämolytin-Agar) erfolgt eine Abschwemmung des gewachsenen Bakterienrasens in 1 ml A. dest. steril. Diese Abschwemmung wurde 1:10 verdünnt und bei 100 °C erhitzt. Davon wurden 2,5 μ l als Template in die PCR-Reaktion (22,5 μ l) eingesetzt.

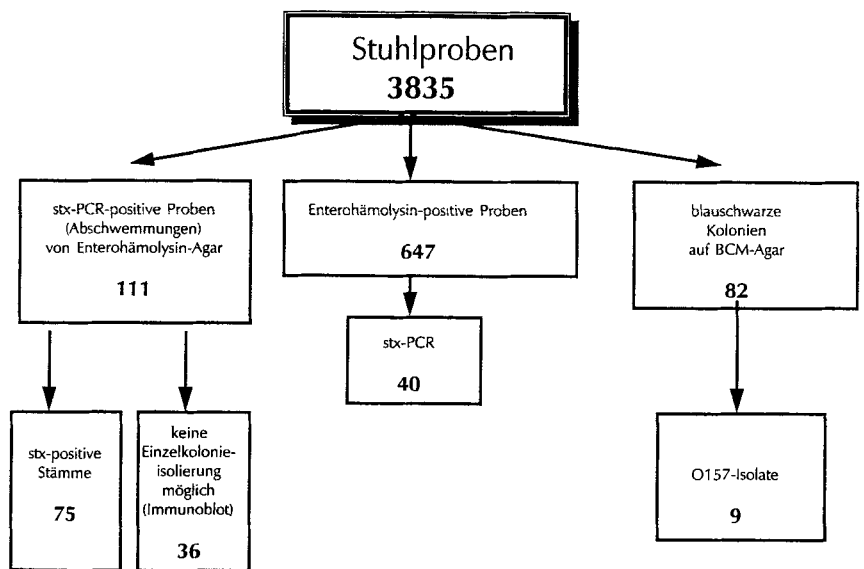


Abbildung 1: Häufigkeit des Nachweises von Shigatoxin-bildenden *E. coli*-Stämmen entsprechend unterschiedlicher Diagnoseverfahren.

Der PCR-Kit (N8080038) sowie der Kit Gene Amp dNTP (N8080007) der Firma Appl. Biosystem und entsprechende Protokolle kamen zur Anwendung.

In Tabelle 1 sind die Primer, die Reaktionsbedingungen und das nachzuweisende PCR-Produkt mit Größenangabe zusammengestellt. Für den Nachweis der Shigatoxin-Gene wurden beide Primerpaare KS 7/8 (stx-1) und GK 3/4 (stx-2) gemeinsam in den Reaktionsmischungen (Multiplex-PCR). 15 μ l der erhaltenen PCR-Amplifikate wurden mit 5 μ l 10 x Bromphenolblau-Lösung versetzt und auf einem 1 % Agarosegel mit 0,5 x TBE Elektrodennpuffer aufgetragen. Als Längenstandard diente der Molekulargewichtsstandard der Firma BioRad, der einen Bereich von 2000 bis 50 bp umfaßt. Als Positivkontrolle für die PCR-Reaktionen dienten die *E. coli*-Stämme EDL933 (stx-1/2, eaeA, katP, ehxA) und RD8 (stx-2, ast-1), als Negativkontrolle der *E. coli* C600 [10].

2.4.2 Nachweis der Shigatoxine mit Hilfe der ELISA

Von der Abschwemmung der Enterohämolytin-Agarplatte wurde bei positiver Shigatoxin-PCR oder sofort aus der Voranreicherung eine Shiga-Toxin-ELISA [10] in der Modifikation nach [21] durchgeführt. Dazu wurde ein Polymyxin B (PMB)-Aufschluß durchgeführt: das Sediment (oder die Abschwemmung) des verdächtigen Stammes wurden in 900 μ l PBS suspendiert

und mit 100 μ l Polymyxin B (PMB)-Lösung (52 mg Polymyxin B (SIGMA) in 2 ml bidest.) für 30 min bei 37 °C behandelt. Anschließend wurde abzentrifugiert und der Überstand zum Toxintest verwendet.

2.4.3 Serotypie

Die Serotypie erfolgte wie bei [18] angegeben.

2.4.4 Resistenzbestimmung

Für die Resistenzbestimmung wurden die MHK-Werte in Mikrotiterplatten gegen folgende Antibiotika bestimmt: Ampicillin, Mezlocillin, Sulbactam/Mezlocillin, Streptomycin, Tazobactam/Piperacillin, Cefotiam, Cefotaxim, Ceftazidim, Cefoxitin, Gentamicin, Kanamycin, Amikacin, Sulfamerazin, Trimethoprim/Sulfamerazin, Nourseothricin, Chloramphenicol, Oxytetracyclin, Ciprofloxacin, Imipenem. Die verwendeten Antibiotika-Grenzkonzentrationen entsprechen denen, wie sie bei [22] angegeben sind.

3 Ergebnisse

Alle Kulturbedingungen und angewandten Nährmedien sowie die molekularen Methoden wurden vor Beginn der Sentinel-Studie auf ihre Qualität, Spezifität und Sensitivität überprüft. Hierzu wurden EHEC-negative Stuhlproben mit Shigatoxin-bildenden *E. coli*-O157(EDL933)- und *E. coli*-non-O157(RD8)-Stämmen künstlich konta-

Tabelle 2: Serovare und Virulenzspektrum der EHEC-Einzellisolate

Serovar	Anzahl	Stx1	Stx2	eaeA	ehxA
O1:H ⁻	1	+	-	-	-
O8:H ⁻	2	+	+	-	+
O8:60:H51	4	+	+	-	+
O8:60:H51	1	+	+	-	-
O8:60:H51	2	+	-	-	-
O9:H ⁻	1	+	-	-	-
O12:H ⁻	3	-	+	-	-
O12:H30	1	-	+	-	-
O15:H ⁻	1	+	-	+	-
O22:H8	1	+	+	-	+
O22:H8	1	+	-	-	+
O23:H ⁻	1	-	+	-	-
O26:H ⁻	2	+	-	+	-
O26:H ⁻	1	+	-	-	-
O26:H ⁻	1	-	+	-	+
O26:H11	2	+	-	+	+
O26:H11	1	+	-	-	+
O26:H11	1	-	+	-	-
O30:H ⁻	1	+	+	-	+
O35:H ⁻	1	-	+	-	-
O39:H ⁻	1	+	-	-	-
O60:H33	1	+	-	-	-
O96:H ⁻	1	+	-	-	-
O96:H ⁻	1	-	+	-	-
O98:H ⁻	1	+	-	-	-
O100:H ⁻	1	-	+	-	+
O103:H ⁻	1	+	-	+	+
O103:H ⁻	2	+	+	+	+
O103:H2	4	+	+	+	+
O103:H2	1	+	-	+	+
O103:H18	3	+	-	+	+
O117:K1:H7	1	+	-	-	-
O133:H ⁻	1	+	-	-	-
O137:H ⁻	1	+	-	+	+
O145:H ⁻	1	+	-	-	+
O145:H28	2	-	+	+	+
O157:H7	7	+	+	+	+
O157:H ⁻	2	-	+	+	+
ONT:H ⁻	3	+	+	-	+
ONT:H23	1	+	-	-	-
ONT:H ⁻	8	+	-	-	-
ONT:H ⁻	1	-	+	-	-
Rauhform:H ⁻	1	+	-	-	+

miniert (ca. 10³/ml) und wie in Material und Methoden angegeben behandelt. Die praktisch 100 %ige Wiederfindungsrate der künstlich eingeführten Teststämme (Daten nicht aufgeführt) ließen eine hohe Sensibilität des Verfahrens erkennen.

Insgesamt kamen 3835 Durchfallstühle unterschiedlicher Konsistenz (wäßrig, wäßrig-blutig) von Patienten verschiedenen Alters und zufälliger Auswahl des Geschlechtes im Zeitraum vom 15. Januar bis 11. Dezember 1997 zur Untersuchung.

Aus den Abschwemmungen wurden bei 111 Proben entsprechende PCR positive Reaktionen festgestellt (das sind 2,9 %; Abb. 1). 75mal gelang die Isolierung relevanter *E. coli*-Stämme (Tab. 2).

Sehr vereinzelt wurden nicht bewachsene BCMTM *E. coli* O157:H7(+) culture medium-Platten oder Enterohämolyysin-Agarplatten beobachtet. In diesen Fällen wurden die Stuhlproben in phosphatgepufferter Tryptic Soy Broth (ohne Antibiotika) in gleicher Weise angeschüttelt und auf antibiotikafreier Blutplatte ausgestrichen. Auch durch dieses Vorgehen konnten in der Regel keine *E. coli*-Kolonien gefunden werden. Vereinzelt wurde dabei ein alleiniges Wachstum von Enterokokken und anderen Kokken beobachtet.

Die Ergebnisse der Isolierung potentieller EHEC-Bakterien über festen Nährmedien sind in Abbildung 1 zusammengefaßt. In 82 Proben wurden blauschwarze Kolonien auf BCMTM *E. coli* O157:H⁻ culture medium nachgewiesen, die als *E. coli* O157 verdächtig wurden. Durch serologische Überprüfung und durch Shigatoxin-PCR konnten davon nur neun als *E. coli* O157:H7/H⁻ bestätigt werden.

Aus 647 Stuhlproben wurden *E. coli*-Kolonien mit dem typischen EHEC-Hämolysinbild festgestellt, von denen allerdings nur in 40 Fällen eine Bestätigung mit Hilfe der Shigatoxin-PCR gelang.

Zur Isolierung von Einzelkolonien aus der Abschwemmung läßt sich deshalb das BCM- und das Enterohämolyysin-Medium nur teilweise verwenden, so daß in der Regel eine Isolierung von Einzelkolonien durch den Immunoblot erfolgen mußte. Allerdings gelang die Isolierung von EHEC-Einzelkolonien nur in 75 der 111 Shigatoxin-PCR-positiven Abschwemmungen. Von diesen 75 Isolatenergab die Analyse des Virulenzspektrums und des Serovars eine

unerwartete Breite zahlreicher *E. coli*-Varianten, die in Tabelle 2 zusammengefaßt sind.

Dabei konnten 35 *E. coli*-Stämme nur mit Stx1-, 15 Stämme mit Stx2- und 25 Stämme mit Stx1/Stx2-Bildung nachgewiesen werden (Tab. 2, 3). Wie aus beiden Tabellen zu entnehmen ist, konnten nur 12 % der Isolate als O157 identifiziert werden, etwa ebenso häufig ließen sich die O-Typen O103 (14,6 %), O26 (10,6 %), oder O8 (11,5 %) identifizieren, aber auch mit 17,3 % relativ häufig nicht-typisierbare Serovarianten (Ont) finden (Tab. 2).

Die Shigatoxin-bildenden Serovare (Tab. 2) wiesen eine Reihe zusätzlicher Determinanten für andere Virulenzfaktoren auf (Tab. 2, 3). 28 der 75 Shigatoxin-positiven Isolate waren in der eaeA-PCR positiv, 39 Stämme zeigten zusätzlich den EHEC-Hly-Typ und 15 von 29 untersuchten Toxinbildnern ohne weitere erkennbare Virulenzmerkmale erwiesen sich in der astA-PCR positiv.

Zusätzlich zum Virulenzspektrum wurde die Resistenz der Isolate gegen Antibiotika geprüft. Etwa die Hälfte der Isolate zeigte eine Mehrfachresistenz gegen Antibiotika. Dies betraf vor allem das Streptomycin, die Sulfonamide und Tetracycline, das Ampicilin und das Trimethoprim, 31 % der Isolate waren gegen die geprüften Antibiotika sensibel.

Alle 75 Shigatoxin-bildenden Isolate entstammen Durchfallpatienten mit wäßrigen, blutig-wäßrigen oder blutigen Stühlen, das klinische Bild HUS trat nur in einem Fall (O157:H⁻) auf. Eine besondere Häufung im Auftreten der EHEC-Isolate konnte bei Patienten im Kindesalter zwischen ein und drei Jah-

Tabelle 3: Häufigkeitsverteilung der Virulenzeigenschaften der 75 *E. coli*-Isolate

Eigenschaften	Anzahl (in %) der Stämme
Shigatoxin 1-Bildung	35 (46,6)
Shigatoxin 2-Bildung	15 (20)
Shigatoxin 1- und 2-Bildung	25 (33,3)
EaeA (Intimin)	28 (37,3)
EHEC-Hämolysinbildung	39 (52)
Katalase/Peroxidase	22 (29,3)
hitzebeständiges Enterotoxin East-1	19/29* (65,5)*
O-Antigen-Gruppe O157	9 (12)
O-Antigen-Gruppe O103	11 (14,6)
O-Antigen-Gruppe O26	8 (10,6)
O-Antigen-Gruppe O8	9 (11,5)
keiner O-Antigen Gruppe zugehörig (Ont)	13 (17,3)
insgesamt	75 (100 %)

* Von 29 Shigatoxin-positiven Isolatener(stx1, stx2, stx1/2), die keine weiteren Virulenzfaktoren (wie Eae, Ehx, KatP etc.) aufzeigten, waren 19 in der astA PCR positiv. Die übrigen Shigatoxin-Bildner wurden bisher nicht überprüft.

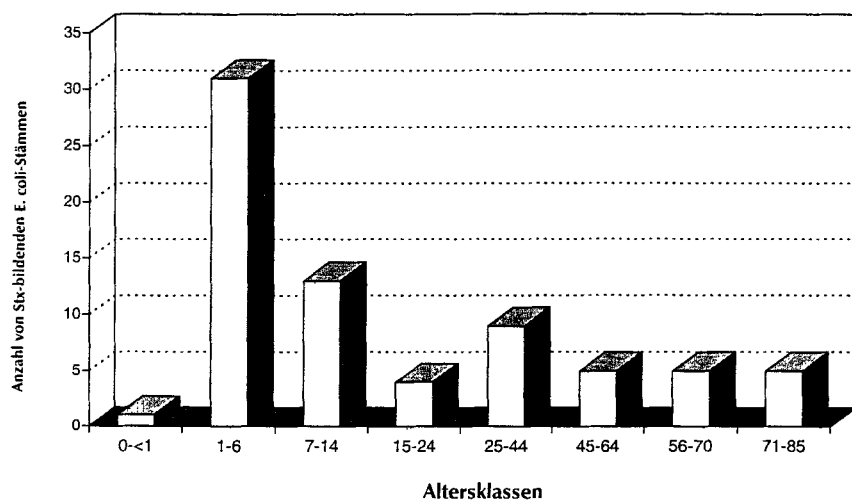


Abbildung 2: Isolierungshäufigkeit Shigatoxin-bildender *E. coli*-Stämme bezogen auf das Alter der Patienten.

ren (Abb. 2) und für den Zeitraum Früh- sommer bis Herbst (Abb. 3) nachgewie- sen werden.

4 Diskussion

Die Ergebnisse dieser Sentinel-Studie zur Erfassung und zum Vorkommen von Shigatoxin-bildenden *E. coli* (als EHEC bezeichnet) bei Durchfallpatienten mit blutig-wäßrigen Stühlen im definierten Einzugsgebiet eines privat niedergelassenen Laborarztes zeigen, daß gegenwärtig mit zwei kulturellen Anreicherungs-schritten (Anreicherungsnähr- medium und Enterohämolyisin-Agar) und anschließender Shigatoxin-PCR das sicherste Suchverfahren (Verdachts- diagnose) für EHEC-Bakterien vorliegt und im Sinne der ersten Stufe des Stufenprogramms [19] genügend Sicherheit bietet. Zwar kann alternativ im Suchver- fahren die PCR durch eine ELISA er- setzt werden, die zwar viel preiswerter und einfacher in der Handhabung ist, aber durch die hohe Falschpositiv-Rate unbedingt eine PCR-Bestätigung oder aber eine Bestätigung durch die Isolierung und Charakterisierung von Shiga- toxin-bildenden Einzelkolonien erfor- dert und daher ebenso aufwendig bleibt (vgl. weiter unten).

Die anfangs parallel durchgeführten Direktbestimmungen aus der Anrei- cherungsboullion mit verschiedenen kommerziellen oder eigenentwickelten ELISA oder dem Verozellzytotoxizi- tätstest (Daten nicht gezeigt) führten zu einem Anteil von 9,5 % ELISA-positi- ver Stuhlproben, die sich aber nur zu ca. 35 % durch die PCR bzw. durch die Einzelkolonie-Isolierung bestätigen ließen.

Ein positiver Shigatoxin-PCR-Nach- weis gelang in 111 der Proben, was einer Häufigkeit von 2,9 % und einer Präva- lenz von $13/10^5$ Einwohner entspricht. Da in der gleichen Sentinelstudie eine Prävalenz für Salmonellen von $160/10^5$ Einwohner gefunden wurde [23], kann man schließen, daß EHEC-Infektionen im Vergleich zu Salmonellosen nur ein Zehntel betragen, also etwa auf über 10 000 Fälle pro Jahr in der Bundesre- publik eingeschätzt werden können (vgl. die laut BSeuchG gemeldeten Sal- monellosen in Deutschland im [24] oder die für Niedersachsen erfaßten EHEC- Infektionen 1997 bei [25]).

Allerdings konnten aus den 111 PCR- positiven Abschwemmungen (Abb. 1) nur in 75 Proben Shigatoxin-bildende *E. coli* mit Hilfe der Immunoblottech- nik bzw. der Enterohämolyisin- oder BCM-Platte isoliert werden. Diese 75

Isolate zeigen ein breites Spektrum von O:H-Typen (Serovaren) und verschie- denen Virulenzeigenschaften (Tab. 2). Bemerkenswert ist das relativ hohe Vor- kommen (Tab. 2, 3) von Stx1-bildenden Stämmen, die nicht das EaeA (Intimin), Enterohämolyisin oder die plasmidko- dierte Katalase/Peroxidase aufweisen, jedoch konnten 15 dieser 20 Stämme das hitzestabile Enterotoxin EAST-1 pro- duzieren, was ihre klinische Bedeutung für die Enteritis herausstellt. Auch die Analysen anderer Autoren aus den letz- ten Jahren [14, 15, 26, 27] bestätigen die Dominanz von Stx1-Bildnern bei der Enteritis vs Stx1/2- bzw. Stx2-Bildnern bei HUS.

Interessant ist weiter, daß die Häufig- keit des klassischen EHEC-Serovars O157:H7/H⁻ mit nur 12 % der Isolate in dieser Sentinel-Studie etwa gleich groß ist mit der Häufigkeit anderer Sero- vare wie O26:H11/H⁻ mit 10,6 % bzw. O103:H2/H⁻ mit 14,6 % bzw. O8:H51/H⁻ mit 11,5 %. Isolate dieser Serovare waren auch diejenigen, die meistens das Virulenzmerkmal EaeA besaßen. Bekanntlich kommt das eaeA- Gen als Hauptkennungsfaktor für das von der Pathogenitätsinsel LEE ko- dierte Sekretionssystem III bei den bis- her beschriebenen EHEC-Serovaren, z. B. bei O157, O103 etc. häufig vor, scheint aber nicht essentiell für die klinisch-mikrobiologische Definition von EHEC-Infektionen zu sein, da eaeA- negative *E. coli*-Stämme z. B. der Sero- vare O18:H7; O91:H21; O113:H21 und O117:H4 von Patienten mit blutigem Durchfall und HUS isoliert wurden [28]. Da im Zeitraum dieser Sentinelstu- die nur ein HUS-Fall (durch O157:H7 stx2 eaeA ehxA) registriert werden konnte, läßt sich aus dem bisher vorlie-

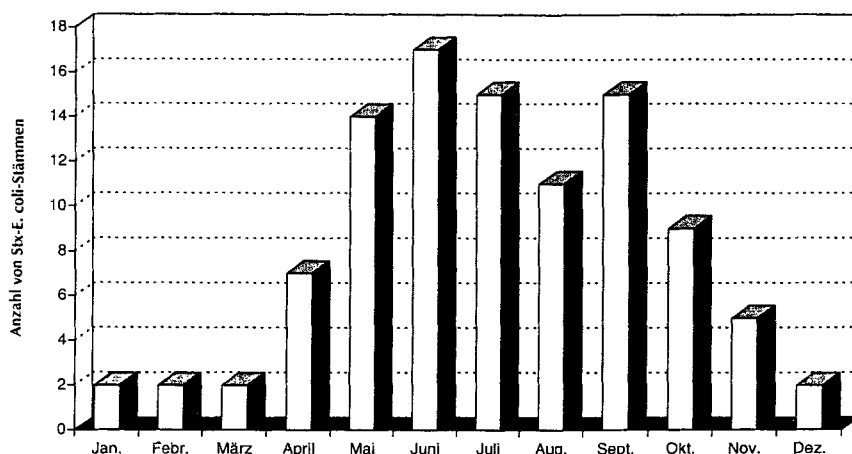


Abbildung 3: Isolierungshäufigkeit Shigatoxin-bildender *E. coli*-Stämme entsprechend der Jahreszeit.

genden Material keine Korrelation zum klinischen Schweregrad und dem Vorkommen des vollen Virulenzspektrums ziehen.

Alle O157:H7/H-Stämme konnten auch direkt vom BCM™ *E. coli* O157:H7 culture medium isoliert werden. Trotz der hohen Zahl falsch positiver blauschwarzer Kolonien (nur 13,4 % davon konnten bestätigt werden) ist das BCM™ *E. coli* O157:H7(+) culture medium zur schnellen Isolierung als geeignet einzuschätzen. Falsch-negative *E. coli* O157 wurden nicht gefunden. Damit ist das BCM™- *E. coli* O157:H7(+) culture medium deutlich besser als CHROMagar® O157, für den [29] bei der Untersuchung von Kuhkot 99 % falsch-positive Kolonien mit *E. coli* O157-Verdacht fanden.

Weniger geeignet erwies sich der Enterohämolsinagar zur Isolierung von EHEC-Kolonien, da nur bei 52 % der Shigatoxin-positiven Isolate eine Enterohämolsinbildung beobachtet werden konnte. Andererseits war zwar der Nachweis Enterohämolsin-bildender *E. coli*-Kolonien in 647 der insgesamt untersuchten 3835 Stuhlproben positiv, jedoch waren von diesen nur in 40 Proben PCR positive Isolate möglich. Das macht den Enterohämolsin-Agar als diagnostisches Hilfsmittel nur dann sinnvoll, wenn parallel dazu der Shigatoxin-Nachweis durch die PCR (ggf. auch eine ELISA) geführt wird und man Einzelkolonien aufgrund der EHEC-Hämolsin-Bildung auf ihre Toxinogenität prüfen kann (Abb. 1).

Die Ergebnisse der Sentinelstudie und die Empfehlungen des Arbeitskreises EHEC am RKI und BgVV [19] lassen einen Stufenplan der EHEC-Diagnostik sinnvoll und empfehlenswert erscheinen. Dieser sollte das Problem der sequenziellen Diagnostik (Voranreicherung, Screening, PCR, Stammissolierung und -typisierung), die zukünftigen Gesichtspunkte einer Meldepflicht für EHEC (Zeitökonomie, rechtzeitiges Einschalten der Gesundheitsämter) sowie die finanziellen und methodischen Möglichkeiten der Primärdiagnostik berücksichtigen.

Da alle EHEC-Bakterien durch ihre Shigatoxinbildung definiert sind und diese Eigenschaft auch das klinisch wichtigste Virulenzmerkmal darstellt, ergibt sich gegenwärtig für die Primärdiagnostik nur die Möglichkeit, EHEC-Bakterien durch Shigatoxin-gestützte Screening- und Isolierungsverfahren zu erfassen. Hierzu empfehlen sich – nach

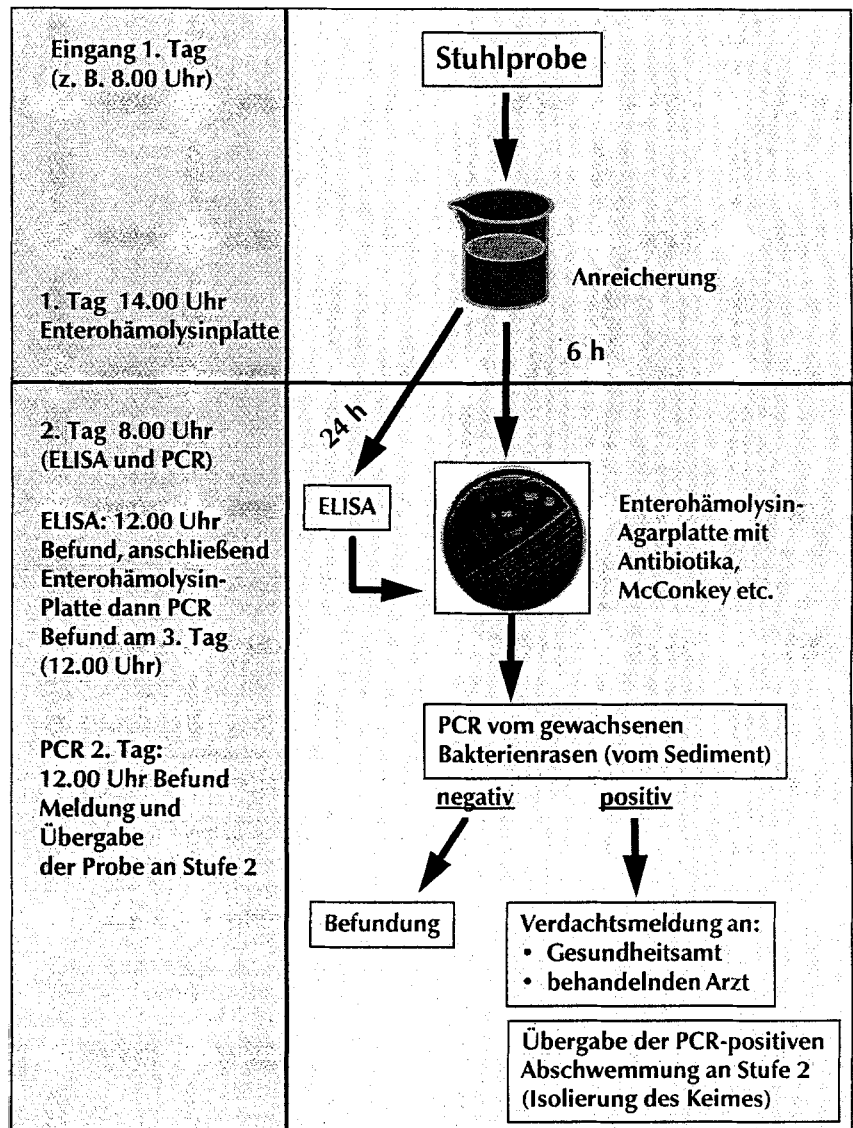


Abbildung 4: Stufen- und Zeitplan der EHEC-Untersuchung im Rahmen der Primärdiagnostik (erste Stufe).

Anreicherung der Stuhlprobe – zwei prinzipielle Verfahren, nämlich der phänotypische Nachweis der Toxinbildung mittels ELISA oder der Nachweis der Shigatoxingene mittels PCR. Da die Primärdiagnostik zu etwa 85 % von niedergelassenen Laborärzten wahrgenommen wird, müssen die Verfahren zum »Screening« auf EHEC von den z. T. aufwendigen Verfahren zur Isolierung und Charakterisierung des ätiologischen Agens aus Zeit- und Kostengründen getrennt werden.

Daher soll in der ersten Stufe (Primärdiagnostik, Abb. 4), die im wesentlichen in den niedergelassenen mikrobiologischen Laboratorien erfolgt, nach einer Anreicherung (z. B. EHEC-Boullion

der Firma heipha) und Subkultur (Enterohämolsin-Agar, alternativ McConkey etc.) die Anwesenheit von Shigatoxinen mittels ELISA bzw. von Shigatoxin-produzierenden Bakterien mit Hilfe einer Shigatoxin-spezifischen PCR (vgl. dazu Tab. 1) untersucht werden (Zeitaufwand insgesamt 1 bis 1½ Tage nach Eingang der Probe; vgl. Abb. 4). Liegt ein positives PCR-Signal vor, kann ein begründeter Verdacht gegenüber dem behandelnden Arzt sowie dem zuständigen Gesundheitsamt auf Vorliegen einer EHEC-Infektion ausgesprochen werden. Diese Verdachtsmeldung, die alle entsprechenden weiteren Aktivitäten durch den behandelnden Arzt und das Gesundheitsamt zur Folge hat, erfordert aber weiter unbedingt die Isolierung

rung bzw. Identifizierung des Erregers (Einzelkolonie), wozu sich das »Primärlabor« an ein zuständiges »Speziallabor« (Regionallabor) zwecks Isolierung der Einzelkolonien (zweite Stufe) wenden kann. Mit der Versendung der Probe an die Stufe 2 des Stufenplans endet im Regelfall die Primärdiagnostik und damit die Tätigkeit des niedergelassenen Laborarztes.

Gegenwärtig wird aber sehr häufig neben der PCR eine Shigatoxin-ELISA eingesetzt, die zwar billig und schnell, jedoch nach den in dieser Sentinelstudie erreichten Daten einen hohen Grad falsch-positiver Ergebnisse erbrachte. Es wird deshalb beim Vorliegen einer positiven ELISA in der EHEC-Primärdiagnostik (Abb. 4) empfohlen, sehr vorsichtig zu sein, um nicht häufig unnötige Verdachtsmeldungen und Weitergabe der Untersuchungsprobe zu veranlassen. In jedem Fall ist eine Bestätigung der positiven EHEC-ELISA durch eine Shigatoxin-PCR bereits in der Stufe der Primärdiagnostik angezeigt. Da bisher eine PCR-gestützte EHEC-Diagnostik nicht in allen niedergelassenen Diagnostiklabors durchgeführt werden kann, sollten sich mehrere entsprechende Laboratorien zu einem »PCR-Netzwerk« zusammenschließen (wie es ähnlich für eine Reihe von Leistungen nach Abschnitt 03 der GOÄ ja bereits üblich ist), um dann verlässliche Meldungen an das Gesundheitsamt vornehmen sowie die PCR-positiven Proben an die Stufe 2 der Diagnostik weiterreichen zu können. Allerdings ist hierbei eine Zeitverzögerung abzuwägen (Abb. 4).

Die zweite Stufe der EHEC-Diagnostik soll von einer Reihe »Speziallaboratorien« wahrgenommen werden, die je nach Größe des betreffenden Bundeslandes zu benennen sind und in Landesuntersuchungsämtern, Universitätsinstituten oder auch in privat niedergelassenen Laboratorien angesiedelt sein können. Diese »Speziallaboratorien« sind für die z. T. zeitaufwendige Stammisolierung und für die Bestimmung des Virulenzspektrums des isolierten Erregers, also für die Erfassung und Charakterisierung des ätiologischen Agens zuständig. Liegt der Erreger als Stammisolat vor, gleichgültig ob er über die PCR, Immunoblot oder über die ELISA erfaßt worden ist, dann ist er an die dritte Stufe der EHEC-Diagnostik, an das zuständige Nationale Referenzzentrum (das NRZ für Salmonellen und andere Enteritis-Erreger) zur weiteren Typisie-

rung zu übersenden. Diese Feintypisierung der EHEC-Isolate, also die Serotypie, Lysotypie, Genotypie (hier besonders die Pulsfeldgelelektrophorese) und ggf. die Elektrotypisierung, ermöglicht erst die genaue infektionsepidemiologische Zuordnung der Erregerisolate zu Infektketten und Infektionsquellen und stellt somit einen Abschluß in der Stufendiagnostik für EHEC-Bakterien dar. Sie ermöglicht auch das schnelle Feststellen von sog. sporadischen Fällen, die aufgrund der Klonalität der Erregerisolate, aber in Wirklichkeit zusammenhängende epidemische Geschehen darstellen. Erst durch dieses Stufenprogramm und durch ein gegenseitiges Befund- und Informationssystem ist eine epidemiologische Überwachung der EHEC-Infektionen und -Bakterien (Surveillance) und ein funktionierendes epidemiologisches Netzwerk für die Bundesrepublik Deutschland zu schaffen [30], wie es bereits in manchen Ländern üblich ist [31].

Danksagung:

Für die zuverlässige Durchführung der mikrobiologischen, immunologischen und genetischen Untersuchungen danken wir unseren Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen Frau B. Knüppel, Frau I. Rienacker, Frau D. Seltmann, Frau E. Skiebe und Frau W. Streckel sowie den Herren cand. biol. B. Liebmann und cand. biol. A. Lechel.

Literatur:

- [1] ASM News: ASM News 62 (1996) 118–119.
- [2] Griffin, P. M., and Tauxe, R. V.: The epidemiology of infections caused by *E. coli* O157:H7 other EHEC and the associated HUS. *Epidemiol. Rev.* 13 (1991) 60–98.
- [3] Tarr, P. I.: 1995. *E. coli* O157:H7: clinical diagnostic and epidemiological aspects of human infections. *Clin. Infect. Dis.* 20 (1995) 1–10.
- [4] Acheson, D. W., and Keusch G. T.: Which Shiga toxin-producing types of *E. coli* are important? *ASM News.* 62 (1996) 302–306.
- [5] Willshaw, G. A., Smith, H. R., Scotland, S. M., Field, A. M., and Rowe, B.: Heterogeneity of *E. coli* phages encoding verotoxins. Comparison of cloned sequences determining VT1 and VT2 and development of specific gene probes. *J. Gen. Microbiol.* 133 (1987) 1309–1317.
- [6] Hales, B. A., Hart, C. A., Batt, R. M., and Saunders, J. R.: The large plasmids found in enterohemorrhagic and enteropathogenic *E. coli* constitute a related series of transfer defective IncFIIA replicons. *Plasmid.* 28 (1992) 183–193.
- [7] McDaniel, T. K., and Kaper, J. B.: A cloned pathogenicity island from EPEC confers attaching and effacing phenotypes on *E. coli* K12. *Mol. Microbiol.* 23 (1997) 399–407.
- [8] Schmidt, H., Beutin, L., and Karch, H.: Molecular analysis of the plasmid-encoded haemolysin of *Escherichia coli* O157:H7 strain EDL 933. *Infect and Immun* 63 (1995) 1055–1061.
- [9] Boerlin, P., Chen, S., Colbourne, J. K., Johnson, R., deGrandis, S., and Gyles, C.: Evolution of EHEC hemolysin plasmids and the LEE in Shiga toxin-producing *E. coli*. *Infect. Immun.* 66 (1998) 2553–2561.

- [10] Tschäpe, H., Prager, R., Streckel, W., Fruth, A., Tietze, E., and Böhme, G.: Verotoxinogenic *Citrobacter freundii* associated with severe gastroenteritis and cases of haemolytic uraemic syndrome in a nursery school: green butter as the infection source. *Epidemiol. Infect.* 114 (1995) 441–450.
- [11] Rüssmann, H., Kothe, E., Schmidt, H., Franke, S., Harmsen, D., Caprioli, A., and Karch, H.: Genotyping of Shiga-like toxin genes in non-O157 *Escherichia coli* strains associated with haemolytic uraemic syndrome. *Med. Microbiol.* 42 (1995) 404–410.
- [12] Johnson, R. P., Clarke, R. C., Wilson, J. B., Read, S. C., Rhan, K., Renwick, S. A., Shadu, K. A., Alves, D., Karmali, M. A., Lior, H., McEwen, S. A., Spike, J. S., and Gyles, C.: Growing concern and recent outbreaks involving non-O157:H7 serotypes of verotoxinogenic *E. coli*. *J. Food Prot.* 59 (1996) 1112–1122.
- [13] Bockemühl, J., und Karch, H.: Infektionen des Menschen durch enterohämorrhagische *Escherichia coli* (EHEC) in Deutschland, 1995. *Bundesgesundhbl.* 39, 8 (1996) 290–296.
- [14] Bockemühl, J., Karch, H., und Tschäpe, H.: Infektionen des Menschen durch enterohämorrhagische *Escherichia coli* (EHEC) in Deutschland, 1996. *Bundesgesundhbl.* 40, 6 (1997) 194–197.
- [15] Morabito, S., Karch, H., Mariani-Kurkdjian, P., Schmidt, H., Minelli, F., Bingen, E., and Caprioli, A.: Enterotoxigenic Shiga toxin-producing *E. coli* O111:H2 associated with an outbreak of HUS. *J. Clin. Microbiol.* 36 (1988) 840–842.
- [16] Caprioli, A., Tozzi, A. E., Rizzonui, G., and Karch, H.: Non-O157 Shigatoxin producing *E. coli* infection in Europe. *Emerg. Infect. Dis.* 3 (1997) 578.
- [17] Savarino, S. J., McVeigh, A., Watson, J., and Cravioto, A.: Enterotoxigenic *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin is not restricted to enterotoxigenic *E. coli*. *J. Infect. Dis.* 173 (1996) 1019–1022.
- [18] Aleksic, S., Bockemühl, J., and Karch, H.: A biotyping scheme for Shiga-like (Vero)toxin producing *E. coli* O157 and a list of serological cross reactions between O157 and other gram negative bacteria *Zbl. Bakteriol.* 276 (1992) 221–230.
- [19] Robert Koch-Institut: Zum Aufbau einer Surveillance für enterohämorrhagische *E. coli* (EHEC) in Deutschland. *Epidemiologisches Bulletin* 39/97 269–273.
- [20] Timm, M., Klie, H., Richter, H., und Perlberg, K.-W.: Eine Methode zur gezielten Isolierung Verotoxin-bildender *Escherichia coli*-Kolonien. *Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.* 109 (1996) 270–272.
- [21] Richter, H., Klie, H., Timm, M., Gallien, P., Steinrück, H., Perlberg, K. W., und Protz, D.: Verotoxin-bildende *E. coli* (VTEC) im Kot von Schlachtrindern aus Deutschland. *Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.* 110 (1997) 121–127.
- [22] Klare, I., und Witte, W.: Mikroboillonverdünnungstest zur standardisierten Bestimmung minimaler Hemm- und minimaler bakterizider Konzentrationen antibakterieller Chemotherapeutika bei schnellwachsenden aeroben Bakterien. *Z. ges. Hyg.* 34 (1988) 111–115.
- [23] Gericke, B., Claus, H., Wagner, H., Holler, H., Voigt, M., und Tschäpe, H.: Die epidemiologische Situation der Salmonellose in Deutschland 1997: Vergleich einer Sentinel-Studie mit anderen Datenquellen. *Bundesgesundhbl.* (1998) (im Druck).

- [24] Robert Koch-Institut: Zur Situation der Salmonellose in Deutschland. *Epidemiologisches Bulletin* 3/98, 269–273.
- [25] von Hase, U., Pulz, M., und Windorfer, A.: EHEC-Infektionen in Niedersachsen: Januar 1995 – August 1997. *Nieders. Ärzteblatt* 11 (1997) 20–40.
- [26] Pai, C. H. R., Ahmed, N., Lior, H., Johnson, W. M., Sims, H., and Woods, D. E.: Epidemiology of sporadic diarrhea due to verotoxin producing *E. coli*. A two year prospective study. *J. Infect. Dis.* 157 (1988) 1054–1057.
- [27] Piérard, D., Stevens, D., Moriau, L., Lior, H., and S. Lauwers: Isolation and virulence factors of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* in human stool samples. *Clin. Microbiol. Immunol.* 3 (1997) 531–540.
- [28] Huppertz, H., Busch, D., Schmidt, H., Aleksic, S., and Karch, H.: Diarrhea in young children associated with *E. coli* non-O157 organisms that produce shiga-like toxin. *J. Ped.* 128 (1996) 341–346.
- [29] Wallace, J. S., and Jones, K.: The use of selective and differential agars in the isolation of *Escherichia coli* O157 from dairy herds. *J. Appl. Bacteriol.* 81 (1996) 663–668.
- [30] Karch, H.: Control of EHEC infection: the need for a network involving microbiol. laboratories and clinical and public health institutions. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 15 (1996) 276–280.
- [31] FoodNet: Foodborne diseases active surveillance network (FoodNet). *Emerg. Infect. Dis.* 3 (1997) 581–583.
- [32] Schmidt, H., Plaschke, B., Franke, S., Rüssmann, H., Schwarzkopf, A., Heesemann, J., and Karch, H.: Differentiation in virulence patterns of *Escherichia coli* possessing *eae* genes. *Med. Microbiol. Immunol.* 183 (1994) 23–31.
- [33] Brunder, W., Schmidt, H., and Karch, H.: KatP a novel catalase-peroxidase encoded by the large plasmid of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Microbiology* 142 (1996) 3305–3315.

Anschrift der Verfasser:

H. Holler und H. Wagner, Labor Dr. Dr. Wagner & Co. Göttingen, Werner-v.-Siemensstr. 10, 37029 Göttingen; Prof. Dr. S. Aleksic, Hygiene-Institut Hamburg, Marckmannstr. 129a, 20539 Hamburg, e-mail: hygiene.institut@hamburg.de; Dr. R. Praeger, Dr. R. Reissbrodt, Dr. H. Claus, Dr. B. Gericke und Prof. Dr. H. Tschäpe, Robert Koch-Institut, Bereich Wernigerode, Burgstr. 37, 38855 Wernigerode, e-mail: tschaepe@rki.de

Vergleich von ELISA, Verozelltest, PCR und immunmagnetischer Separation (IMS) in der Diagnostik von enterohämorrhagischen *Escherichia coli* (EHEC) in Stuhlproben

Von R. Kugler, U. Busch, M. Bayer, L. Gerber, G. Hellein, V. Barankay und H. Ch. Huber

Zusammenfassung

Im ersten Halbjahr 1997 wurden 414 Stuhlproben von 58 EHEC-infizierten Personen mit verschiedenen diagnostischen Methoden untersucht. Zum EHEC-Toxin nachweis wurde ein ELISA und der Verozelltest eingesetzt, Toxingene wurden mit der PCR nachgewiesen. Mit der IMS wurden die Stuhlproben auf *E. coli* der Serogruppe O157 untersucht.

Bei insgesamt 272 Proben wurde phänotypisch und/oder genotypisch Shigatoxin nachgewiesen. Die Nachweisverfahren für Toxin und Toxingene ergaben in 60 % der Fälle ein übereinstimmendes positives Ergebnis, während bei den restlichen Proben meist der ELISA und/oder der Verozelltest negativ ausfielen. Bei 61 Proben war nur mit der PCR der Nachweis einer EHEC-Infektion möglich. Durch Untersuchung von mehreren *E. coli*-Einzelkolonien konnten bei 51 Personen EHEC-Stämme isoliert und einer Serotypisierung zugeführt werden. Die Stämme gehörten zu 22 verschiedenen O-Gruppen. EHEC der Serogruppe O157 wurden dabei dreimal isoliert. Von den O157-positiven Personen wurden nur sieben Stuhlproben untersucht, so daß ein aussagekräftiger Vergleich der IMS mit anderen Nachweisverfahren nicht möglich war.

Summary

Comparison of ELISA, Verocelltest, PCR and Immunomagnetic Separation (IMS) in Detecting Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) in Stool Specimens

In the first six months of 1997 414 stool specimens from 58 persons infected with enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) were examined by different diagnostic methods. EHEC-toxin was detected by ELISA and verocelltest, toxin genes by PCR and *E. coli* O157 by IMS.

Shigatoxin and/or toxin genes were found in 272 stool specimens. Consistent positive results by all diagnostic methods that detect toxin or toxin genes were obtained in 60 %, in the rest of the specimens ELISA and/or verocelltest were negative. In 61 specimens the detection of an EHEC-infection was possible only by PCR. By analyzing several single *E. coli*-colonies EHEC-strains were isolated and serotyped from 51 persons. The strains belonged to 22 different O-groups. EHEC of serogroup O157 was isolated three times. From O157-positive persons only seven stool specimens were analysed and therefore a reliable comparison of IMS with the other detection methods was not possible.

Einleitung

Zur Diagnostik von enterohämorrhagischen *E. coli* (EHEC) aus Stuhlproben werden in der Literatur verschiedene Nachweismethoden angegeben. Phäno-

typische Eigenschaften der Keime, wie z. B. Sorbitverwertung oder Enterohämolysinbildung, werden zur Unterscheidung von physiologischerweise vorhandenen *E. coli* herangezogen. Hierzu werden Stuhlproben, evtl. nach

Voranreicherung, auf sorbithaltige Medien (gegebenenfalls mit Antibiotika- und/oder Telluritzusatz) oder auf Blutplatten, die gewaschene Schafblut-Erythrozyten enthalten, ausgestrichen und über Nacht bebrütet. Verdächtige