

Aus dem  
Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene der  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor: Univ.- Prof. Dr. med. K. Pfeffer

**Entwicklung einer multiplex *Realtime* PCR zur  
Diagnostik darmpathogener *E. coli* und  
Erhebung der Periodenprävalenz von EPEC und EAEC  
2006 am Universitätsklinikum Düsseldorf**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der  
Medizin

der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität  
Düsseldorf

vorgelegt von:  
Christoph Hardegen

2017

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen  
Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Univ.- Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Referent: Prof. Dr. med. Colin R. MacKenzie

Korreferentin: Univ.- Prof. Dr. med. Petra May

Die in dieser Dissertation zusammengefassten Arbeiten wurden von März 2005 bis Juni 2007 am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf durchgeführt. Aus dieser Arbeit sind folgende Veröffentlichungen hervorgegangen:

Originalarbeit:

C. Hardegen, S. Messler, B. Henrich, K. Pfeffer, J. Würthner, und C. R. MacKenzie, **A set of novel multiplex Taqman real-time PCRs for the detection of diarrhoeagenic Escherichia coli and its use in determining the prevalence of EPEC and EAEC in a university hospital**, *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 2010, 9:5

# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis .....	IV
1 Einleitung .....	1
1.1 Darmpathogene <i>E. coli</i> als Erreger infektiöser Diarrhoe .....	1
1.2 Charakteristika der verschiedenen darmpathogenen <i>E. coli</i> .....	1
1.2.1 Enterotoxische <i>E. coli</i> (ETEC) .....	2
1.2.2 Enteroinvasive <i>E. coli</i> (EIEC) .....	2
1.2.3 Enterohämorrhagische <i>E. coli</i> (EHEC) .....	3
1.2.4 Enteropathogene <i>E. coli</i> (EPEC) .....	4
1.2.5 Enteroaggregative <i>E. coli</i> (EAEC) .....	6
1.2.6 Diffus adhärierende <i>E. coli</i> (DAEC) .....	7
1.3 Bedeutung von EPEC und EAEC in Deutschland .....	7
1.4 Probleme in der Diagnostik darmpathogener <i>E. coli</i> .....	8
1.5 Zielsetzungen der Arbeit .....	9
2 Material und Methoden .....	11
2.1 Aufbereitung der DNA <i>templates</i> .....	11
2.2 Monoplex <i>Realtime</i> PCR .....	11
2.3 Konventionelle PCR / Gelelektrophorese .....	12
2.4 Sequenzierung der Amplifikations-Produkte .....	13
2.5 Primer- und Sondendesign .....	13
2.6 Entwicklung von internen Kontrollplasmiden .....	14
2.6.1 Amplifikation der <i>Inserts</i> für Kontrollplasmide .....	15
2.6.2 Aufreinigung der <i>Inserts</i> .....	16
2.6.3 Klonierung der Kontrollplasmide .....	16
2.6.4 Sequenzierung der Kontrollplasmide .....	16
2.7 Etablierung der <i>Realtime</i> multiplex TaqMan <sup>®</sup> PCR .....	17
2.7.1 TaqMan <sup>®</sup> <i>Realtime</i> multiplex PCR <i>Setup</i> .....	18
2.7.2 Interpretation und Zuordnung der Fluoreszenzsignale .....	22
2.8 Bakterienstämme .....	24
2.9 Untersuchung klinischer Proben 2006 .....	25
2.9.1 Auswahl der zu testenden Stuhlproben .....	25
2.9.2 Verarbeitung der Proben .....	26

2.9.3	Auswertung der Ergebnisse .....	26
3	Ergebnisse .....	27
3.1	Entwicklung der multiplex <i>Realtime</i> TaqMan® PCR .....	27
3.1.1	Evaluation und teilweise Neudefinition der Zielsequenzen .....	27
3.1.2	Neugestaltung der TaqMan® Sonden im multiplex Ansatz .....	28
3.1.3	Integration der internen Inhibitionskontrolle .....	29
3.1.4	Testung der Sensitivität .....	30
3.1.5	Testung der Spezifität .....	32
3.1.6	Integration der multiplex PCR in die Routinediagnostik .....	32
3.2	Periodenprävalenz von EPEC und EAEC im Jahre 2006 .....	35
3.2.1	Prävalenz von EPEC und EAEC nach Fachabteilungen .....	36
3.2.2	Prävalenz von EPEC und EAEC nach Altersgruppen .....	37
3.2.3	Mehrfachinfektionen verschiedener darmpathogener <i>E. coli</i> .....	38
3.2.4	Routinediagnostik im Vergleich zur systematischen Untersuchung .....	40
3.2.5	Co-Infektionen .....	41
4	Diskussion .....	42
4.1	Schwierigkeiten der Diagnostik darmpathogener <i>E. coli</i> .....	42
4.2	Weiterentwicklung der PCR Methode .....	43
4.3	Auswahl von PCR Zielsequenzen .....	44
4.4	Sensitivität und Spezifität .....	46
4.5	Untersuchung klinischer Proben im Jahre 2006 .....	46
4.6	Schlussfolgerung .....	50
5	Zusammenfassung .....	54
	Literaturnachweis .....	55
	Danksagung .....	66
	Eidesstattliche Versicherung .....	67

## Abkürzungsverzeichnis

AAF I/II	<i>aggregative adherence fimbriae I und II</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BBQ	<i>Blackberry Quencher</i>
Bfp	<i>Bundle forming pilus</i>
BHQ	<i>Blackhole Quencher</i>
bp	Basenpaare
Ct	<i>Cycle threshold</i>
Cy5	Cyanin 5
DAEC	diffus adhärierenden <i>E. coli</i>
DEC	darmpathogene <i>E. coli</i>
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
dNTPs	Desoxy-Nukleosidtriphosphate
<i>E.</i>	<i>Escherichia</i>
eae	<i>E. coli attaching and effacing</i>
EAEC	enteroaggregative <i>E. coli</i>
eaf	<i>EPEC adherence factor</i>
EAST 1	<i>enteroaggregative E. coli heat-stable enterotoxin 1</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EHEC	enterohämorrhagische <i>E. coli</i>
EIEC	enteroinvasive <i>E. coli</i>
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
EPEC	enteropathogene <i>E. coli</i>
ETEC	enterotoxische <i>E. coli</i>
FAM	Carboxyfluorescein
FRET	Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer
HEX	Carboxyhexachlorofluorescein
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
IK	interne Inhibitions-Kontrolle
ipaH	Shigella Virulenz Plasmid
kb	Kilobasen
KBE	Kolonie bildende Einheiten

LEE	<i>Locus of Enterocyte Effacement</i>
LT	hitzelabiles Toxin
McF	MacFarland
MiQ	Qualitätsstandards für die mikrobiologisch-infektiologische Diagnostik für Deutschland
pAA	<i>plasmid for Aggregative Adherence</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pInv	<i>plasmid for Invasiveness</i>
RKI	Rober Koch Institut
ROX	Rhodamin x
Stt	<i>shiga like toxin</i>
ST	hitze stabiles Toxin
STEC	<i>shigatoxin producing E. coli</i>
Stx	<i>shiga like toxin</i>
TAMRA	Tetramethylrhodamin
Tex Red	Sulfurhodamin 101
tuf	<i>E. coli housekeeping Gen</i>
UV	Ultraviolett
VTEC	<i>verocytotoxin producing E. coli</i>

**Vorsätze:**

k	kilo	$10^3$
m	milli	$10^{-3}$
$\mu$	micro	$10^{-6}$
n	nano	$10^{-9}$

**Einheiten:**

°C	Grad Celsius
M	Molar (1 M = 1 mol/l)
l	Liter
m	Meter
% (v/v)	<i>volume/volume</i> Prozent
% (w/v)	<i>weight/volume</i> Prozent

# 1 Einleitung

## 1.1 Darmpathogene *E. coli* als Erreger infektiöser Diarrhoe

Infektiöse Durchfallerkrankungen spielen weltweit eine große Rolle. Neben den akuten respiratorischen Erkrankungen gehören sie zu den häufigsten Infektionserkrankungen [1] und machen mit 18 % einen großen Anteil an der weltweiten Kindersterblichkeit aus [2]. Hauptsächlich betrifft dies die sogenannten Entwicklungsländer, aber auch in Industrienationen tragen infektiöse Durchfallerkrankungen einen wesentlichen Anteil zur Gesamtkrankheitslast der Bevölkerung bei [3]. In Deutschland hatten Durchfallerkrankungen 2001 einen Anteil von 60 % an allen gemeldeten Infektionskrankheiten insgesamt [1].

Das Spektrum der verursachenden Erreger variiert regional beträchtlich. Wenn auch in westlichen Ländern viral bedingte Gastroenteritiden führend sind [1], [4], so wird der Anteil sogenannter darmpathogener *E. coli* (DEC) bei den bakteriell verursachten infektiösen Durchfallerkrankungen sehr unterschiedlich eingeschätzt. Durch uneinheitliche und unzureichende Diagnostik sind belastbare Daten zur Epidemiologie dieser Erreger nur schwer zu erheben, und so deuten viele Untersuchungen darauf hin, dass ihr Anteil an bakteriell bedingten Durchfallerkrankungen unterschätzt wird [4]–[6].

## 1.2 Charakteristika der verschiedenen darmpathogenen *E. coli*

Im Unterschied zum einfachen *E. coli*, welcher den Großteil der physiologischen Darmflora ausmacht, haben einige *E. coli* durch den Erwerb spezifischer Virulenzeigenschaften einen obligat pathogenen Charakter entwickelt. In der Gruppe der darmpathogenen *E. coli* wurden als erstes die EPEC beschrieben, weshalb historisch bedingt oft die ganze Gruppe als enteropathogene *E. coli* bezeichnet wird.

Mittlerweile sind 6 verschiedene Typen darmpathogener *E. coli* auf Grund ihrer unterschiedlichen Virulenzeigenschaften und Erkrankungsbilder definiert.

### **1.2.1 Enterotoxische *E. coli* (ETEC)**

Enterotoxische *E. coli* sind als Verursacher von Diarrhoen bei Kleinkindern in Entwicklungsländern, Lebensmittelvergiftungen und der sogenannten Reisediarrhoe seit den frühen 70er-Jahren des zwanzigsten Jahrhunderts gut bekannt [7].

Sie werden über kontaminierte Lebensmittel und Wasser übertragen und verursachen meist schnell einsetzende, wässrige Diarrhoen. Insgesamt ähnelt das Erkrankungsbild den durch *Vibrio cholerae* verursachten Symptomen. ETEC wirken nach fimbrienvermittelter Adhäsion an der Dünndarmschleimhaut über die Expression zweier Enterotoxine pathogen [8]. Das hitzelabile Enterotoxin (LT) ist dem Cholera toxin verwandt und entfaltet seinen Effekt über die dauerhafte Aktivierung der Adenylatcyclase in den Enterozyten, was zur anhaltenden Aktivierung von Chloridkanälen und damit zur osmotischen Diarrhoe führt [8]. Das zweite, hitzestabile Toxin (ST) stimuliert die membranständige Guanylatcyclase in Enterozyten und bewirkt so ebenfalls eine gesteigerte Chlorid- und Flüssigkeitssekretion [8].

Beide Toxine sind plasmidkodiert und dienen dem Nachweis von ETEC [8]. Zunächst wurden die Toxine im Tierversuch nachgewiesen, später folgten ELISA und Blot-Verfahren über DNA-Sonden zur Detektion auf genetischer Ebene [8]. In der Folge wurde die Diagnostik mittels Nukleinsäureamplifikation in der PCR für ETEC bereits früh etabliert [8].

### **1.2.2 Enteroinvasive *E. coli* (EIEC)**

Enteroinvasive *E. coli* verursachen zunächst unspezifische, wässrige Diarrhoen, welche in einigen Fällen zum typisch dysenterischen Krankheitsbild mit blutigen, schleimigen Durchfällen und Fieber führen [8]. Die Übertragung erfolgt über kontaminierte Nahrungsmittel und Wasser. Während hauptsächlich in Regionen mit schlechtem Hygienestandard mit EIEC Infektionen gerechnet werden muss, scheint das Vorkommen in westlichen Ländern gering und auf nahrungsmittelassoziierte Ausbrüche beschränkt zu sein [8].

Nicht nur das Erkrankungsbild, sondern auch die Pathogenese durch Invasion ins Kolonepithel und intrazelluläre Vermehrung mit nachfolgender Entzündung und Ulzeration sind bei *Shigella* spp. und EIEC identisch, was 1971 von DuPont

et al. erstmalig beschrieben wurde [9]. Die für die Epithelinvasion erforderlichen Faktoren sind bei beiden Spezies auf einem Plasmid kodiert, welches zumeist als *pInv* bezeichnet wird (*plasmid for Invasiveness*). Ausgehend von diesem Plasmid sind hochsensitive und hochspezifische DNA-Sonden entwickelt worden, mit Hilfe derer EIEC auf molekularbiologischer Basis detektiert werden kann [8]. Dies führte ebenfalls schon früh zu PCR gestützter Diagnostik [10]. Eine Abgrenzung zu *Shigella* spp. ist auf diesem Wege jedoch nicht möglich und muss auf serologischem Wege erfolgen.

### 1.2.3 Enterohämorrhagische *E. coli* (EHEC)

Die Definition der enterohämorrhagischen *E. coli* (EHEC) entstand 1983 als Konsequenz zweier Beobachtungen. Durch Verzehr von unzureichend gegarten Hamburgern war es zu einem Ausbruch hämorrhagischer Colitis gekommen (*hamburger disease*), womit die bis dahin seltene *E. coli* Serogruppe O157:H7 verbunden war [11]. Des Weiteren konnten Fälle des Hämolytisch Urämisches Syndroms mit Zytotoxin produzierenden *E. coli* in Verbindung gebracht werden [12]. Auf der Grundlage von Arbeiten aus 1977 war dieses Toxin Verozytotoxin benannt worden [13]. Zusätzlich war beobachtet worden, dass bestimmte *E. coli* Stämme verschiedene, aus *Shigella dysenteriae* bekannte, Toxine produzierten (*Stx*, oder *shiga like toxin*, *Stt*) [14]. Letztendlich zeigte sich, dass diese Toxine identisch sind und vom *E. coli* Stamm O157:H7 produziert wurden [15]. Hieraus erklärt sich die teils verwirrende Namensgebung von *shigatoxin producing E. coli* (STEC) über *verocytotoxin producing E. coli* (VTEC) bis *enterohämorrhagischer E. coli* (EHEC) mit der direkten Assoziation zur schweren klinischen Ausprägung. Hier soll im Weiteren die Bezeichnung EHEC gewählt werden.

Das Reservoir für humanpathogene EHEC bilden vorwiegend Rinder. Die Übertragung erfolgt über Nahrungsmittel (insbesondere Milch und Fleisch) und Wasser, mit einer sehr niedrigen Infektionsdosis [8]. Betroffen sind prinzipiell alle Altersgruppen, wobei Kinder und alte Menschen besonders gefährdet sind [16]. Das klinische Bild besteht aus einer zunächst wässrigen, im weiteren Verlauf dann hämorrhagisch-pseudomembranösen Colitis, welche morphologisch der *Clostridium difficile* assoziierten Colitis ähnelt [8]. In den

meisten Fällen heilt die Erkrankung folgenlos ab. In etwa 10 % der O157 Fälle und bei ca. 1 % der non O157 Fälle entwickelt sich ein Hämolytisch Urämisches Syndrom mit mikroangiopathischer hämolytischer Anämie, Thrombozytopenie und Nephropathie [16].

Wenn auch O157:H7 ein für EHEC typischer Serotyp ist, so besteht doch auch hier keine feste Zuordnung zu bestimmten Serogruppen. Die Identifikation erfolgt im Wesentlichen über die Toxine als Virulenzfaktoren, sowohl durch enzymatische Immunoassays als auch in molekularbiologischer Form mittels Hybridisierungs- oder Nukleinsäureamplifikationsverfahren [8].

Die phagenkodierte und hitzelabile *shiga-like* Toxine (Stx1, Stx2) vermitteln ihre zytotoxische Wirkung über Glykosphingolipide als Rezeptoren in eukaryotischen Zellen. Zusätzlich kann ein plasmidkodiertes Enterohämolysin als Virulenzfaktor vorhanden sein. In einigen Fällen findet sich auch bei EHEC, insbesondere bei den typischen Serogruppen, die hauptsächlich von EPEC bekannte, chromosomal kodierte Pathogenitätsinsel LEE (*locus of enterocyte effacement*) [8].

#### **1.2.4 Enteropathogene *E. coli* (EPEC)**

Bereits in den 1940er und 1950er Jahren wurden mit Hilfe des Kauffmann-Schemas zur Serotypisierung von *E. coli* [17] bestimmte Serogruppen mit Durchfallerkrankungen bei Kleinkindern und insbesondere schwerwiegenden Ausbrüchen in Kinderkrippen mit hohen Sterblichkeitsraten korreliert [18]. Diese Gruppe von Durchfallerregern wurde im Verlauf als enteropathogene *E. coli* (EPEC) bezeichnet [19].

Die Pathogenese der Durchfallerkrankung durch EPEC ist nach wie vor nicht vollständig geklärt, beinhaltet jedoch verschiedene, in unterschiedlichem Ausmaß auftretende Aspekte. Ein für die in Zellkulturen sichtbare, lokalisierte Adhärenz verantwortliches Plasmid wurde als *EPEC adherence factor* (eaf) beschrieben [20]. Das Vorhandensein dieses Plasmids führt zur Ausbildung von sogenannten *bundle forming pili* (Bfp) [21] und vermittelt so die bakterielle Anhaftung an Enterozyten [22]. Ein weiterer Aspekt der Pathogenese besteht aus einem die Signaltransduktion und das Zytoskelett der Enterozyten verändernden Typ III Sekretionssystem, welches genetisch in einer

chromosomal lokalisierten Pathogenitätsinsel, dem sogenannten *locus of enterocyte effacement* (LEE) kodiert ist [23]. Ebenfalls in dieser Region ist über das Gen *eae* (*E. coli attaching and effacing*) ein Adhäsin kodiert, welches als Intimin (für *intimate adherence*) bezeichnet wird [24]. Insgesamt entsteht durch die in dieser Pathogenitätsinsel kodierten Faktoren eine Zerstörung der Mikrovilli der Darmschleimhaut. Diese histopathologischen Veränderungen werden als *attaching-and-effacing-lesion* beschrieben und können in einigen Fällen auch durch andere *Enterobacteriaceae*, beispielsweise EHEC, verursacht werden [25].

Alle diese Aspekte können einzeln oder in Kombination zur Pathogenese beitragen. Die intestinale Permeabilitätserhöhung und verschiedene Sekretionsmechanismen können zur akuten Diarrhoe führen, wohingegen die Zerstörung der Mikrovilli über eine Malabsorption eine Erklärung für die mit EPEC assoziierten, prolongierten Diarrhoen sein könnte [8].

Die Serotypisierung von EPEC hat zwar eine lange Geschichte, kann jedoch auch für diese Gruppe darmpathogener *E. coli* keine hinreichende diagnostische Sicherheit liefern [8]. So beruht auch in diesem Fall die Diagnostik mittlerweile auf dem Nachweis der verschiedenen Virulenzfaktoren auf genetischer Ebene. Bereits 1983 wurde eine Hybridisierungssonde für das *eae*-Plasmid beschrieben [26], und der Nachweis des *eae* Gens korreliert zuverlässig mit dem Vorhandensein der LEE Pathogenitätsinsel [8]. PCR Methoden zum Nachweis beider Ziele existieren ebenfalls [8] und sind mittlerweile die diagnostische Methode der Wahl [16].

Auf der Grundlage dieser beiden Faktoren wurden 1995 im „*second international Symposium on EPEC*“ Bakterienstämme, in welchen beide Faktoren nachweisbar sind, als typische EPEC definiert; wohingegen nur *eae* positive Stämme ohne *eae*-Plasmid als atypisch bezeichnet werden [8].

Das durch EPEC verursachte Erkrankungsbild ist ein eher unspezifisch gastroenteritisches Bild mit meist akutem Beginn, teilweise jedoch auch prolongierter Diarrhoe. Die Übertragung erfolgt fäkal-oral, selten im Rahmen von Ausbrüchen nahrungsmittelassoziiert [8].

### 1.2.5 Enteroaggregative *E. coli* (EAEC)

Enteroaggregative *E. coli* wurden durch ihr „ziegelsteinartiges“ Adhärenzmuster im HEp-2 Zell-Assay 1987 erstmalig beschrieben und über den *aggregative adherence* Phänotyp als eigener Typ in der Gruppe der darmpathogenen *E. coli* definiert, da eine Zuordnung zu Serogruppen nicht möglich war [27].

Die Pathogenese der EAEC ist in weiten Teilen unbekannt. In vielen Stämmen sind plasmidkodierte Fimbrien (*aggregative adherence fimbriae*, AAF I und AAF II) vorhanden, welche jedoch nicht allein das Adhärenzmuster erklären können [28]–[30]. Eine vermehrte Schleimproduktion mit folgender Biofilmbildung kommt möglicherweise durch eine Stimulation von Becherzellen zustande [8]. Des Weiteren werden zytotoxische Effekte beobachtet, welche teils durch plasmidkodierte Toxine verursacht werden. Ein dem hitzestabilen Toxin von ETEC verwandtes Toxin (EAST1, *enteroaggregative E. coli heat-stable enterotoxin*) wird beispielsweise auch in EAEC gefunden, jedoch ist dieses nicht der Gruppe der EAEC exklusiv zuzuordnen [30]. Zusätzlich scheinen inflammatorische Mechanismen eine Rolle in der Pathogenese von EAEC zu spielen [31].

EAEC verursachen eine unspezifische, wenig wegweisende Symptomatik mit wechselnder Ausprägung [30]. Hierbei werden EAEC bei Kindern und Erwachsenen nicht nur in Entwicklungsländern gefunden [32]. Sie scheinen eine besondere Bedeutung bei HIV positiven Patienten zu haben und kommen häufig als Verursacher von reiseassoziierten Diarrhoen in Frage [32]. Vor allem aber werden EAEC mit prolongierten Diarrhoen und sogar Wachstumsverzögerung bei Kindern in Verbindung gebracht [31].

Die Diagnostik beruht mittlerweile größtenteils auf dem molekulargenetischen Nachweis von Sequenzen auf dem Plasmid, welches die Aggregative Adhärenz vermittelt (pAA). 1990 entwickelten Baudry et al. erstmalig eine DNA Sonde (pCVD432) als diagnostische Alternative zum „Goldstandard“, dem HEp-2 Zell-Assay [33]. Ausgehend hiervon hat sich auch für EAEC der Nachweis mittels PCR zum praktikablen Verfahren entwickelt [34].

### **1.2.6 Diffus adhärierende *E. coli* (DAEC)**

Die Bedeutung diffus adhärierender *E. coli* (DAEC) ist unklar. Eine Abgrenzung von den anderen darmpathogenen *E. coli* erfolgte zunächst durch ein diffuses Adhärenzmuster im HEp-2 Zell-Assay [8]. Inwieweit jedoch DAEC tatsächlich pathogenetisch für Durchfallerkrankungen verantwortlich sind, ist nach wie vor unsicher [8]. Manche Autoren beschreiben eine enge Verwandtschaft zu EAEC [35], wohingegen andere Klassifizierungen die Nähe zu EPEC herausstellen [16]. Eine sichere Differenzierung mittels PCR oder Hybridisierungsverfahren ist ebenfalls nicht möglich [35], so dass unklar bleibt, ob hier tatsächlich von einer eigenen Gruppe gesprochen werden kann.

### **1.3 Bedeutung von EPEC und EAEC in Deutschland**

Die Mitte des 20. Jahrhunderts gefürchteten EPEC-Ausbrüche bei Kleinkindern mit dramatischer klinischer Ausprägung zeigen sich in dieser Form nicht mehr [36], jedoch ist der typische EPEC in Entwicklungsländern auch heute noch mit erhöhter Kindersterblichkeit durch Durchfallerkrankungen verbunden [37]. Im Unterschied hierzu ist die Datenlage für den atypischen EPEC weniger eindeutig. In aktuelleren Untersuchungen war der atypische EPEC der vorherrschende Typ, insbesondere in Industrieländern [36]. Ob dies aber eine tatsächliche Veränderung innerhalb der Gruppe der EPEC bedeutet oder ein Effekt verbesserter Untersuchungstechniken und veränderten Testverhaltens ist, kann nicht sicher gesagt werden [38]. Wie die Pathogenität des atypischen EPEC in Industrieländern einzuschätzen ist, wird kontrovers diskutiert [39]. Hierzu sind nur wenige Daten für Deutschland verfügbar [40], und fundierte diagnostische Empfehlungen auf lokaler Ebene sind somit nur schwer zu treffen.

Die Bedeutung von EAEC als Verursacher von Durchfallerkrankungen bei Fernreisenden und prolongierten Diarrhoen bei Kindern ist sowohl in Entwicklungsländern als auch in Industrienationen gut belegt [32], [41]. Auch für enteroaggregative *E. coli* existieren jedoch für den deutschsprachigen Raum nur sehr wenige Untersuchungen, und diese sind jeweils auf Kinder beschränkt [42], [43].

So ist insgesamt die Bedeutung von darmpathogenen *E. coli* in Deutschland nicht gut belegt, obwohl neben EHEC auch Erkrankungen durch die übrigen darmpathogenen *E. coli* seit 2001 nach dem Infektionsschutzgesetz (IfSG) meldepflichtig sind [1]. Dies liegt auch darin begründet, dass die Diagnostik darmpathogener *E. coli* durch die fortschreitenden Veränderungen der diagnostischen Verfahren noch nicht standardisiert und nicht überall in gleicher Qualität verfügbar ist. Epidemiologische Daten sind auf Grund der unterschiedlichen Testverfahren demnach schwierig zu erheben und schlecht vergleichbar [8], [39]. So wird die Prävalenz von darmpathogenen *E. coli* in Deutschland bislang wahrscheinlich unterschätzt [6].

#### **1.4 Probleme in der Diagnostik darmpathogener *E. coli***

Die Diagnostik von darmpathogenen *E. coli* ist schwierig. Das klinische Bild der Erkrankung ist zumeist unspezifisch und wenig wegweisend. Kulturelle und biochemische Verfahren sind nicht in der Lage, pathogene von apathogenen *E. coli* zu unterscheiden [8]. Die Serotypisierung kann zwar klassische Serogruppen identifizieren und hat in der Entdeckung und Beschreibung der darmpathogenen *E. coli* eine tragende Rolle gespielt, aber eine sichere Zuordnung zu einer Gruppe kann hierdurch nicht gewährleistet werden [8], [44]. Die mikroskopische Begutachtung der Bakterienstämme in Zellkulturen, beispielsweise für EAEC, mag zwar nach wie vor als „Goldstandard“ gelten [8], hat sich jedoch angesichts des technischen Aufwandes nicht als diagnostisches Verfahren in der Routine durchgesetzt. Immunoassays zum Toxinnachweis kommen nur für eine Teilmenge der fraglichen Pathovaren in Betracht [8].

In der Folge stützt sich die Suche nach darmpathogenen *E. coli* im Wesentlichen auf den molekularbiologischen Nachweis der Virulenzfaktoren. Über die Anfänge mit DNA-Hybridisierungssonden und Blotverfahren hat sich die Nachweismethode mittels PCR mittlerweile zwar grundsätzlich etabliert, befindet sich aber in Hinblick auf die Zielsequenzen (*targets*) und die damit zusammenhängende diagnostische Spezifität und technische Anwendbarkeit noch in konstanter Entwicklung und Evaluation [8].

Die Zuordnung zu etwaigen typischen Serogruppen sollte zwar nicht grundsätzlich verlassen werden, mittlerweile wird für die Diagnostik

darmpathogener *E. coli* aber primär der Nachweis mittels PCR empfohlen [1], [16].

Die vielfach publizierten, parallelen PCR-Nachweise multipler *targets* (multiplex PCR) wurden zum Zeitpunkt dieser Arbeit noch ausschließlich mittels konventioneller PCR und anschließender Gelelektrophorese durchgeführt [45]–[48]. Dies ist ein sehr aufwändiges Verfahren, welches durch die Arbeitsschritte nach der Amplifikation, insbesondere im diagnostischen Labor, eine nicht ganz unerhebliche Kontaminationsgefahr birgt. Hinzu kommt für jede Form der diagnostischen PCR, dass, gerade bei Testung von Material aus Stuhlproben, eine Inhibition der Amplifikationsreaktion nicht nur möglich, sondern auch schwierig auszuschließen ist [49]. Darum besteht bei der Aufbereitung des zu testenden Materials (*template*) die Herausforderung, einen guten Kompromiss zwischen einfacher und schneller Anwendbarkeit einerseits, und aufwändigerer Aufreinigung zu Gunsten optimaler diagnostischer Sicherheit und Sensitivität andererseits zu finden.

Das Prinzip der *Realtime* PCR erfordert keine Auftrennung der Amplifikationsprodukte mittels Gelelektrophorese mehr, sondern liefert das Ergebnis bereits während der Amplifikationsreaktion über ein Fluoreszenzsignal. So ist diese Methode im Vergleich zur konventionellen PCR schneller, deutlich weniger arbeitsintensiv und unter diesen Gesichtspunkten besser als Verfahren in der Routinediagnostik geeignet.

## **1.5 Zielsetzungen der Arbeit**

Ziel dieser Arbeit war es nun, ein verbessertes Werkzeug zur Diagnostik darmpathogener *E. coli* zu entwickeln.

Die im Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf bereits etablierten Primer und Sonden von 8 verschiedenen *Realtime* PCR *Setups* dienten als Grundlage. Ausgehend hiervon sollte über die Parallelschaltung verschiedener Amplifikationsreaktionen ein diagnostisches Bündel aus 3 multiplex *Realtime* PCR *Setups* etabliert werden, welches gleichzeitig die 5 Hauptgruppen darmpathogener *E. coli* (EPEC, EAEC, ETEC, EIEC, EHEC) detektiert.

Mit Hilfe dieser Methode sollte im Jahr 2006 die Prävalenz für EPEC und EAEC am Universitätsklinikum Düsseldorf erhoben werden, um entsprechende diagnostische Empfehlungen [50] auf lokaler Ebene überprüfen und gegebenenfalls anpassen zu können.

Im Einzelnen lauteten die Fragestellungen wie folgt:

- 1) Lässt sich das bisherige PCR *Setup* im Hinblick auf die Zielsequenzen optimieren und im Sinne eines Multiplexansatzes vereinfachen?
- 2) Lässt sich die neue Methode in die Routinediagnostik integrieren?
- 3) Lässt sich eine interne Inhibitionskontrolle in die multiplex PCR integrieren?
- 4) Welche Prävalenz haben EPEC und EAEC am Universitätsklinikum Düsseldorf?
- 5) Gibt es Häufungen von EPEC und/oder EAEC in bestimmten Altersgruppen oder Fachabteilungen?
- 6) Können lokale diagnostische Empfehlungen getroffen werden, und sollte eine systematische Untersuchung von Stuhlproben bei Kindern ausgedehnt werden?

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Aufbereitung der DNA *templates*

Die zu testenden Stuhlproben wurden zunächst zwischen 18 und 24 Stunden bei 37°C auf MacConkey-Agar inkubiert. Die durch Abwaschen aller Kolonien mit 2 ml NaCl 0,9 % (w/v) erhaltene Bakteriensuspension wurde in der Folge mit Aqua dest. auf MacFarland Standard 1,0 (entspricht ca.  $3 \times 10^8$  KBE/ml) verdünnt. Die Bakterien in der Suspension wurden durch 15-minütiges Erhitzen auf 95 °C lysiert. 2,5 µl (entspricht ca.  $7,5 \times 10^5$  KBE) dienten als direktes DNA-*template* zum Einsatz in der PCR. Das überschüssige Material wurde bei minus 20 °C gelagert.

### 2.2 Monoplex *Realtime* PCR

Grundlage für die Weiterentwicklung zur multiplex-PCR war ein im Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene der Universität Düsseldorf bereits in der molekularbiologischen Diagnostik etabliertes TaqMan® *Realtime* Verfahren, welches in 8 einzelnen PCR Ansätzen die 5 Pathovaren der darmpathogenen *E. coli* detektierte. In Tabelle 1 sind Primer und Sonden der Ausgangs-PCR aufgelistet.

Durchgeführt wurde diese PCR auf dem iCycler iQ™ System (Bio-Rad, Hercules, USA) mit folgendem Temperaturprofil:

50 °C für 10 min., 95 °C für 10 min., danach 45 Zyklen mit 95 °C für 15 sec. und 1 min. 60 °C, Pause bei 4 °C.

Die äußeren technischen Bedingungen zur Herstellung des Reaktionsansatzes waren die gleichen, wie unter 2.7.1 für den späteren multiplex-Ansatz beschrieben. Im Verlauf dieser Arbeit erfolgte eine schrittweise Anpassung dieses Setups zur multiplex PCR.

Tabelle 1: Zielgene, Primer und Sonden der monoplex *Realtime* PCR

Zielgen	Primer/ Sonde	Sequenz (5'-3')	Amplikon	Quelle
<b>eaf</b> (EPEC)	EP-1	GTT CTT GGC GAA CAG GCT TGT C	107 bp	MWG metabion MWG metabion Eurogentec
	EP-2	TTA AGC CAG CTA CCA TCC ACC C		
	EP-S	<b>FAM</b> *-AGT ACT GAC GTG CAG GTC GCC TGT TCG- <b>TAMRA</b> *		
<b>eae</b> (EPEC)	EPeh1	GAT CGTA TCG TCT GGG ATG ATA GC	110 bp	MWG metabion MWG metabion Eurogentec
	EPeh2	TGC ACA TAA GCA GGC AAA ATA GC		
	Epeh-S	<b>FAM</b> -CTG AAT CTG ACC GCC CTG ACT GCG TAA T- <b>TAMRA</b>		
<b>pCVD432</b> (EAEC)	EA 1	AGG TTT GAT ATT GAT GTC CTT GAG GA	152 bp	MWG metabion MWG metabion Eurogentec
	EA 2	TCA GCT AAT AAT GTA TAG AAA TCC GCT GTT		
	EA-S	<b>FAM</b> -CAT GTT CCT GAG AGT GCA ATC CCA GAC ATT AC- <b>TAMRA</b>		
<b>st</b> (ETEC)	ST-1	CTG GTT TTG ATT CAA ATG TTC GTG	107 bp	MWG metabion MWG metabion Eurogentec
	ST-2	TCC TGA GGG AAA GGT GAA AAA GAC		
	ST-S	<b>FAM</b> -TTG ATT TCT TCA TAT TAC CTC CGG ACA TGG CA- <b>TAMRA</b>		
<b>lt</b> (ETEC)	LT-1	AGC GGC GCA ACA TTT CAG	113 bp	MWG metabion MWG metabion Eurogentec
	LT-2	TTG GTC TCG GTC AGA TAT GTG ATT C		
	LT-S	<b>FAM</b> -TCG AAG TCC CGG GCA GTC AAC ATA TAG A- <b>TAMRA</b>		
<b>ipaH</b> (EIEC)	Ei-1	GAA CTC AAA TCT TGC ACC ATT CA	107 bp	MWG metabion MWG metabion Eurogentec
	Ei-2	CGT CCG TCC GAG AAC AAT TAA G		
	Ei-S	<b>FAM</b> -ATC CCC GAC ACC GTT TGT GAG TTT CAC T- <b>TAMRA</b>		
<b>slt 1</b> (EHEC)	slt1-1	CTT CCA TCT GCC GGA CAC ATA	87 bp	MWG metabion MWG metabion Eurogentec
	slt1-2	ATT AAT ACT GAA TTG TCA TCA TCA TGC AT		
	slt1-S	<b>FAM</b> -AAG GAA ACT CAT CAG ATG CCA TTC TGG CA- <b>TAMRA</b>		
<b>slt 2</b> (EHEC)	slt2-1	GAC GTG GAC CTC ACT CTG AAC TG	82 bp	MWG metabion MWG metabion Eurogentec
	slt2-2	TCC CCA CTC TGA CAC CAT CC		
	slt2-S	<b>FAM</b> -TAC TCC GGA AGC ACA TTG CTG ATT CGC- <b>TAMRA</b>		

\* Fluorophore und Quencher sind fettgedruckt

### 2.3 Konventionelle PCR / Gelelektrophorese

Zur anfänglichen DNA Amplifikation wurden herkömmliche PCR Protokolle im Thermocycler (Biometra GmbH, Göttingen) schrittweise an die Bedingungen für die ursprünglich zur *Realtime* PCR bestimmten Primer angepasst.

Tabelle 2 zeigt die Zusammensetzung der konventionellen PCR Ansätze. Die Temperaturprofile waren wie folgt gewählt:

95 °C für 5 min., dann 30 Zyklen mit 95 °C für 15 sec., jeweils 30 sec. zwischen 53°C und 63°C, 1 min. bei 72°C, Pause bei 4 °C.

Zur Analyse amplifizierter DNA wurde die Elektrophorese in 1- bis 2-prozentigem Agarosegel mit 0,5 % (w/v) TBE Laufpuffer (90 mM Tris, 90 mM Borat, 0,5 mM EDTA, pH 8,0) durchgeführt. Die DNA-Proben wurden mit 5 µl Probenpuffer (0,25 % (v/v) Bromphenolblau, 0,25 % (v/v) Xylencyanol, 15 % (v/v) Ficoll) aufgefüllt und bei einer Spannung von 120 Volt für 60 min. aufgetrennt. Nach 10-minütiger Inkubation mit 0,1 % iger (v/v)

Ethidiumbromidlösung und mehrfachen Waschvorgängen wurde das Bandenmuster unter UV-Licht bei 302 nm aufgezeichnet. Zum Fragmentlängenvergleich diente ein 1-kb-DNA Marker (Invitrogen GmbH, Karlsruhe).

Tabelle 2: Mengen und Konzentrationen von Reagenzien im konventionellen PCR Ansatz

50 µl Ansatz		
35 µl	H <sub>2</sub> O	
5 µl	MgCl	15 - 30 mM
2 µl	<i>Primer forward</i>	10 µM
2 µl	<i>Primer reverse</i>	10 µM
1 µl	dNTPs	je 1,3 mM
2 µl	Taq Polymerase	5 Units/µl
3 µl	<i>Template</i>	

## 2.4 Sequenzierung der Amplifikations-Produkte

Nach entsprechender Gelelektrophorese wurden die Amplifikationsprodukte bei Bedarf nach dem Standardprotokoll des QUIAEX II Agarose Gel Extraction Kit (Quiagen, Hilden) aufgereinigt und sequenziert (GATC Biotech, Köln)

## 2.5 Primer- und Sondendesign

Um die Spezifität und Sensitivität der bestehenden Primer und Sonden für die gesuchten Pathogene zu überprüfen, erfolgte eine Literaturrecherche (PubMed) zum Abgleich der gewählten Zielgene und eventueller Alternativen. Des Weiteren erfolgten multiple softwaregestützte *alignments* (*Basic Local Alignment Search Tool* – BLAST, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) zur Detektion von eventuell bekannten Sequenzvarianten.

In Bezug auf die molekularbiologische Diagnostik von EAEC herrscht nach Studienlage deutliche Unsicherheit. Wie unter 4.3 näher ausgeführt ergab sich jedoch hier keine bessere Alternative zum vorbestehenden *Target*, einer Genomsequenz des *aggregative adherence plasmids* (pCVD432) [34].

Bezüglich der Diagnostik von EPEC stützt sich die PCR auf zwei Genloci. Zum einen ein hoch konserviertes Plasmid, welches unter anderem für den *bundle forming pilus* kodiert und daher als *EPEC Adherence Factor* (eaf) bezeichnet

wird [51], [52], zum anderen eine für Intimin kodierende chromosomale Region (eae) im Bereich des *locus of enterocyte effacement* (LEE) [53]. Für das gut konservierte eaf-Plasmid konnten die bereits existierenden Primer und Sonde grundsätzlich beibehalten werden. In Bezug auf die für Intimin kodierende Region (eae) besteht jedoch eine große Heterogenität. Verschiedene Intimin-Subtypen sind definiert [44], [54]–[56], so dass auch sequenztechnisch eine Anpassung von Primern und Sonde notwendig wurde.

Mit Hilfe des *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) wurde auf der Grundlage von 80 publizierten Sequenzen ein *multi sequence alignment* angefertigt. Gegenüber der bislang genutzten Zielsequenz konnte so eine besser konservierte Region innerhalb des Intimin-Gens ermittelt werden. Unterstützt durch TIB MOLBIOL (Berlin) gelang es, ein Primer-Trio und eine Sonde zu entwickeln, welche unter Zuhilfenahme einer degenerierten Basenposition das Spektrum der publizierten Sequenzen bestmöglich abdeckten.

Die Sonden und Primer für die übrigen *targets* konnten in der Sequenz unverändert bleiben. Lediglich die Fluorophore und *Quencher* der TaqMan<sup>®</sup> Sonden mussten im Verlauf ausgetauscht werden, um im multiplex *Setup* mehrere Fluoreszenzsignale getrennt voneinander detektieren zu können.

## 2.6 Entwicklung von internen Kontrollplasmiden

Insbesondere als multiplex betriebene PCR-Methoden sind anfällig für eine Inhibition der Amplifikationsreaktion durch multiple Faktoren. Dies umso mehr, je weniger das zu testende Material im Vorfeld aufgereinigt wird.

Bei der hier beschriebenen Diagnostik handelte es sich um lediglich kochlysiertes Material aus direkten Kulturen von Stuhlproben. Daher bestand in diesem Fall die relevante Gefahr der Inhibition der PCR Reaktion und damit falsch negativer Ergebnisse.

Eine im zusätzlichen Ansatz mitgeführte Positivkontrolle kann zwar den korrekten technischen Ablauf der PCR generell bestätigen, eine Inhibition durch in der einzelnen Patientenprobe vorhandene Störfaktoren wird so jedoch nicht ausgeschlossen. Eine interne Kontrolle in jedem einzelnen Reaktionsansatz wäre geeignet, diese Lücke zu schließen [49].

Laborintern lag bereits eine als Inhibitionskontrolle genutzte TaqMan<sup>®</sup> Sonde für eine Sequenz des *Drosophila simulans* retrotransposons ninja (AB110070) vor, welche keinerlei Homologie zu bekannten Sequenzen der zu testenden Pathogene oder Keimen der Darmflora aufweist. Um diese Sonde ebenfalls verwenden zu können, musste nun für jeden der 3 Multiplexansätze ein spezielles Kontrollplasmid synthetisiert werden, in welchem die der Kontrollsonde komplementäre *Drosophila*-Sequenz von Bindungsregionen für zwei der im jeweiligen Ansatz vorhandenen Primer flankiert wird.

Mit Hilfe der Software Lasergene (DNASTAR<sup>®</sup> Version 9, Madison, USA) wurden hierzu 3 verschiedene Primerpaare generiert, welche spezifisch an die genannte *Drosophila* Sequenz binden und zusätzlich eine Sequenz enthielten, welche einem Vorwärts- bzw. Rückwärtsprimer desjenigen unten genannten PCR *Setups* entsprach, für welches die so generierte Sequenz später als interne Inhibitionskontrolle dienen sollte.

Auf diese Weise wurden 3 Nukleotidsequenzen generiert, die später im jeweiligen multiplex PCR Ansatz für 2 der diagnostisch eingesetzten Primer (in Tabelle 4 fettgedruckt dargestellt) als Bindungsregion dienen würden, und so bei ordnungsgemäß ablaufender PCR in jedem Fall auch amplifiziert würden. Das entsprechend positive Fluoreszenzsignal beweist so in jedem einzelnen Reaktionsgemisch den einwandfreien Ablauf der Reaktion bzw. detektiert durch ein ausbleibendes Signal eine Inhibition durch in der zu testenden Probe vorhandene Störfaktoren. So ist in jedem der 3 PCR Ansätze eine Inhibitionskontrolle gewährleistet, und gleichzeitig werden jeweils zumindest 2 der diagnostisch wichtigen Primer direkt in ihrer Funktion überprüft.

### **2.6.1 Amplifikation der *Inserts* für Kontrollplasmide**

Die Amplifikation der *Inserts* für die geplanten Kontrollplasmide mittels unter 2.6 beschriebener Primer wurde im Thermocycler (Biometra GmbH, Göttingen) mit dem in Tabelle 3 genannten Ansatz unter folgendem Temperaturprofil durchgeführt: 95°C für 5 min., danach 30 Zyklen, 95°C für 30 sec., 60 °C für 45 sec. und 1 min. 72 °C, danach 7 min. bei 72 °C und Pause bei 4 °C.

Tabelle 3: Mengen und Konzentrationen der PCR zur Amplifikation der *Inserts* für interne Kontrollplasmide

50 µl Ansatz		
35 µl	H <sub>2</sub> O	
5 µl	MgCl	25 mM
2 µl	<i>Primer forward</i>	10 µM
2 µl	<i>Primer reverse</i>	10 µM
1 µl	dNTPs	je 1,3 mM
4 µl	Taq Polymerase	5 Units/µl
1 µl	<i>Drosophila</i> Plasmid	(1:10 <sup>3</sup> )

### 2.6.2 Aufreinigung der *Inserts*

Die amplifizierten Produkte der PCR wurden in Agarose Gel 2 % (w/v) bei 120 Volt und einer Laufzeit von 45 Minuten aufgetrennt.

Anschließend wurden die Gelbanden nach dem Standardprotokoll des QUIAEX II Agarose Gel Extraction Kit (Quiagen, Hilden) aufgereinigt.

### 2.6.3 Klonierung der Kontrollplasmide

Die drei wie oben beschrieben aufgereinigten Oligonukleotidsequenzen wurden in der Folge nach dem Standardprotokoll des TOPO TA *Cloning*<sup>®</sup> Kits (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) in den pCR<sup>®</sup>II-TOPO<sup>®</sup> Vektor kloniert und des Weiteren mit Hilfe des *NucleoBond High Copy Plasmid Purification Kits* (BD Biosciences, Heidelberg) vervielfältigt und aufgereinigt.

### 2.6.4 Sequenzierung der Kontrollplasmide

Nach Plasmidverdau mit *EcoRI* und anschließender Sequenzierung der Fragmente (GATC Biotech, Köln) zeigte sich eine komplette Übereinstimmung mit den theoretisch konstruierten Sequenzen, und eine Verdünnung von 100 Kopien/µl wurde als *template* zur Inhibitionskontrolle im multiplex PCR Gesamtansatz verwendet.

## 2.7 Etablierung der *Realtime multiplex TaqMan*<sup>®</sup> PCR

Das Prinzip der *TaqMan*<sup>®</sup> *Realtime* PCR beruht auf der spezifischen Bindung einer Oligonukleotidsonde im Bereich der Zielsequenz zwischen den Bindungsstellen des Vorwärts- und Rückwärtsprimers. Dieses Prinzip wurde in den 90er Jahren erstmalig verwendet [57]. Die doppelt mit fluoreszierenden Farbstoffen markierte Sonde besitzt an ihrem 5'-Ende einen Donor-Fluoreszenzfarbstoff (*Reporter*) sowie an ihrem 3'-Ende einen Akzeptor-Farbstoff (*Quencher*). Durch die räumliche Nähe wird bei intakter Sonde trotz entsprechender Anregung über den Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer (FRET) das fluoreszierende Signal des *Reporters* durch den *Quencher* weitestgehend absorbiert. Angestoßen durch die ebenfalls spezifische Bindung der Primer wird die Sonde über die 5'-Exonuklease-Aktivität der *Taq*-Polymerase hydrolysiert. Durch das Freiwerden des Reporters und die nun größere Distanz zum *Quencher* wird das fluoreszierende Signal detektierbar, und dient so zum Nachweis der Amplifikation beziehungsweise der Zielsequenz [58]. Parallel zur Vermehrung des Amplifikationsproduktes steigt das Fluoreszenzsignal an. Diagnostisch relevant ist nun die Angabe desjenigen Amplifikationszyklus, bei welchem das Fluoreszenzsignal mit Beginn der exponentiellen Vermehrungsphase erstmalig die aus dem Grundrauschen errechnete Schwelle überschreitet (*Ct*-Wert, *Cycle threshold*). Je mehr Zielsequenz (*target*) vorliegt, desto früher wird der exponentielle Teil der Amplifikationskurve erreicht, so dass dieses Prinzip grundsätzlich sogar eine quantitative Analyse der zu testenden DNA erlaubt. Für eine entsprechende Quantifizierung der Pathogenlast wäre jedoch eine vergleichsweise aufwändige Aufbereitung der zu testenden DNA notwendig. Bei fehlender klinischer Relevanz wurde bei dieser PCR zu Gunsten der diagnostischen Geschwindigkeit auf einen quantitativen Anspruch verzichtet.

Die Weiterentwicklung zur multiplex PCR beruhte nun auf der Anwendung verschiedener Sonden für mehrere Zielsequenzen, welche mit Fluorophoren mit unterschiedlichen Emissionsspektren markiert waren: FAM (Carboxyfluorescein) 518 nm, HEX (Carboxyhexachlorofluorescein) 556 nm, ROX (Rhodamin x) 610 nm, Cy5 (Cyanin 5) 678 nm. Durch die

unterschiedlichen Wellenlängen der emittierten Fluoreszenzsignale und den Einsatz entsprechender Filter konnten so verschiedene Signale bzw. das Vorhandensein verschiedener Zielsequenzen zeitgleich in einem Reaktionsansatz differenziert werden.

### **2.7.1 TaqMan® Realtime multiplex PCR Setup**

Da nicht alle 8 Zielgene in einem einzigen Ansatz amplifiziert werden konnten, wurde eine Einteilung in 3 verschiedene multiplex Ansätze vorgenommen, welche jedoch zeitgleich im selben Temperaturprofil reagierten. Ein erster Ansatz detektierte EPEC und EAEC. Der zweite Ansatz zielte auf ETEC und EIEC, während der dritte EHEC spezifische Zielsequenzen nutzte. Tabelle 4 zeigt Primer und Sonden für alle Zielsequenzen.

Folgende Fluorophore kamen zum Einsatz: FAM für pCVD432 (EAEC), It (ETEC) und *slt2* (EHEC); ROX für *eae* (EPEC), *st* (ETEC) und *slt1* (EHEC); Cy5 für *eaf* (EPEC) und *ipaH* (EIEC); HEX für die interne Kontrollsonde.

Der erste PCR Ansatz zielte auf folgende Bereiche: Eine 152 bp lange Sequenz des Plasmids pCVD432 [34] für EAEC, ein 107 bp langes Fragment des „*enteropathogenic E. coli adherence factor*“ Plasmids (*eaf*) [51] und ein 152 bp großer Abschnitt des Intimin Gens innerhalb des „*locus of enterocyte effacement*“ (*eae*) für EPEC.

Tabelle 4: Zielgene, Primer und Sonden der multiplex *Realtime* PCR

Zielgen	Primer / Sonde	Sequenz (5'-3')	Accession-number	Quelle
eaf (EPEC)	EP-1 for	GTT CTT GGC GAA CAG GCT TGT C	X76137	MWG metabion
	EP-2 rev	TTA AGC CAG CTA CCA TCC ACC C		MWG metabion
	EP-S probe	<b>Cy5</b> –AGT ACT GAC GTG CAG GTC GCC TGT TCG- <b>BHQ-3</b> *		Eurogentec
eae (EPEC)	eae-S for	ACT GGA CTT CTT ATT RCC GTT CTA TG	Alignment / AB040740	MWG metabion
	<b>eae-B1 rev</b>	CTA AGC GGG TAT TGT TAC CAG A		MWG metabion
	eae-B2 rev	CCT AAA CGG GTA TTA TCA CCA GA		MWG metabion
	eae-TM probe	<b>ROX</b> -AAT CCT GAT CAA TGA AGA CGT TAT AGC CCA- <b>BBQ</b>		TIB MOLBIOL
pCVD 432 (EAEC)	EA-1 for	AGG TTT GAT ATT GAT GTC CTT GAG GA	X81423	MWG metabion
	<b>EA-2 rev</b>	TCA GCT AAT AAT GTA TAG AAA TCC GCT GTT		MWG metabion
	EA-S probe	<b>FAM</b> –CAT GTT CCT GAG AGT GCA ATC CCA GAC ATT AC- <b>TAMRA</b>		Eurogentec
st (ETEC)	ST-1 for	CTG GTT TTG ATT CAA ATG TTC GTG	M34916	MWG metabion
	<b>ST-2 rev</b>	TCC TGA GGG AAA GGT GAA AAA GAC		MWG metabion
	ST-S probe	<b>ROX</b> -TTG ATT TCT TCA TAT TAC CTC CGG ACA TGG CA- <b>BHQ-2</b>		Eurogentec
lt (ETEC)	LT-1 for	AGC GGC GCA ACA TTT CAG	S60731	MWG metabion
	LT-2 rev	TTG GTC TCG GTC AGA TAT GTG ATT C		MWG metabion
	LT-S probe	<b>FAM</b> -TCG AAG TCC CGG GCA GTC AAC ATA TAG A- <b>TAMRA</b>		Eurogentec
ipaH (EIEC)	Ei-1 for	GAA CTC AAA TCT TGC ACC ATT CA	AY206439	MWG metabion
	<b>Ei-2 rev</b>	CGT CCG TCC GAG AAC AAT TAA G		MWG metabion
	Ei-S probe	<b>Cy5</b> –ATC CCC GAC ACC GTT TGT GAG TTT CAC T- <b>BHQ-3</b>		Eurogentec
slt 1 (EHEC)	<b>slt1-1 for</b>	CTT CCA TCT GCC GGA CAC ATA	Z36899	MWG metabion
	slt1-2 rev	ATT AAT ACT GAA TTG TCA TCA TCA TGC AT		MWG metabion
	slt1-S probe	<b>ROX</b> –AAG GAA ACT CAT CAG ATG CCA TTC TGG CA- <b>BHQ-2</b>		Eurogentec
slt 2 (EHEC)	slt2-1 for	GAC GTG GAC CTC ACT CTG AAC TG	L11079	MWG metabion
	<b>slt2-2 rev</b>	TCC CCA CTC TGA CAC CAT CC		MWG metabion
	slt2-S probe	<b>FAM</b> –TAC TCC GGA AGC ACA TTG CTG ATT CGC- <b>TAMRA</b>		MWG metabion
Interne Kontrolle (IK)	probe	<b>HEX</b> -CCT CTT CAC ATT GCT CCA CCT TTC- <b>BHQ-1</b>	Laborintern	Eurogentec

\* Fluorophore und Quencher sind fettgedruckt, fettgedruckte Primer detektieren zusätzlich das interne Kontrollplasmid des jeweiligen Multiplexansatzes

Der zweite Ansatz zielte auf eine 107 bp Sequenz aus der kodierenden Region für das hitzestabile Enterotoxin (st) [59] und ein 113 bp langes Fragment aus der Region des hitzelabilen Enterotoxins (lt) [46], [60] für ETEC. Für EIEC diente eine 107 bp Sequenz auf dem *Shigella* Virulenz Plasmid [61] (*ipaH*), welches bei EIEC identisch ist, als Zielsequenz.

Der dritte Ansatz diente der Differenzierung von EHEC. Hierzu wurde ein 87 bp Fragment aus der Region des Shiga-like toxins 1 (*slt1*) [62] und ein 82 bp langes Teilstück aus der Region für Shiga-like toxin 2 [63] (*slt2*) amplifiziert.

Zusätzlich diente in jedem Ansatz die gleiche Kontrollsonde mit dem entsprechenden internen Kontrollplasmid und den jeweils zwei plasmidspezifischen Primern zur Inhibitionskontrolle.

Tabelle 5 zeigt die genauen Mengen und Konzentrationen der Reaktionsgemische für einen 25 µl Ansatz.

Tabelle 5: Mengen und Konzentrationen der Reaktionsansätze aller 3 multiplex *Realtime* PCR\*

<b>Multiplex 1 (EPEC, EAEC)</b>		
Zielgen	Oligonukleotid / Reagenz	Menge
	<i>No ROX Mastermix</i>	12,5 µl
eaf	EP-1 for EP-2 rev EP-Sonde (Cy5)	0,5 µl (20 µM) 0,5 µl (20 µM) 1,0 µl (2 µM)
eae	eae-S for <b>eae-B1 rev</b> eae-B2 rev eae-TM Sonde (ROX)	0,5 µl (20 µM) 0,5 µl (20 µM) 1,0 µl (20 µM) 0,5 µl (2 µM)
pCVD432	EA-1 for <b>EA-2 rev</b> EA-Sonde (FAM)	0,5 µl (20 µM) 0,5 µl (20 µM) 1,0 µl (2 µM)
	IK-Sonde (HEX) Aqua dest. IK-1	0,1 µl (50 µM) 2,4 µl 1 µl (100 Kopien)
	<i>template</i>	2,5 µl (McF 1,0)

<b>Multiplex 2 (ETEC, EIEC)</b>		
Zielgen	Oligonukleotid / Reagenz	Menge
	<i>No ROX Mastermix</i>	12,5 µl
st	ST-1 for <b>ST-2 rev</b> ST-Sonde (ROX)	0,5 µl (20 µM) 0,5 µl (20 µM) 1,0 µl (2 µM)
lt	LT-1 for LT-2 rev LT-Sonde (FAM)	0,5 µl (20 µM) 0,5 µl (20 µM) 1,0 µl (2 µM)
ipaH	Ei-1 for <b>Ei-2 rev</b> Ei-Sonde (Cy5)	0,5 µl (20 µM) 0,5 µl (20 µM) 1,0 µl (2 µM)
	IK-Sonde (HEX) Aqua dest. IK-2	0,1 µl (50 µM) 2,4 µl 1 µl (100 Kopien)
	<i>template</i>	2,5 µl (McF 1,0)

<b>Multiplex 3 (EHEC)</b>		
Zielgen	Oligonukleotid / Reagenz	Menge
	<i>No ROX Mastermix</i>	12,5 µl
slt 1	<b>slt-1 for</b> slt-1 rev slt-1 Sonde (ROX)	0,5 µl (20 µM) 0,5 µl (20 µM) 1,0 µl (2 µM)
slt 2	slt-2 for <b>slt-2 rev</b> slt-2 Sonde (FAM)	0,5 µl (20 µM) 0,5 µl (20 µM) 1,0 µl (2 µM)
	IK-Sonde (HEX) Aqua dest. IK-3	0,1 µl (50 µM) 4,9 µl 1 µl (100 Kopien)
	<i>template</i>	2,5 µl (McF 1,0)

\* fettgedruckte Primer detektieren zusätzlich das interne Kontrollplasmid des jeweiligen Multiplexansatzes

Für alle drei multiplex Ansätze wurde jeweils eine Leerprobe (Aqua dest.) und eine Positivkontrolle mitgeführt. Die Positivkontrollen waren jeweils Lysate von laborintern vorliegenden, sequenzierten Kontrollstämmen.

Um den regulären technischen Ablauf der PCR beurteilen zu können und die Anwesenheit von *Enterobacteriaceae* bzw. *E. coli* in der Probe zu belegen, wurde zu jedem Lauf ein vierter monoplex Ansatz zum Nachweis eines *E. coli housekeeping* Gens (*tuf*) hinzugefügt. Auch für diesen Ansatz wurde sowohl eine Leerprobe (Aqua dest.) als auch eine entsprechende Positivkontrolle mit Material eines nicht darmpathogenen *E. coli* Referenzstammes (ATCC 25922) mitgeführt. Primer und Sonde hierfür sind in Tabelle 6 aufgeführt.

Tabelle 6: Primer und Sonde der Kontroll-PCR für *tuf* (*housekeeping* Gen *E. coli*)

Zielgen	Primer/ Sonde	Sequenz (5'-3')	Quelle
<b>tuf</b>  ( <i>E. coli</i> )	tuf-for	TGG TCA GGT ACT GGC TAA GC	MWG/metabion
	tuf-rev	TCT TTG GAC AGA ATG TAC ACT TCA	MWG/metabion
	tuf-Sonde	<b>FAM</b> *-CCA TCA AGC CGC ACA CCA AGT TCG- <b>TAMRA</b> *	Eurogentec

\* Fluorophore und Quencher sind fettgedruckt

Nach Vorpipettierung der Reaktionsgemische inklusive der entsprechenden Kontrollplasmide in einem speziell hierfür reservierten Raum wurden die Gemische auf 96-*well* Platten pipettiert und mit den jeweiligen Kontrollplasmiden und dem entsprechenden zu testenden Material bzw. Positiv- und Leerkontrolle zum finalen Reaktionsvolumen aufgefüllt. Durchgeführt wurde die *Realtime* PCR auf dem iCycler iQ™ System (Bio-Rad, Hercules, USA) unter folgendem Temperaturprofil:

50°C für 10 min., 95 °C für 10 min., danach 45 Zyklen, 95°C für 15 sec. und 1 min. 60°C, Pause bei 4 °C.

Die Fluoreszenzsignale wurden bei folgenden Wellenlängen gemessen: 518 nm (FAM), 556 nm (HEX), 610 nm (Tex Red, bzw. ROX), und 678 nm (Cy5).

### 2.7.2 Interpretation und Zuordnung der Fluoreszenzsignale

Eine PCR Reaktion wurde dann als positiv angesehen, wenn ein Fluoreszenzsignal vor dem 40. Zyklus die berechnete Schwelle überschritten hatte (Ct-Wert kleiner als 40). Zusätzlich war Voraussetzung, dass eine

Positivkontrolle ebenfalls einen Ct-Wert von kleiner als 40 hatte, und dass in der Negativkontrolle kein Signal detektiert wurde. Als inhibiert wurde die PCR Reaktion angesehen, wenn bei fehlendem Signal für die entsprechenden *E. coli* Sequenzen das Signal für das jeweilige interne Kontrollplasmid (IK-1, IK-2 oder IK-3) einen Ct-Wert von mehr als 38 hatte. Im Falle einer Inhibition wurde die jeweilige Reaktion mit einem neuen Aliquot des Probenmaterials wiederholt. Abbildung 1 zeigt exemplarisch das Amplifikationsprotokoll eines Doppelnachweises von *eae* (EPEC) und pCVD432 (EAEC).

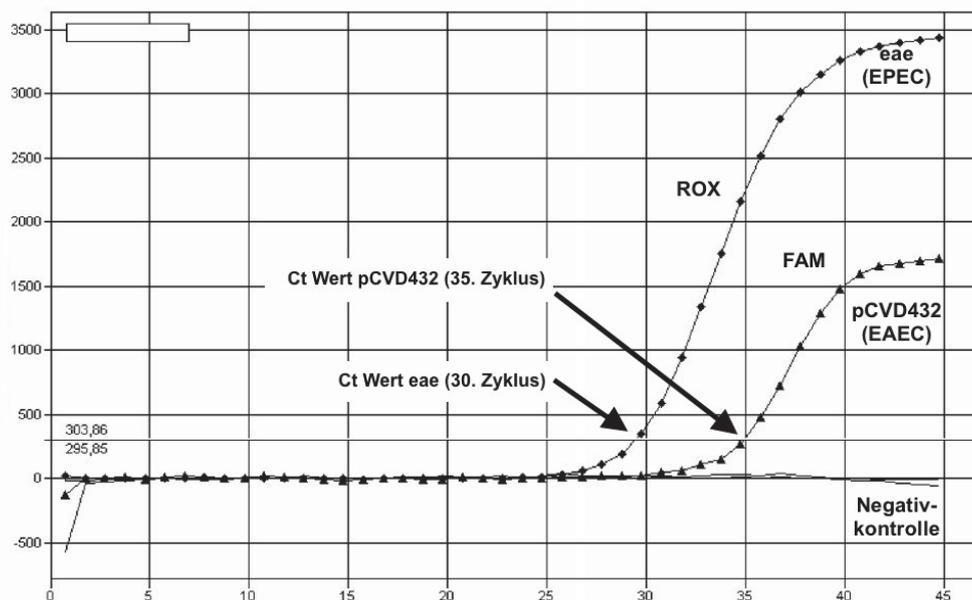


Abbildung 1: Graphische Darstellung des Fluoreszenzsignals eines Doppelnachweises von EPEC (*eae*) und EAEC (pCVD432) (Abb. nach [64])

Die Amplifikation wurde wie unter 2.7.1 beschrieben durchgeführt. Bei vorhandener Zielsequenz, und damit Destruktion der TaqMan® Sonde, steigt das Fluoreszenzsignal zyklusweise an. Der Ct-Wert gibt denjenigen Zyklus an, bei welchem das Signal die aus dem Grundrauschen errechnete Schwelle überschreitet (Cycle threshold). Durch unterschiedliche Fluorophore mit unterschiedlichen Wellenlängen (ROX für *eae* und FAM für pCVD432) können beide Signale parallel zueinander differenziert werden.

EAEC positiv wurde eine Reaktion bei technisch einwandfreiem Signal für pCVD432 aus Multiplex 1 gewertet. Ein positives Signal für *eae* kann sowohl auf EPEC, als auch auf EHEC hindeuten. Bei *eae* als einzig positivem Signal wurde entsprechend der unter 1.2.4 aufgeführten Definition ein „atypischer“ EPEC diagnostiziert. War zusätzlich das Signal für *eaf* positiv, lautete die

Diagnose „typischer“ EPEC. Bei positivem Signal für eae und negativem Ergebnis für eaf, jedoch positivem Signal für slt1 oder slt2 in Multiplex 3, wurde kein EPEC, sondern eine EHEC Infektion diagnostiziert. Waren nur die Signale für slt1 und/oder slt2 positiv, wurde ebenfalls von einer EHEC Infektion ausgegangen; allerdings erfolgte beim Nachweis von slt1 vor der Diagnose EHEC der Ausschluss einer Shigelleninfektion auf herkömmlichem Wege. Für den Nachweis von ETEC war ein positives Signal für st und/oder lt aus Multiplex 2 notwendig. War das Signal für ipaH positiv, wurde wiederum erst nach Ausschluss einer Shigelleninfektion von EIEC ausgegangen. Tabelle 7 zeigt die möglichen Kombinationen und ihre diagnostische Bedeutung.

Tabelle 7: Diagnostische Zuordnung der Zielgenkombinationen zu den 5 Gruppen darmpathogener *E. coli*

atypischer EPEC	eae
typischer EPEC	eae + eaf
EAEC	pCVD432
ETEC	st, lt, st+lt
EIEC	ipaH (+ Shigellenausschluß)
EHEC	slt1, slt2, slt1+slt2, eae+slt1/slt2 (+ Shigellenausschluß bei slt1)

## 2.8 Bakterienstämme

Bakterienart	Bezeichnung
atyp. EPEC	klinisches Isolat Epeh
<i>Campylobacter jejuni</i>	klinische Isolate: TY 5026, 7556, 9761, 4269, 4708
<i>Citrobacter freundii</i>	ATCC 8090, klinische Isolate: 696, 22291, 21442
<i>E. coli</i>	ATCC 25922
EAEC	klinisches Isolat EA
EHEC	ATCC, klinische Isolate slt1 und slt2
EIEC	klinisches Isolat Ei
<i>Enterobacter cloacae</i>	klinische Isolate: 45273, 440, 21425, 47315, 46337
ETEC	klinische Isolate st und lt

<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 13883
<i>Proteus mirabilis</i>	ATCC 29906
<i>Salmonella enteritidis</i>	klinisches Isolat
<i>Salmonella Typhi</i>	klinisches Isolat
<i>Shigella sonnei</i>	ATCC 29930, klinisches Isolat TY 5443
typ. EPEC	klinisches Isolat EP
<i>Yersinia enterocolitica</i>	DSM 4780

## 2.9 Untersuchung klinischer Proben 2006

Um die lokale Prävalenz darmpathogener *E. coli* bzw. im Besonderen EPEC und EAEC besser einschätzen zu können und um gegebenenfalls diagnostische Empfehlungen treffen bzw. anpassen zu können, wurde die oben genannte Methode zur systematischen Untersuchung von Stuhlproben des hiesigen Patientengutes angewandt.

### 2.9.1 Auswahl der zu testenden Stuhlproben

Zwischen dem 1.1.2006 und dem 31.12.2006 wurden alle durch das Universitätsklinikum Düsseldorf in das Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf eingesandten Stuhlproben auf die entsprechend angeforderten Untersuchungen hin überprüft. Alle Stuhlproben, für welche regulär eine Untersuchung auf typische Durchfallerreger und Toxine, also *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Campylobacter* spp., *Clostridium difficile* Toxin, *Yersinia* spp. oder direkt darmpathogene *E. coli* angefordert war, wurden während des Untersuchungszeitraumes zusätzlich mittels PCR auf EPEC und EAEC getestet.

Die Untersuchung erfolgte pseudonymisiert und ohne Kenntnis der Einsenderdiagnose bzw. Krankengeschichte. Weitere Patientendaten wurden mit Ausnahme von einsendender Fachabteilung und Alter des Patienten ebenfalls weder registriert noch dokumentiert.

Bei mehreren Stuhlproben eines Patienten wurde nur die jeweils erste eingesandte Stuhlprobe getestet. Auf diese Weise konnten 1981 Proben von

ebenso vielen verschiedenen Patienten erfasst werden. Da jedoch insgesamt 371 Proben in der Kultur keinerlei Wachstum von *Enterobacteriaceae* zeigten, konnten letztlich nur 1610 Stuhlproben auf EPEC und EAEC getestet werden.

### **2.9.2 Verarbeitung der Proben**

Da der Einschluss zur Untersuchung mindestens die routinemäßig angeforderte Suche nach *Enterobacteriaceae* erforderte, konnte die entsprechend routinemäßig angelegte MacConkey-Agar-Platte bei positivem Wachstum bereits am Folgetag nach dem unter 2.1 angegebenen Protokoll weiterverwendet werden. Die Durchführung der *Realtime* PCR erfolgte jeweils, wenn genügend Proben angesammelt waren, um eine 96-well Platte im iCycler iQ™ System (Bio-Rad, Hercules, USA) zu bestücken.

### **2.9.3 Auswertung der Ergebnisse**

Die diagnostische Auswertung erfolgte nach den unter 2.7.2 genannten Kriterien. Es wurde nur auf EPEC und EAEC systematisch getestet, da die epidemiologische Fragestellung ihren Schwerpunkt auf die lokale Prävalenz dieser beiden Erreger legte, und da zu Beginn der Untersuchung zunächst lediglich der Multiplexansatz 1 mit den Zielsequenzen dieser beiden Erreger etabliert war. Bei positivem Ergebnis wurden die entsprechenden Proben jedoch nachträglich zusätzlich auf EHEC, ETEC und EIEC hin untersucht, um der Frage nach Mehrfachinfektionen nachzugehen.

Die letztendliche Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit Hilfe von softwaregestützter Tabellenkalkulation (Excel 2003, Version 11.0, Microsoft, USA)

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Entwicklung der multiplex *Realtime TaqMan*<sup>®</sup> PCR

Ausgehend von dem im Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene der Universität Düsseldorf bereits fest etablierten PCR-*Setup* zur Diagnostik von darmpathogenen *E. coli* war zunächst das Ziel, die Methode zu vereinfachen.

Um die bislang in 8 Einzelansätzen durchgeführte PCR kostengünstiger und in größerer Menge durchführen zu können, sollten verschiedene Primer- und SONDENSETS zusammengefasst werden (multiplex). Gleichzeitig erfolgte der Abgleich darüber, ob durch Variation oder Ausweitung der Zielgene eine höhere diagnostische Sensitivität erzielt werden könnte.

In Anbetracht der maximal möglichen Anzahl von 4 parallelen Amplifikationsreaktionen pro Ansatz wurde eine Aufteilung der Zielsequenzen nach Pathovaren in 3 unterschiedliche *Setups* vorgenommen. Ein Ansatz für EPEC und EAEC, ein zweiter für ETEC und EIEC, der dritte für EHEC. Da für die epidemiologische Fragestellung EPEC und EAEC im Vordergrund standen, wurde die PCR zunächst für diese beiden Spezies optimiert. Dennoch bestand der Anspruch, auch die Diagnostik für ETEC, EIEC und EHEC später im gleichen Sinne zu vereinfachen und zeitgleich durchführen zu können.

#### 3.1.1 Evaluation und teilweise Neudefinition der Zielsequenzen

Zum Zeitpunkt der PCR Weiterentwicklung zeigten sich in Bezug auf die diagnostische Wertigkeit unserer bestehenden Zielgene für EHEC [65], EIEC, ETEC und EAEC im *alignment* keine sinnvollen Alternativen, so dass diese belassen werden konnten. Hier bestand also im Verlauf lediglich die Schwierigkeit, die Sondenmarkierungen und die technischen Bedingungen der PCR an das multiplex *Setup* anzupassen. Für EPEC konnte, wie unter 2.5 genauer ausgeführt, bezüglich des Intimin-Gens ein deutlich besser an die genetische Heterogenität angepasstes Set aus 3 Primern und einer Sonde definiert werden.

### 3.1.2 Neugestaltung der TaqMan<sup>®</sup> Sonden im multiplex Ansatz

Da alle in den 8 Ausgangs-PCR genutzten TaqMan<sup>®</sup> Sonden FAM-markiert waren, und sich parallele Amplifikationen nicht durch unterschiedliche Fluoreszenzsignale identifizieren lassen würden, mussten die verschiedenen Sonden nun mit Reporter-Farbstoffen unterschiedlicher Emissionsspektren bestückt werden, um mehrere Amplifikationsprodukte getrennt voneinander nachweisen zu können.

Unter Beachtung der im iCycler (BioRad, Hercules, USA) vorhandenen Filter und der im letztendlichen Reaktionsansatz notwendigen Anzahl von jeweils 4 unterschiedlichen Fluoreszenzsignalen, fiel die Wahl auf die Kombination der Farbstoffe FAM, HEX, Cy5 und ROX. Da der vormals an allen Sonden verwendete *Quencher* TAMRA (Tetramethylrhodamin) selbst deutlich mehr fluoreszent ist als andere *Quencher*, wurde für die Parallelschaltung der PCR Reaktionen auch eine Anpassung der *Quencher* nötig. Sogenannte „*dark-quencher*“ emittieren selbst kein Licht und sind für die Detektion mehrerer Fluoreszenzsignale bzw. die gewählten Wellenlängen deutlich besser geeignet. Im hier beschriebenen *Setup* fiel die Wahl auf die *Quencher* BHQ1-3 (*Blackhole-Quencher*) und BBQ (*Blackberry-Quencher*) an den neuen, mit HEX, ROX oder Cy5 markierten Sonden.

Die Sonden für pCVD432 (EAEC), *It* (ETEC), *slt2* (EHEC) und für das *housekeeping*-Gen *tuf* im Kontroll-monoplexansatz blieben weiterhin FAM- und TAMRA-markiert. Die neuerdings mit dem Farbstoff Cy5 markierten Sonden für *eaf* (EPEC) und *ipaH* (EIEC) erhielten den *Quencher* BHQ-3. Die ROX-markierte Sonde für *eae* (EPEC) bekam herstellerbedingt den BBQ-*Quencher*, die anderen ROX-markierten Sonde für *st* (ETEC) und *slt1* (EHEC) wurden mit dem BHQ-2 *Quencher* versehen. Die zur Detektion der internen Kontrollplasmide verwendete Sonde ist mit HEX als Fluorophor und dem BHQ1-*Quencher* bestückt und wurde so belassen. Abbildung 2 zeigt schematisch die letztendliche Einteilung aller 8 diagnostischen Amplifikationsreaktionen in den drei verschiedenen multiplex PCR Ansätzen.

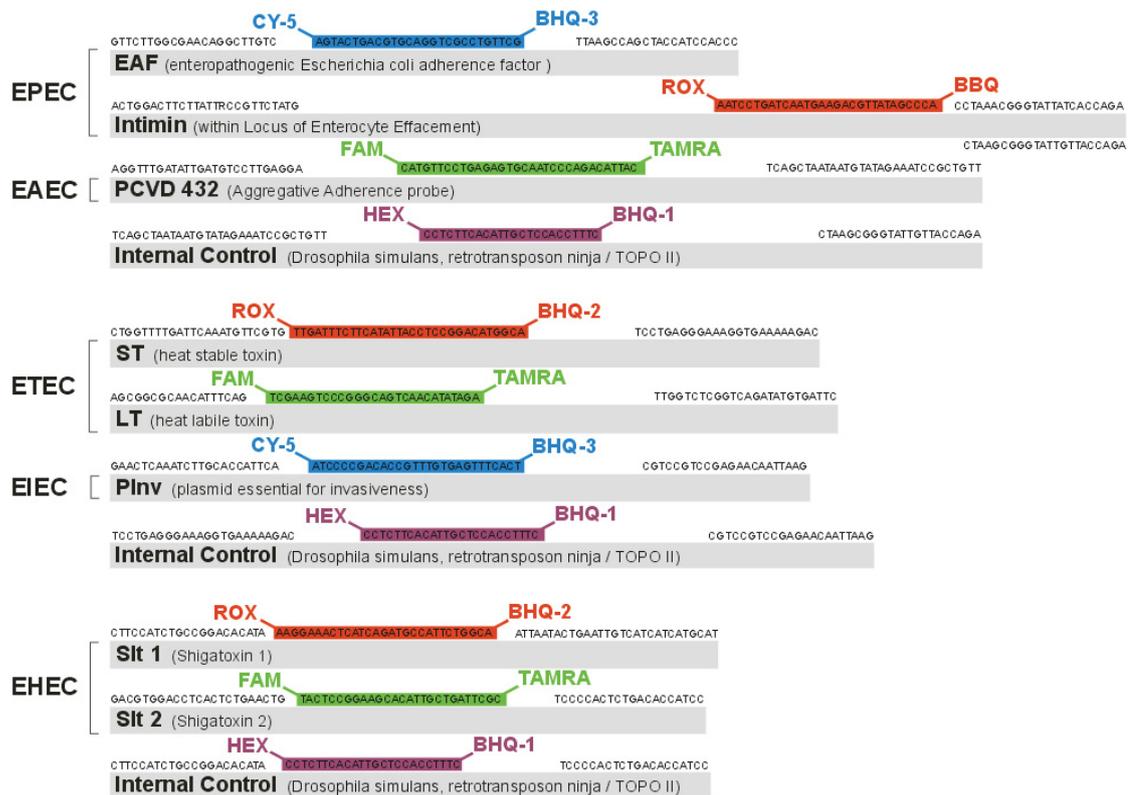


Abbildung 2: Schematische Darstellung der 3 multiplex *Realtime* PCR Setups zur Diagnostik darmpathogener *E. coli* inklusive der internen Kontrollen.

Multiplex 1 zur Detektion von EPEC und EAEC, Multiplex 2 zur Diagnostik von ETEC und EIEC, Multiplex 3 für EHEC. Graue Balken stellen das Zielgen der PCR Reaktion dar. Primersequenzen sind in *forward* und *reverse* Position angegeben. TaqMan® Sondensequenzen binden zwischen den Primerregionen und sind farblich nach unterschiedlichen Fluorophoren am 5' Ende markiert. Rot für ROX, Grün für FAM, Blau für Cy5 und Violett für HEX. Quencher sind am 3' Ende der Sonden eingezeichnet.

### 3.1.3 Integration der internen Inhibitionskontrolle

Eine interne Inhibitionskontrolle (IK) sollte in jedem Multiplexansatz mittels spezifischer Kontrollplasmide und der entsprechend komplementären TaqMan® Sonde wie unter 2.6 beschrieben erreicht werden.

Die in jedem Multiplexansatz zusätzliche Amplifikationsreaktion machte eine erneute Anpassung der Primer- und Sondenkonzentration nötig, um der Doppelfunktion derjenigen Primer Rechnung zu tragen, welche sowohl diagnostisch, als auch für die Inhibitionskontrolle relevant waren.

In der Austestung verschiedener Verdünnungsstufen der internen Kontrollplasmide zeigte sich, dass bei höherer Konzentration der Kontrollplasmide teils die diagnostischen Fluoreszenzsignale gegenüber dem Ansatz ohne interne Kontrolle beeinträchtigt waren. Sehr niedrig konzentrierte Plasmid-templates führten teils zu falsch negativen Ergebnissen und damit

fälschlich zur Annahme der Inhibition. Unter Verwendung von 100 Plasmidkopien pro Reaktionsansatz waren zuverlässig positive Signale mit einem Ct. Wert von unter 35 für die Inhibitionskontrolle in allen 3 Multiplexansätzen zu erzielen. Gleichzeitig kam es zu keinerlei Beeinträchtigung der diagnostischen Fluoreszenzsignale mehr, auch nicht, wenn alle diagnostischen *targets* gleichzeitig amplifiziert wurden.

#### **3.1.4 Testung der Sensitivität**

Im Vergleich zum vorbestehenden monoplex *Setup* zeigte die neu gestaltete multiplex PCR volle Übereinstimmung in Bezug auf die Detektion der gewählten Zielsequenzen bei allen laborinternen vorliegenden Isolaten und Positivkontrollen. Es bestand jedoch die Frage, ob bei der Vielzahl von Oligonukleotiden im gleichen Reaktionsansatz nach wie vor eine ausreichende Sensitivität zu erzielen war, insbesondere nach Hinzunahme der zusätzlichen Amplifikationsreaktion durch die interne Inhibitionskontrolle (IK).

Um auch bei der einfachen Aufbereitung des zu testenden DNA-Materials die Sensitivität der Methode untersuchen und mit dem monoplex Ansatz vergleichen zu können, wurden von allen Suspensionen der Positivkontrollen Verdünnungsreihen in 10er Schritten, ausgehend vom McFarland Standard 1,0 angefertigt, und sowohl im monoplex Ansatz als auch im neuen multiplex *Setting* untersucht. Zusätzlich wurde die entsprechende Verdünnung der vitalen Suspension vor Kochlyse ausplattiert und auf die Anzahl der KBE/2,5 µl (entspricht der jeweils pro PCR Ansatz eingesetzten Probenmenge) hin beurteilt. Tabelle 8 zeigt die Ct-Werte (diejenige Zykluszahl, bei welcher das Fluoreszenzsignal die errechnete Schwelle übertritt) für alle Zielsequenzen der multiplex PCR. Dargestellt ist der Vergleich der Ct-Werte von multiplex und monoplex PCR als Durchschnittswert von 4 identischen Testungen einer Verdünnungsreihe bis unter einer Genomkopie pro eingesetztem Testvolumen. Den Ct-Werten sind die Anzahl der tatsächlich in der Kultur nachgewiesenen Kolonien der jeweiligen Verdünnungsstufe gemittelt über 4 Testungen gegenübergestellt

Tabelle 8: Sensitivität der multiplex PCR im Vergleich zur monoplex PCR\*

KBE/2,5 µl	Ct-Wert Monoplex	Ct-Wert Multiplex
<b>EPEC (eae)</b>		
konf.	27,8	<b>27</b>
> 100	31,1	<b>31,2</b>
95,75	33,3	<b>32,4</b>
16,5	36,8	<b>38,5</b>
1,75	n	<b>40,4</b>
0	n	<b>n</b>

KBE/2,5 µl	Ct-Wert Monoplex	Ct-Wert Multiplex
<b>EPEC (eaf)</b>		
konf.	20,4	<b>22,2</b>
> 100	29	<b>31,7</b>
51,25	29,6	<b>31</b>
2,5	34,6	<b>35,7</b>
0,25	n	<b>39,6</b>
0	n	<b>n</b>

KBE/2,5 µl	Ct-Wert Monoplex	Ct-Wert Multiplex
<b>EAEC (pCVD432)</b>		
konf.	24,2	<b>23,6</b>
> 100	26,5	<b>26,4</b>
23,25	32	<b>23,7</b>
1,75	35,9	<b>35,8</b>
0	35,5	<b>38,2</b>
0	n	<b>n</b>

KBE/2,5 µl	Ct-Wert Monoplex	Ct-Wert Multiplex
<b>ETEC (st)</b>		
konf.	22,8	<b>22,3</b>
> 100	30,2	<b>29,3</b>
12,5	32,3	<b>34,3</b>
0,5	36,4	<b>38,6</b>
0	n	<b>38,2</b>
0	n	<b>n</b>

KBE/2,5 µl	Ct-Wert Monoplex	Ct-Wert Multiplex
<b>ETEC (lt)</b>		
konf.	21,6	<b>22,9</b>
> 100	28,8	<b>29,8</b>
> 100	29,5	<b>29,1</b>
35	36,4	<b>35,8</b>
3,25	34,9	<b>38,4</b>
0	n	<b>n</b>

KBE/2,5 µl	Ct-Wert Monoplex	Ct-Wert Multiplex
<b>EIEC (ipaH)</b>		
konf.	25,2	<b>25,8</b>
> 100	26,6	<b>29</b>
> 100	32	<b>31,8</b>
16,25	33,9	<b>34,7</b>
3,5	n	<b>38,2</b>
0	n	<b>n</b>

KBE/2,5 µl	Ct-Wert Monoplex	Ct-Wert Multiplex
<b>EHEC (slt 1)</b>		
konf.	28,1	<b>25,7</b>
> 100	28,2	<b>27,8</b>
22,75	32,3	<b>32,4</b>
2	35,8	<b>35,4</b>
0,5	n	<b>n</b>
0	n	<b>n</b>

KBE/2,5 µl	Ct-Wert Monoplex	Ct-Wert Multiplex
<b>EHEC (slt 2)</b>		
konf.	24,7	<b>24,1</b>
> 100	26,4	<b>28,5</b>
57,5	32,5	<b>32,2</b>
4,5	34,7	<b>38</b>
0,25	n	<b>n</b>
0	n	<b>n</b>

\* KBE: Kolonie bildende Einheiten / Ct-Wert: Zyklusanzahl, bei welcher das Fluoreszenzsignal die errechnete Schwelle aus dem Grundrauschen übertritt / n: kein positives Signal / konf.: konfluierendes Bakterienwachstum / alle Zahlen gemittelt über 4 Testungen

Erwartungsgemäß zeigte sich ein Anstieg der Ct-Werte mit zunehmender Verdünnung. Im Vergleich von multiplex und multiplex PCR unterschieden sich die Ct-Werte jedoch nur minimal bis gar nicht. Für eae, eaf, st und ipaH zeigte sich der multiplex-Ansatz sogar eine Verdünnungsstufe sensitiver. In keinem Fall war die Sensitivität der multiplex PCR schlechter als bei der multiplex Reaktion. Also zeigte sich der multiplex Ansatz der alten PCR gegenüber gleichwertig bzw. teilweise sogar sensitiver.

Aus der kulturellen Überprüfung der Pathogenkonzentration lässt sich sagen, dass die untere Detektionsgrenze der multiplex PCR bei unter 10 Kolonie bildenden Einheiten (KBE) bzw. 10 bakteriellen Genomsequenzen pro eingesetztem Testvolumen liegt.

### **3.1.5 Testung der Spezifität**

Bezüglich einer eventuellen Kreuzreaktivität mit anderen *Enterobacteriaceae* zeigte die PCR in der Testung mit den unter 2.8 genannten Bakterienstämmen ein positives Signal mit einem Stamm von *Shigella sonnei* (TY 5443). Dies ist bei hoher Sequenzhomologie des plnV zwischen EIEC und *Shigella spp.* zu erwarten und findet in der Form Beachtung, dass generell vor der Diagnose EIEC-positiv der konventionelle Ausschluss einer Shigelleninfektion erfolgen muss. Darüberhinaus zeigten sich keine weiteren falsch-positiven Fluoreszenzsignale.

### **3.1.6 Integration der multiplex PCR in die Routinediagnostik**

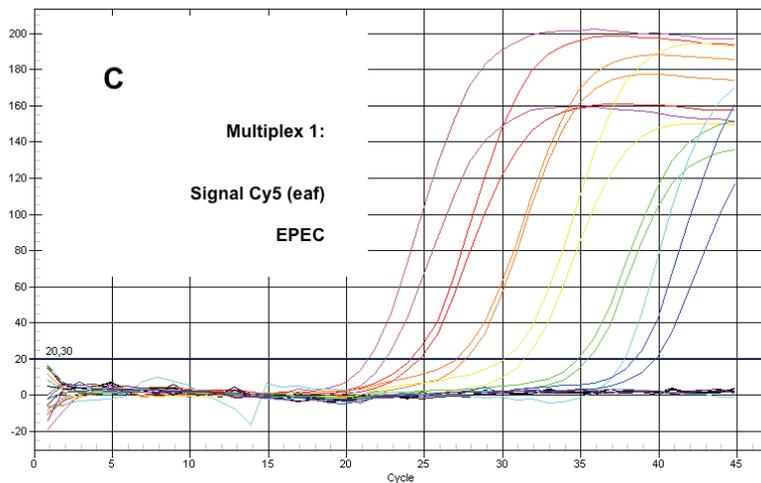
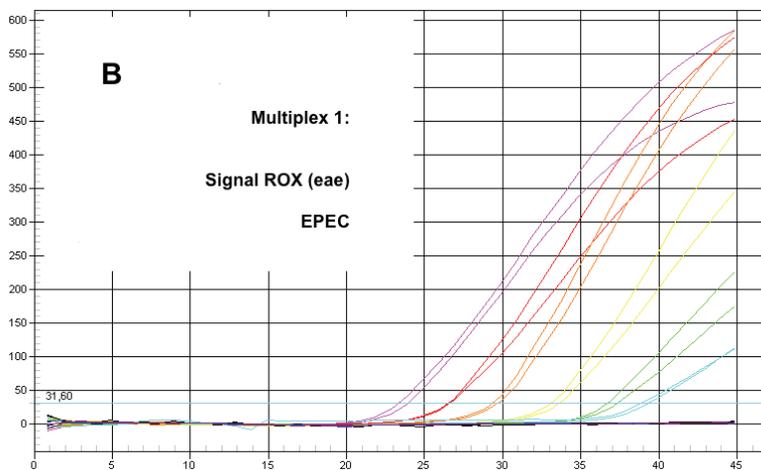
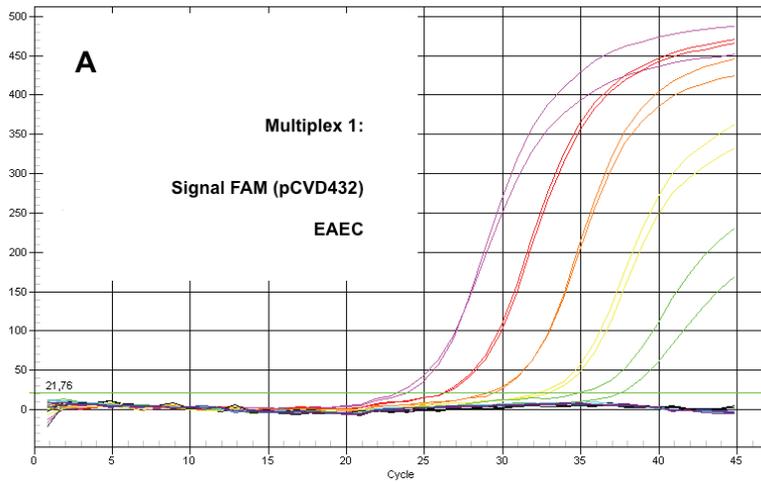
Neben der Nutzung für die unter 2.9 genannte systematische Untersuchung im Rahmen dieser Arbeit bestand der Anspruch, die weiterentwickelte PCR auch in der Routinediagnostik zur Anwendung zu bringen. Dies erforderte neben der in 3.1.4 und 3.1.5 beschriebenen Untersuchung der Sensitivität und Spezifität eine weitergehende Testung der PCR in Bezug auf Linearität und Präzision.

Es besteht eine umgekehrt proportionale, lineare Beziehung zwischen dem Logarithmus der eingesetzten Menge an nachzuweisender DNA und demjenigen Zyklus, bei welchem im Rahmen der exponentiellen

Vermehrungsphase des Amplifikationsproduktes das Fluoreszenzsignal die Detektionsschwelle überschreitet (Ct-Wert).

In der wiederholten Austestung einer wie unter 3.1.4 beschriebenen Verdünnungsreihe zeigte sich ein zuverlässiger, linearer Zusammenhang der gemessenen Ct-Werte mit der eingesetzten Menge an *template* bis zu einer Grenze von 15 Genomkopien. Abbildung 3 zeigt exemplarisch die Fluoreszenzsignale dieser Linearitätsprüfung aus dem Multiplexansatz 1 für EPEC (eae und eaf) und EAEC (pCVD432) getrennt nach den unterschiedlichen Fluorophoren

Die Präzision beschreibt die Reproduzierbarkeit von Ct-Werten (Cycle threshold) bei gleicher Menge zu testender DNA in wiederholten Reaktionen. Diesbezüglich zeigte sich bei 4 Testungen in allen PCR Reaktionen bis zur Verdünnungsstufe von 15 eingesetzten Genomkopien eine maximale Abweichung von 1,5 Zyklen. Auf der Verdünnungsstufe bis 1,5 Genomkopien pro Ansatz waren nur für It, slt1, slt2 und eaf reproduzierbar positive Signale zu verzeichnen und hierbei dann auch eine Abweichung von bis zu 3 Zyklen zwischen den wiederholt gemessenen Ct-Werten. In Abbildung 3 sind jeweils 2 Fluoreszenzsignale bei identischen Verdünnungsstufen aus dem Multiplexansatz 1 für eae, eaf und pCVD432 gleichfarbig dargestellt.



**Abbildung 3: Original iCycler® Amplifikationsprotokolle in der Mehrfachverdünnungsreihe für Multiplexansatz 1 (EPEC/EAEC) getrennt nach unterschiedlichen Fluoreszenzkanälen**

Die Amplifikation wurde wie unter 2.7.1 beschriebenen durchgeführt. Mehrfach wurden die Positivkontrollen in einer Verdünnungsreihe in 10er Schritten getestet (Genomkopien pro Testvolumen: Pink 150.000, Rot 15.000, Orange 1.500, Gelb 150, Grün 15, Hellblau 1,5, Dunkelblau 0,15). Die Abbildung zeigt exemplarisch die Reaktionen für Multiplex 1. Bild A zeigt selektiv die FAM Signale für pCVD432 (EAEC). Bild B zeigt die im gleichen Ansatz erhaltenen Signale für ROX, eae (EPEC). Bild C stellt die Cy5 Fluoreszenzsignale für eaf (typ. EPEC) dar.

### 3.2 Periodenprävalenz von EPEC und EAEC im Jahre 2006

Während des einjährigen Untersuchungszeitraumes (1.1.2006 – 31.12.2006) wurden insgesamt 1981 Stuhlproben aus dem Universitätsklinikum Düsseldorf nach den unter 2.9.1 genannten Kriterien für die systematische Untersuchung auf EPEC und EAEC ausgewählt.

Von diesen 1981 Proben zeigten 371 keinerlei Wachstum von *Enterobacteriaceae* in der Kultur. Gründe hierfür sind bei fehlender Kenntnis der Krankengeschichte nur zu vermuten. Die verbliebenen 1610 Stuhlproben bzw. Kulturen wurden mittels der beschriebenen PCR auf die Virulenzfaktoren für EPEC und EAEC hin untersucht.

Für EPEC zeigten sich insgesamt 144 (8,9 %) Proben positiv. Hiervon waren nur 7 Proben (4,9 %) positiv für eae und eaf, also als typische EPEC zu definieren. Mit 132 (91,7 %) nur für eae positiven Befunden war der atypische EPEC der bei weitem dominierende Typ in diesem Patientenkollektiv. Beachtenswert war, dass 5 Proben ausschließlich positiv auf eaf getestet wurden. Das Zustandekommen dieser Konstellation bleibt unklar. Keine der als EPEC befundeten Proben zeigte in der nachträglichen Testung ein positives Ergebnis für slt1 oder slt2, so dass ein fälschlich als EPEC bezeichneter EHEC ausgeschlossen werden konnte.

Für EAEC konnte mit 78 positiven Ergebnissen eine Prävalenz von 4,8 % im Gesamtkollektiv gefunden werden. 17 Proben waren gleichzeitig für EPEC und EAEC positiv.

Da zu Beginn der Untersuchung die PCR Diagnostik für ETEC, EIEC und EHEC noch nicht installiert war, können für diese Pathogene keine systematischen Zahlen genannt werden.

Von den 1610 untersuchten Proben waren für 1562 Fälle in der Routinediagnostik *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp. und *Shigella* spp. untersucht worden. Hierbei ergaben sich mit 38 *Salmonella* spp. (2,45 %) Fällen, 39 *Campylobacter* spp. (2,4 %) positiven Proben und 1 *Shigella* spp. (0,06 %) Nachweis deutlich niedrigere Prävalenzen als für EPEC und EAEC. Graphisch sind die Fallzahlen in Abbildung 4 miteinander verglichen.

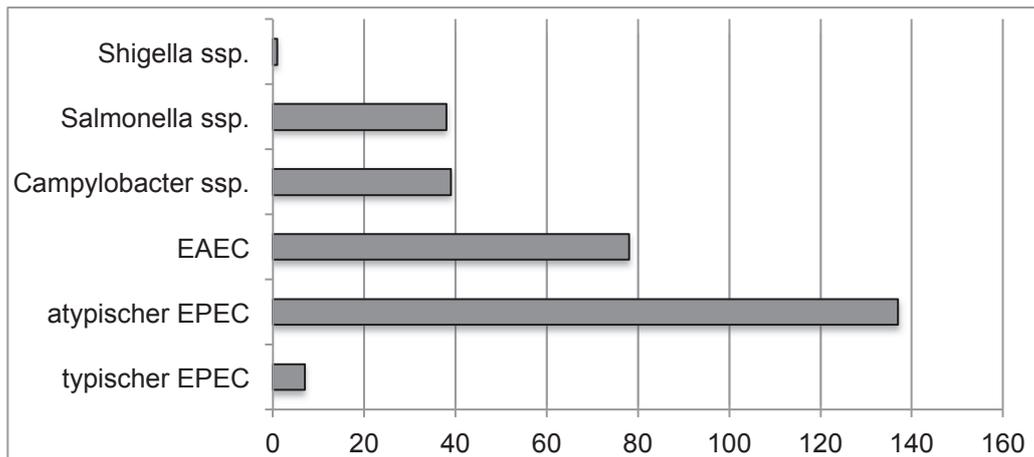


Abbildung 4: Anzahl positiver Nachweise für Salmonella, Shigella und Campylobacter im Vergleich zu EPEC und EAEC in Stuhlproben der Stationen des Universitätsklinikums Düsseldorf im Jahr 2006

### 3.2.1 Prävalenz von EPEC und EAEC nach Fachabteilungen

Um die heterogene Stichprobe in Hinblick auf die epidemiologische Fragestellung zu untergliedern, erfolgte eine Aufteilung nach den unterschiedlichen, einsendenden Fachabteilungen.

Eine erste Gruppe waren die Stationen der Kinderklinik, um der Bedeutung der bakteriellen Diarrhoe im Kindesalter Rechnung zu tragen. Eine zweite Gruppe waren alle eingesandten Proben aus der Tropenambulanz des Universitätsklinikums Düsseldorf, da hier eine entsprechende Reiseanamnese anzunehmen ist. Die dritte Gruppe bestand aus den übrigen Abteilungen.

Die kleinste Gruppe bestand aus 150 Proben aus der Tropenambulanz. Hier fand sich mit 28 EPEC (18,7 %) und 39 EAEC (26 %) eine relativ hohe Rate an positiven Befunden. Hiervon waren nur zwei Proben von Patienten unter 18 Jahren.

Aus der Kinderklinik wurden 458 Proben untersucht. Hiervon waren 49 (10,7 %) positiv für EPEC und 19 (4,1 %) positiv für EAEC.

Bei den verbliebenen 1002 Proben aus den übrigen Abteilungen fanden sich 67 (6,7 %) positiv für EPEC und 20 (2 %) für EAEC. Tabelle 9 zeigt die absoluten Fallzahlen und den prozentualen Anteil für EPEC und EAEC im Vergleich.

Tabelle 9: Anzahl getesteter Stuhlproben und Rate positiver Befunde für EPEC und EAEC nach Fachabteilungen

Abteilung	getestet	EPEC n (%)	EAEC n (%)
Tropenambulanz	150	28 (18,7)	39 (26,0)
Kinderklinik	458	49 (10,7)	19 (4,1)
Übrige Abteilungen	1002	67 (6,7)	20 (2,0)

### 3.2.2 Prävalenz von EPEC und EAEC nach Altersgruppen

Um die Prävalenz der darmpathogenen *E. coli* altersgruppenspezifisch zu zeigen, sind die Fallzahlen und prozentualen Anteile positiver Befunde für EPEC und EAEC in Tabelle 10 für unterschiedliche Altersgruppen aufgelistet.

Tabelle 10: Anzahl getesteter Stuhlproben und Rate positiver Befunde nach Altersgruppen für EPEC und EAEC

Altersgruppe (Jahre)	n	EPEC n (%)	EAEC n (%)
0 - 1	152	15 (9,9)	2 (1,3)
> 1 - 2	92	15 (16,3)	3 (3,3)
> 2- 3	55	5 (9,1)	8 (14,5)
> 3 -5	49	5 (10,2)	1 (2)
> 5 - 18	131	10 (7,6)	6 (4,6)
> 18 - 65	725	74 (10,2)	51 (7)
> 65	406	20 (4,9)	7 (1,7)
<b>gesamt</b>	<b>1610</b>	<b>144 (100)</b>	<b>78 (100)</b>

In Bezug auf EPEC wurde im Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene der Universität Düsseldorf routinemäßig jede Stuhlprobe von Kindern unter einem Jahr untersucht. Die größte Häufung zeigte sich in der hier dargestellten Untersuchung jedoch in der Altersgruppe der 1- bis 2-jährigen mit einer Prävalenz von 16,3 %. In der Gruppe der unter 1-jährigen sowie in den Gruppen von 2 bis 5 Jahren lag die Prävalenz etwas niedriger und variierte zwischen 9,9 % und 10,2 %. Ein ähnlicher und ungewöhnlich hoher prozentualer Anteil an positiven Befunden für EPEC fand sich zwar auch in der Gruppe der 18- bis 65-jährigen mit 10,2 %; von den hier gefundenen 74 Proben waren jedoch 26 Fälle (35,1 %) aus der Tropenambulanz, was eine positive Reiseanamnese wahrscheinlich macht. Mit Ausnahme einer Probe kamen aus

der Gruppe der Patienten unter 18 Jahren keine EPEC positiven Befunde aus der Tropenambulanz.

Für EAEC zeigte sich mit einer Prävalenz von 14,5 % eine deutliche Spitze in der Gruppe der 2- bis 3-jährigen. Eine weitere Häufung zeigte sich erneut in der Gruppe der 18- bis 65-jährigen mit 7,0 %; jedoch war hier mit 36 von 51 Proben (70,6 %) der Anteil der Proben aus der Tropenambulanz noch einmal höher als für die EPEC positiven Befunde. In der Altersgruppe von 5 bis 18 Jahren kam eine, und in der Altersgruppe über 65 Jahre kamen 2 positive Proben aus der Tropenambulanz. In der Gruppe der Kinder unter 5 Jahren kamen auch für EAEC positive Befunde keine Materialien aus der Tropenambulanz.

Abbildung 5 zeigt die Prävalenzen von EPEC und EAEC im Vergleich in den unterschiedlichen Altersgruppen.

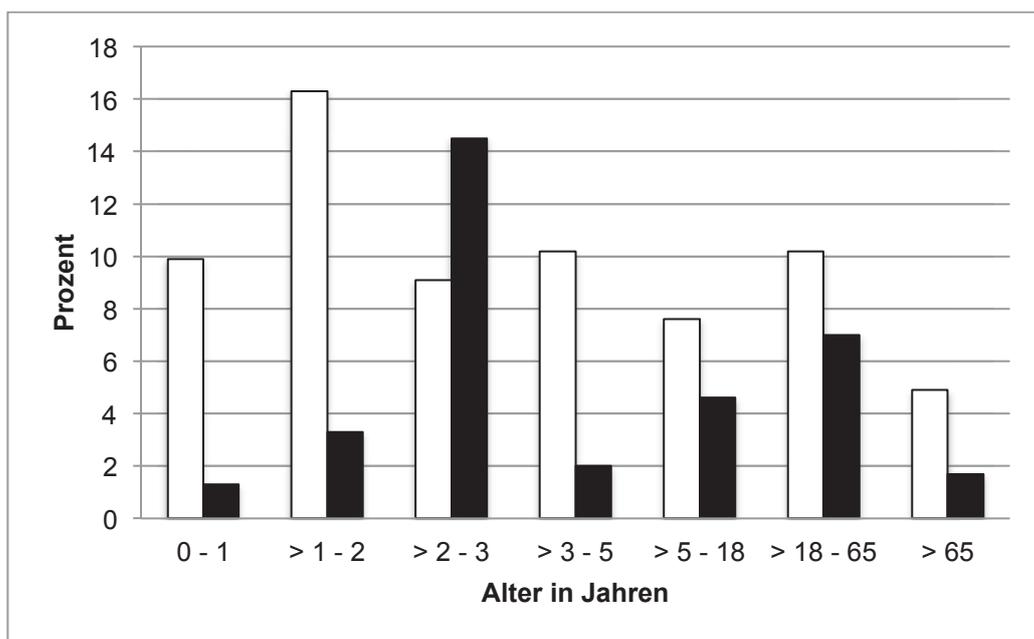


Abbildung 5: Prozentualer Anteil von positiv getesteten Stuhlproben für EPEC (weiße Balken) und EAEC (schwarze Balken) nach Altersgruppen eingeteilt.

### 3.2.3 Mehrfachinfektionen verschiedener darmpathogener *E. coli*

Wie bereits erwähnt war ein systematisches Screening nur auf EPEC und EAEC möglich, so dass für ETEC, EIEC und EHEC keine Prävalenzen angegeben werden können. Archiviertes Untersuchungsmaterial der für EPEC

und / oder EAEC positiven Proben wurde jedoch retrospektiv mit der Frage nach Mehrfachinfektionen auch auf die übrigen 3 Pathovaren hin untersucht. Von den 205 für EPEC und / oder EAEC positiven Stuhlproben zeigten sich nach Überprüfung mit dem gesamten Bündel der diagnostischen PCR für alle Pathovaren in 33 Fällen mehrfach positive Befunde. Tabelle 11 zeigt die Häufigkeit der Kombinationen.

Tabelle 11: Häufigkeit von Kombinationen mehrfach positiver Nachweise für darmpathogene *E. coli* nach Fachabteilungen gegliedert

Kombination	n	Tropenambulanz	Kinderklinik	übrige Abteilungen
EPEC + EAEC	15	7	3	5
EAEC + ETEC	7	6	1	
EPEC + ETEC	4	3	1	
EAEC + EHEC	1		1	
EPEC + EIEC	1	1		
EPEC + EAEC + ETEC	2	2		
EAEC + ETEC + EHEC	2	2		
EAEC + ETEC + EIEC	1	1		
<b>gesamt</b>	<b>33</b>	<b>22 (66,7%)</b>	<b>6 (18,2%)</b>	<b>5 (15,1%)</b>

Mit 22 (66,7 %) Fällen wurde der Großteil der mehrfach positiven Befunde in Stuhlproben aus der Tropenambulanz gefunden. Die häufigste Kombination war hier mit 7 Fällen EPEC und EAEC, direkt gefolgt von 6 Proben mit EAEC und ETEC sowie 4 Proben mit EPEC und ETEC. In jeweils einer Probe wurde zusätzlich EHEC oder EIEC gefunden. Dreifachkombinationen waren mit 5 Proben insgesamt eher selten und kamen nur bei Patienten aus der Tropenambulanz vor.

In 5 Fällen, die nicht aus der Kinderklinik oder der Tropenambulanz kamen, wurde eine Kombination aus EPEC und EAEC gefunden. Andere Kombinationen kamen in dieser Gruppe nicht vor.

In den 6 Proben aus der Kinderklinik (18,2%) war mit 3 Fällen ebenfalls die Kombination aus EPEC und EAEC allein die häufigste. In zwei Proben wurde zusätzlich ein ETEC gefunden, in einem Fall war zusätzlich der EHEC Nachweis positiv.

### 3.2.4 Routinediagnostik im Vergleich zur systematischen Untersuchung

Im Laufe der systematischen Untersuchung aller Stuhlproben fiel auf, dass abseits der automatischen EPEC-Testung aller Stuhlproben von Kindern unter einem Jahr die Untersuchung auf darmpathogene *E. coli* vergleichsweise selten durch die Fachabteilung angefordert wurde. Tabelle 12 zeigt, nach Altersgruppen gegliedert, den Anteil derjenigen EPEC- und EAEC-positiven Proben, welcher durch eine klinisch motivierte, spezifische Anforderung der Untersuchung auf darmpathogene *E. coli* gefunden wurde im Vergleich zu allen positiven Befunden der systematischen Untersuchung.

Tabelle 12: Anteil der durch Routinetestung diagnostizierten EPEC und EAEC an der Gesamtmenge der positiven Befunde der systematischen Untersuchung

Altersgruppe (Jahre)	EPEC gesamt	Routineanfrage	EAEC gesamt	Routineanfrage
0 - 1	15	15 (100%)	2	-
> 1 - 5	25	-	12	-
> 5 - 18	10	1 (10%)	6	1 (16,7%)
> 18 - 65	74	16 (21,6%)	51	15 (29,4%)
> 65	20	-	7	2 (28,6%)

Bei Kindern unter einem Jahr besteht auf Grund der standardmäßigen Untersuchung auf EPEC volle Übereinstimmung zwischen der Routinediagnostik und der systematischen Untersuchung. Darüber hinaus wäre bis zu einem Alter von 5 Jahren keiner der systematisch gefundenen EPEC-Fälle durch eine regulär angeforderte Diagnostik detektiert worden. Von den insgesamt 17 positiven EPEC Testungen durch Routineanforderung oberhalb des Alters von 5 Jahren waren 12 Testungen durch die Tropenambulanz beauftragt.

Für EAEC wäre bis zu einem Alter von 5 Jahren keiner der gefundenen Fälle durch eine klinisch motivierte Diagnostik erfasst worden. Oberhalb der Altersgrenze von 5 Jahren waren wiederum mit einer einzigen Ausnahme alle der 18 regulär diagnostizierten Proben durch die Tropenambulanz eingesandt.

Dies zeigt, dass die routinemäßige Diagnostik von darmpathogenen *E. coli*, wenn nicht durch vereinbarte Standarddiagnostik bei kleinen Kindern, nahezu

ausschließlich durch die Tropenambulanz angefordert wird. Dennoch ist auch hier die Trefferquote noch relativ gering. So wurden von den 28 systematisch gefundenen EPEC-positiven Proben aus der Tropenambulanz insgesamt nur 12 (42,8 %) durch von der Tropenambulanz angeforderte Diagnostik gefunden. Für EAEC ist die entsprechende Trefferquote mit 17 (43,6 %) von 39 Fällen ähnlich niedrig.

### **3.2.5 Co-Infektionen**

Leider können im Rahmen dieser Untersuchung keine vollständigen Aussagen bezüglich einer möglicherweise gleichzeitig vorhandenen viralen Infektion gemacht werden, da nur Stuhlproben aus dem bakteriologischen Labor eingeschlossen wurden. Jedoch sind für die Gruppe der unter 18-jährigen Patienten einige der systematisch erfassten Stuhlproben auch der virologischen Diagnostik unterzogen worden. So wurde in dieser Altersgruppe bei 16 von 40 EPEC positiven Fällen Rota-, Noro- oder Adenovirus nachgewiesen. Zusätzlich waren 3 Proben ebenfalls positiv für *Campylobacter* spp. und in einem Fall fand sich zusätzlich *Salmonella* spp. Daraus folgt, dass in 20 Proben (50 %) EPEC das einzig nachgewiesene Pathogen war. Von 16 zufällig ebenfalls virologisch getesteten EAEC positiven Proben waren 5 zusätzlich positiv für Rota-, Noro- oder Adenovirus. Auch hier wurden 3 *Campylobacter* spp. und einmal *Salmonella* spp. gefunden, so dass EAEC in dieser Gruppe in 7 (45 %) Fällen das einzige nachgewiesene Pathogen war.

## 4 Diskussion

### 4.1 Schwierigkeiten der Diagnostik darmpathogener *E. coli*

Die Diagnostik der verschiedenen Pathovaren darmpathogener *E. coli* in der klinischen Routine ist schwierig und aufwändig. Bis heute existiert kein allgemeingültiger Standard, wie eine entsprechende Diagnostik durchgeführt werden sollte. Eine selektiv-kulturelle Diagnostik ist aufgrund der fehlenden phänotypischen Eigenschaften zwischen den verschiedenen virulenten Gruppen nicht möglich. Die oftmals geforderte Serotypisierung mittels O- und H-Antigenen zeigt vielfach gute Korrelationen der unterschiedlichen Typen zu definierten Serogruppen, kann jedoch keine eindeutige Identifikation der Pathovaren gewährleisten [66]. Als Folge wird die Diagnostik darmpathogener *E. coli* mittlerweile größtenteils über molekularbiologische Detektionsmethoden betrieben [1], befindet sich jedoch weiterhin ständig in Entwicklung. Beispielsweise zeigte sich in einer Untersuchung in Deutschland 2003 eine Überlegenheit der PCR Diagnostik für EPEC mittels Detektion des Intimin-Gens gegenüber der Serotypisierung [40].

Angesichts der unterschiedlichen und nicht standardisierten diagnostischen Methoden müssen auch entsprechend berichtete Fallzahlen, beispielsweise des RKI, mit Vorsicht hinsichtlich ihrer Vergleichbarkeit interpretiert werden [6]. Dies hat auch dazu geführt, dass, mit Ausnahme der EHEC Erkrankungen, seit 2015 die Fälle anderer darmpathogener *E. coli* trotz Meldepflicht vom RKI nicht mehr gesondert statistisch ausgewiesen werden [67]. Dennoch besteht kein Zweifel daran, dass diese Pathogene in bestimmten Patientenkollektiven eine hohe Krankheitslast verursachen, und dass unter bestimmten Bedingungen eine entsprechende Testung durchgeführt werden soll [16].

Seit den 90er Jahren wurde die PCR-Methode zur Detektion von für Virulenzfaktoren kodierenden Genabschnitten kontinuierlich weiterentwickelt und an die Bedürfnisse der modernen Diagnostik angepasst. Trotz technischer Verfügbarkeit ist die Implementierung in die Routinediagnostik zumindest in Deutschland aber noch mangelhaft. In einer Evaluation in Deutschland 2011 zeigte sich, dass lediglich 46-56% der Untersuchungen auf darmpathogene *E. coli* Nukleinsäureamplifikationsverfahren nutzen [6]. Gleichzeitig besteht

jedoch Konsens, dass diese Technik zur Diagnostik der verschiedenen Pathovaren mittlerweile unverzichtbar geworden ist [16].

## 4.2 Weiterentwicklung der PCR Methode

Seit den Anfängen der molekulargenetischen Testung auf darmpathogene *E. coli* existieren vielfältige Berichte über PCR Methoden, welche oft auch im Multiplexverfahren eine große Anzahl verschiedener Virulenzfaktoren nachweisen und hierüber eine Zuordnung zu den unterschiedlichen Pathovaren erreichen [45]–[48], [68]. Nahezu ausschließlich beruhen diese Verfahren jedoch auf klassischer Amplifikation mittels zweier Primer und anschließender Gelelektrophorese. Dies ist ein sehr zeit-, arbeits- und damit kostenintensives Verfahren, welches, insbesondere im diagnostischen Labor, die Gefahr der Kontamination im Rahmen der post-PCR Verarbeitung birgt.

Das Prinzip der *Realtime* PCR hingegen kann als schnelles Verfahren ohne weitere post-PCR-Verarbeitung innerhalb weniger Stunden Ergebnisse erzielen und ist so deutlich besser in einen zügigen Ablauf der Routinediagnostik einzufügen. Zum Zeitpunkt dieser Arbeit war das *Realtime* Prinzip nur von Bischoff et al. [69] angewandt worden, um darmpathogene *E. coli* zu detektieren. Die Autoren nutzten das LightCycler<sup>®</sup> SYBR Green Format, welches auf einer unspezifischen Anlagerung des Farbstoffs an Doppelstrang-DNA beruht. Zusätzlich waren mehrere verschiedene Amplifikationsdurchläufe zur Detektion von allen relevanten Targets nötig, so dass nicht von einer echten multiplex PCR gesprochen werden kann [69]. Meiner Kenntnis nach zeigte die hier beschriebene PCR zum ersten Mal die Anwendung des TaqMan<sup>®</sup> *Realtime* Prinzips mit spezifischer Sonde für jedes *target* als multiplex PCR zur Diagnostik darmpathogener *E. coli*.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Weiterentwicklung zur tatsächlichen multiplex-Reaktion mit nur einer Amplifikationsphase und einem Temperaturprotokoll für alle *targets* bedeutet einen großen Zeit-, Material- und Kostenvorteil. So konnten z.B. die Kosten für einen diagnostischen Ansatz im Vergleich zur vorbestehenden monoplex PCR um die Hälfte reduziert werden.

Die hier beschriebene PCR-Technik erfordert zunächst eine kulturelle Anzucht der Bakterien über Nacht, was eine möglicherweise vermeidbare Verzögerung des Ergebnisses bedeutet. Eine weitere Steigerung der diagnostischen Geschwindigkeit wäre in diesem Zusammenhang, wie andernorts beschrieben [70], durch unmittelbare Aufreinigung von bakterieller DNA aus nativen Stuhlproben zu erreichen. Dies wäre noch schneller und würde grundsätzlich einer Weiterentwicklung der Methode hin zum quantitativen Verfahren Vorschub leisten. Da in der Diagnostik von Durchfallerregern eine tatsächliche Beurteilung jedoch immer im Zusammenhang mit der klinischen Präsentation erfolgen muss und nicht direkt von der Pathogenlast abhängig ist, würde eine quantitative Erregerbestimmung keinen relevanten diagnostischen Vorteil bedeuten. Also wurde zugunsten der Einfachheit und Kosteneffektivität der Methode auf eine weitere Testung der direkten DNA-Aufreinigung aus Stuhl verzichtet. Aktuell wird darüberhinaus auch noch der kulturelle Ausschluss einer Shigelleninfektion im Falle der Diagnose EIEC oder EHEC erforderlich, so dass der zeitintensive Schritt der kulturellen Anzucht aus mehreren Gründen noch sinnvoll ist.

Durch die erfolgreiche Integration von direkten internen Positivkontrollen in jeder einzelnen Reaktion mittels speziell synthetisierter Kontrollplasmide konnte der Gefahr einer unbemerkten Inhibition mit falsch negativen Ergebnissen erfolgreich begegnet werden. Dies stellt eine bislang nicht beschriebene technische Neuerung für die PCR gestützte Diagnostik darmpathogener *E. coli* dar und erhöht angesichts der einfachen Aufbereitung des zu testenden Probenmaterials die diagnostische Sicherheit deutlich.

### **4.3 Auswahl von PCR Zielsequenzen**

Molekularbiologische Diagnostik mittels PCR kann immer nur nach spezifischen, in der DNA des zu testenden Materials vorliegenden Sequenzen suchen. Unter der Annahme, dass die entsprechende Gensequenz für einen möglichst spezifischen Virulenzfaktor einer Bakterienspezies kodiert, können so diagnostische Rückschlüsse gezogen werden. Bei diesem Prinzip besteht immer das Problem, dass das Vorhandensein eines Virulenzfaktors nicht zwingend einen Beweis für das Vorhandensein eines bestimmten Bakteriums

oder gar seiner tatsächlichen Pathogenität darstellen muss. Je heterogener eine Bakterienspezies ist, desto schwieriger wird eine derartige Diagnostik.

Wie bereits dargelegt, ist die Auswahl der Zielsequenzen für darmpathogene *E. coli* nicht unproblematisch. Insbesondere für EAEC wird eine sehr heterogene Virulenzfaktorverteilung beobachtet [35], [71]. Der Vergleich mit der als Goldstandard geltenden diagnostischen Methode des Adhärenzmusters im HEP-2 Zell-Assay [27] zeigt, dass weder mit molekulargenetischen Methoden noch mit phänotypischer Diagnostik alle entsprechenden Stämme erfasst werden können. Seit der Erstbeschreibung 1984 [72] bzw. der ersten Testung einer Genomsequenz des *aggregative adherence plasmids* (pCVD432) [33], [34], wurden vielfältige Genomsequenzen als Ziele zur PCR Diagnostik hinsichtlich ihrer Relevanz gegenüber dem Goldstandard, dem HEP-2-Zell-Adhärenz-Essay, überprüft [73]–[75]. Bei durchweg unbefriedigender diagnostischer Aussagekraft der Alternativen besitzt pCVD432 nach wie vor die höchste Aussagekraft in Hinblick auf sowohl diagnostische Sensitivität wie auch pathogene Relevanz [42]. Cohen et al. fanden sogar die Identifizierung über pCVD432 besser mit einer tatsächlichen Pathogenität des EAEC korreliert als der HEP-2 Zell-Assay [5]. Deshalb wurde dieses *target*, wie vorbestehend, in unserer PCR beibehalten. Eine bessere Sensitivität wäre nur in Kombination mit einem weiteren Genlocus zu erreichen, welcher für ein hitzestabiles Toxin codiert (EAST1) [76], [77]. Da diesbezüglich jedoch die pathogene Bedeutung in Frage gestellt werden muss, und eine Abgrenzbarkeit zu anderen Spezies verloren geht [78], wurde auf eine entsprechende Erweiterung dieser PCR verzichtet.

Ähnlich zeigt sich die Situation für die sehr heterogene Gruppe der EPEC. Bei der großen Vielfalt an Intimin-Varianten (siehe Kapitel 3.1.1) ist trotz aller Sorgfalt und bestmöglicher Primer- und Sondenauswahl anhand des *multi-sequence-alignments* sicherlich davon auszugehen, dass nicht alle EPEC detektiert werden können. Bemerkenswert war an dieser Stelle, dass in der systematischen Untersuchung klinischer Proben bei 5 Fällen einzig ein Signal für eaf gefunden wurde. Diese Konstellation ist so bislang nicht beschrieben und könnte auf eine ausbleibende Amplifikation für eae auf Grund der hohen

Variabilität des Intimin-Gens hindeuten. Alternativ käme ein Erwerb des eaf-Plasmids durch andere Bakterienspezies in Frage.

#### **4.4 Sensitivität und Spezifität**

Hinsichtlich der technischen Sensitivität der PCR zeigte sich im Rahmen dieser Arbeit eine gute und reproduzierbare Detektionsgrenze von unter 10 Genomkopien pro eingesetztem Testvolumen. Eine ähnliche Sensitivität erreichen auch neuere *Realtime* PCRs [79]. Hinzu kommt die Tatsache, dass hier eine Suspension aller Kolonien der kulturellen Anzucht untersucht wird. Dies steigert sicherlich im Vergleich zur oftmals beschriebenen selektiven Untersuchung einzelner Kolonien erneut die Sensitivität, führt jedoch auch dazu, dass keine Rückverfolgung zu einem bakteriellen Stamm in der Kultur erfolgen kann. In der Folge sind dementsprechend weitere Typisierungen oder Testungen eines bakteriellen Klons nicht möglich.

Dies führt zu einer weiteren Schwierigkeit. Die diagnostische Sensitivität beruht auch auf der Auswahl der in der PCR verwendeten Zielsequenzen. Die Sensitivität und Spezifität entsprechender *targets* muss grundsätzlich gegenüber einer Referenzmethode, einem „Goldstandard“, überprüft werden. Dies war hier leider nicht möglich, so dass die Sensitivität und Spezifität lediglich im Vergleich zur vorbestehenden und in der diagnostischen Routine fest etablierten monoplex PCR überprüft werden konnten. Angesichts der Verwendung gut bekannter und dokumentierter Zielsequenzen ist dies jedoch ein praktikables und verbreitetes Vorgehen [69].

#### **4.5 Untersuchung klinischer Proben im Jahre 2006**

Bezüglich der Bedeutung von EPEC und EAEC als Durchfallerreger gibt es zahlreiche Untersuchungen, welche den Stellenwert untermauern und auf mögliche, schwerwiegende klinische Manifestationen bzw. prädisponierte Altersgruppen hindeuten [80]. Diese Untersuchungen zeigen jedoch größtenteils Zahlen aus Entwicklungsländern. Für Industrieländer und insbesondere Deutschland sind nur wenige Daten verfügbar [42]. Daher war die

Frage nach der lokalen Prävalenz von EPEC und EAEC am Universitätsklinikum Düsseldorf ins Zentrum dieser Arbeit gerückt.

In der Statistik gemeldeter Fälle von Darmerkrankungen des Robert Koch Institutes für den Zeitraum der hier beschriebenen Untersuchung zeigte sich die Gruppe darmpathogener *E. coli* (exklusive EHEC) mit 6429 Fällen deutschlandweit als fünftgrößte Gruppe von Erregern nach Noro- und Rotaviren sowie Salmonellen- und *Campylobacter*-Erkrankungen [81]. Dieses Verhältnis präsentiert sich in der hier beschriebenen Arbeit anders. Mit 8,9 % EPEC positiven und 4,8 % EAEC positiven Proben fanden sich diese beiden Erreger deutlich öfter als *Salmonella* spp. (2,45 %), *Campylobacter* spp. (2,4 %) oder gar *Shigella* spp. (0.06 %) im gleichen Zeitraum für die gleiche Kohorte.

In einer Untersuchung in Berlin 2004 zeigte sich für EAEC mit 10,2 % eine sogar noch deutlich höhere Prävalenz. Allerdings war dort eine wesentlich kleinere Kohorte, ausschließlich aus Kindern bestehend, untersucht worden, welche teils eine Reiseanamnese angaben [70]. Huppertz et al. [42] fanden 1997 in Würzburg in einer Gruppe aus 798 Kindern unter 5 Jahren eine Prävalenz von 2 % für EAEC. Ähnliches zeigt eine Untersuchung in der Schweiz von Pabst et al. [43], hier jedoch wieder mit einer eindeutigen Reiseanamnese assoziiert. Nataro et al. fanden in den USA in einer Kohorte von 823 Probanden EAEC mit 4,5 % sogar als häufigstes Pathogen [4]. Hier bestand kein Zusammenhang mit einer bestimmten Altersgruppe, sondern EAEC war im gesamten Patientenkollektiv über alle Altersgruppen mit Diarrhoe assoziiert [4].

Die in der hier zusammengefassten Arbeit gefundene Vergleichs-Prävalenz für EAEC in der Altersgruppe unter 5 Jahren befindet sich also mit 14 von 348 Fällen (4,0 %) in etwa im Spektrum der berichteten Häufigkeiten in geographischen Regionen mit vergleichbarem sozioökonomischem Status.

Nach den in der hiesigen Studie vorliegenden Informationen kann eine Reiseanamnese zwar nicht sicher ausgeschlossen werden, muss aber in keinem der Fälle in der Subgruppe von unter 5 jährigen vermutet werden.

In Bezug auf die oftmals gezogene Altersgrenze von jünger als 1 oder 2 Jahren für besonders betroffene Altersgruppen fällt auf, dass die größte Häufung der

EAEC Fälle in unserer Untersuchung mit 14,5 % in der Altersgruppe zwischen 2 und 3 Jahren und damit darüber lag.

Für EPEC fand sich mit insgesamt 144 Proben (8,9 %) eine unerwartet hohe Prävalenz. Für die Subgruppe der unter 5 jährigen waren sogar 40 von 348 (11,5 %) positiv, mit einer deutlichen Häufung in der Altersgruppe zwischen 1 und 2 Jahren (16,3 %). Ähnliches konnte 2001 in Norwegen gezeigt werden [66]. Analog der Ergebnisse dieser Arbeit in Düsseldorf fanden Afset et al. bei Kindern unter 2 Jahren EPEC mit einer Prävalenz von 10 % als häufigstes Pathogen, ebenfalls häufiger als *Campylobacter* spp. oder sogar Rotaviren [66]. Auch in Frankreich konnte bei Kindern unter 2 Jahren EPEC mit 10,7 % als häufigstes Pathogen gefunden werden [82].

Beachtenswert war, dass von allen in der hier zusammengefassten Untersuchung gefundenen EPEC nur 7 Proben als typischer EPEC definiert werden konnten. Die große Masse der EPEC (95,1 %) wurde als atypischer EPEC (eae+, eaf-) gefunden. Ähnliches konnten Afset et al. in Norwegen [66], Foster et al. in den USA [83], Keskimäki et al. in Finnland [84] und Prère et al. in Frankreich [82] zeigen. Kozub-Witkowski et al. konnten 2003 das deutliche Überwiegen des atypischen EPEC mit 91 von 92 Proben auch für Deutschland zeigen [40].

Zumeist wird der typische EPEC tatsächlich eher in Entwicklungsländern gefunden, wohingegen der atypische EPEC in den industrialisierten Nationen der vorherrschende Typ zu sein scheint [85]. Jedoch wurde neuerdings auch in Entwicklungsländern ein Anstieg der atypischen EPEC berichtet [86]. Bezüglich der tatsächlichen Pathogenität des atypischen EPEC herrscht Uneinigkeit [87], [88], jedoch zeigen auch hier mehrere Berichte, dass auch der atypische EPEC mit einem klinischen Erkrankungsbild und insbesondere mit prolongierter Diarrhoe verbunden ist [5], [36], [66], [84].

An dieser Stelle zeigt sich eine deutliche Limitierung dieser Untersuchung. Nur auf Grund der Fragestellung nach mindestens einem für Durchfallerkrankungen typischen Erreger wurden die Stuhlproben weiter systematisch untersucht. Es bestand keinerlei Kenntnis der klinischen Symptomatik oder der Krankengeschichte. Eine Korrelation zu Art und Ausmaß der Durchfallerkrankung ist so also nicht möglich. Ebenfalls in Hinblick auf eine

Reiseanamnese lässt die hier beschriebene Untersuchung keine wirklich differenzierten Schlussfolgerungen zu. Jedoch ergeben sich über die einsendende Fachabteilung Hinweise auf Anamnese oder spezielle Patientengruppen.

Einen großen Anteil der für EPEC und EAEC gefundenen Fälle in der Altersgruppe über 18 Jahre machten in dieser Arbeit die Proben aus der Tropenambulanz aus; 28 von 150 (18,7 %) für EPEC und mit 39 von 150 (26 %) noch mehr für EAEC. Die Untersuchungen aus dieser Fachabteilung sind im allgemeinen im Zusammenhang mit einer Reiseanamnese zu sehen. Vergleichbare Zahlen für EAEC wurden mit einer Prävalenz von 10,2 % bis zu 33 % in den Niederlanden, Spanien und den USA und Kanada berichtet [89]–[91].

Als häufigster Erreger der Reisediarrhoe wird mit 40-75 % der Fälle im allgemeinen der enterotoxische *E. coli* (ETEC) angegeben [16]. Die oben genannten Untersuchungen aus den Niederlanden, Spanien, den USA und Kanada zur Reisediarrhoe untermauern dies [89]–[91]. In allen 3 Studien war ETEC der häufigste nachgewiesene Erreger, allerdings jeweils dicht gefolgt von EAEC.

Die hier beschriebene Untersuchung von Proben aus Düsseldorf bestätigt zwar die Zahlen für EAEC, kann jedoch leider keine systematische Aussage zur Prävalenz von ETEC im Zusammenhang mit einer Reiseanamnese machen, da nur EPEC und EAEC positive Proben retrospektiv auch auf die anderen darmpathogenen *E. coli* inklusive ETEC getestet wurden. Hierbei zeigte sich jedoch, dass in 14 der 39 EAEC positiven Proben aus der Tropenambulanz zusätzlich ETEC nachweisbar war. Dies deutet zum einen auf eine möglicherweise höhere Prävalenz von ETEC im Vergleich zu EAEC hin, findet jedoch auch Bestätigung in der Form, dass auch in den genannten Studien [89]–[91] EAEC häufig mit anderen Pathogenen, insbesondere ETEC, vergesellschaftet war.

Die hohe Prävalenz von EPEC in den Proben aus der Tropenambulanz des Universitätsklinikums Düsseldorf (18,7 %) lässt sich in den oben genannten Vergleichsuntersuchungen nicht nachvollziehen. In einer Untersuchung [89]

wurde nicht auf EPEC hin getestet, in den anderen beiden [90], [91] wurde EPEC nur zu einem sehr geringen Anteil gefunden.

Ob dies mit der bereits beschriebenen Heterogenität des Intimin-Gens und einer möglicherweise variierenden Sensitivität der unterschiedlichen Detektionsmethoden zusammenhängt oder ob andere epidemiologische Faktoren hier eine Rolle spielen, bleibt offen.

Insgesamt bleibt jedoch zu vermerken, dass enteroaggregative *E. coli* in der Patientengruppe mit Reiseanamnese ähnlich häufig gefunden werden wie die als „typisch“ geltenden Erreger, was sich allerdings noch nicht in den entsprechenden diagnostischen Empfehlungen niederschlägt [16].

Wie es auch die vom RKI für Deutschland veröffentlichten Zahlen [81] und beispielsweise die bereits früher aufgeführte Untersuchung von Nataro et al. in den USA [4] zeigen, übersteigen die viral bedingten Durchfallerkrankungen in aller Regel die Anzahl der bakteriell verursachten.

Durch in der klinischen Routinediagnostik durchgeführte zusätzliche Testung auf virale Pathogene zeigte sich in einer Subgruppe von 40 EPEC positiven Proben dieser Arbeit bei 16 Fällen zusätzlich ein positiver Befund für Noro-, Rota- oder Adenoviren. Für eine entsprechende Subgruppe bei den EAEC positiven Proben zeigte sich in 9 Fällen eine Co-Infektion mit Noro-, Rota- oder Adenovirus. Dies mag einerseits die Frage aufwerfen, ob die darmpathogenen *E. coli* in diesen Fällen tatsächlich ursächlich pathogen waren, andererseits liefern neuere Untersuchungen Hinweise darauf, dass Co-Infektionen aus EAEC und Rotavirus mit einer deutlich aggravierten klinischen Symptomatik korreliert sind [92]. Hinzu kommt, dass, wenn auch nicht systematisch untersucht, gerade in der Altersgruppe der Kinder unter 5 Jahren sicherlich eine nicht ganz unbedeutende Anzahl von Stuhlproben ausschließlich der virologischen Diagnostik zugeführt wurde. Solche Proben konnten keinen Eingang in die hier durchgeführte Untersuchung finden, sodass möglicherweise die gefundenen Prävalenzen noch unterschätzt sind.

#### **4.6 Schlussfolgerung**

Wie sich gezeigt hat, ist die Diagnostik der darmpathogenen *E. coli* nach wie vor schwierig und wenig bis gar nicht standardisiert. Dies macht es umso

schwieriger, vergleichbare und belastbare Daten zu erheben. In einer Evaluation des *Surveillance*-Systems für darmpathogene *E. coli* in Deutschland [93] zeigte sich, dass aufgrund sehr variabler Untersuchungstechniken, eher zufälligen Testverhaltens und Unterrepräsentation der erwachsenen Bevölkerung die gemeldeten Fälle wenig repräsentativ und wahrscheinlich deutlich unterschätzt sind [6]. Zwar werden daraufhin seit 2015 mit Ausnahme von EHEC die anderen darmpathogenen *E. coli* seitens des RKI nicht mehr gesondert statistisch ausgewiesen [67]; dies zeigt jedoch nur, dass die Diagnostik der entsprechenden Pathovaren weiterentwickelt und standardisiert werden muss.

In den aktuellen diagnostischen Empfehlungen der Qualitätsstandards für die mikrobiologisch-infektiologische Diagnostik von 2013 [16] findet die diagnostische Technik mittels Nukleinsäureamplifikation angesichts der fehlenden Alternativen nun auch mehr und mehr Beachtung. So wird für EPEC, und insbesondere in Hinblick auf den atypischen EPEC, bei unzureichender Treffsicherheit der Serotypisierung explizit der vormals kritisch bewertete PCR-Nachweis empfohlen [16]. Ähnliches gilt für EAEC.

Im Rahmen des Ausbruches von EHEC im Jahre 2011 in Deutschland waren des weiteren Mosaikformen aus EHEC und EAEC aufgetaucht [16], die letztlich nur durch molekularbiologische Methoden nachgewiesen werden können. In oben genannter Evaluation der diagnostischen Situation in Deutschland zeigt sich jedoch, dass die PCR gestützte Diagnostik längst noch nicht flächendeckend umgesetzt wird [93].

So zeigt sich, dass die hier weiterentwickelte Methode zu Recht Eingang in die klinische Diagnostik gefunden hat und trotz aller unumgänglichen Probleme der Methode ein wertvolles und komfortables, diagnostisches Werkzeug ist. Nicht nur die konventionelle, sondern auch die *Realtime* PCR-Methode ist in entsprechenden diagnostischen *Setups* mittlerweile etabliert [94]–[96]. Jedoch scheint die Einbindung in die tatsächliche klinische Diagnostik in Deutschland noch mangelhaft, und weitere Anstrengungen müssen unternommen werden, um die Diagnostik entsprechend auszubauen.

Eine weitere Zielsetzung dieser Arbeit war, die lokalen diagnostischen Empfehlungen für darmpathogene *E. coli* zu überprüfen und ggfs. anzupassen. In den entsprechenden Empfehlungen der Qualitätsstandards für die mikrobiologisch-infektiologische Diagnostik für Deutschland (MiQ) [16] wird EPEC als Durchfallerreger bei Kleinkindern beschrieben und mit prolongierter Diarrhoe assoziiert. Entsprechend sind Kinder unter 3 Jahren als besondere Patientengruppe ausgewiesen, welche auf EPEC hin untersucht werden sollte. Bislang wurde im Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene der Universität Düsseldorf nur die Altersgruppe bis 1 Jahr systematisch auf EPEC hin untersucht.

Die hiesige Untersuchung zeigt anhand der Häufungen für EPEC in den Altersgruppen bis 5 Jahre nun, dass die Empfehlung der Qualitätsstandards für die mikrobiologisch-infektiologische Diagnostik für Deutschland zu Recht besteht, und dass eine Empfehlung möglicherweise bis zum Alter von 5 Jahren hin ausgeweitet werden sollte.

Über lange Zeit wurde EAEC nur im Zusammenhang mit Diarrhoe bei Kindern gesehen [41], [50]. Mittlerweile wird EAEC in den Standards jedoch auch bei Erwachsenen, HIV positiven Patienten und Reiserückkehrern als relevantes Pathogen angesehen [16]. Eine entsprechende diagnostische Empfehlung ergeht jedoch noch nicht. Die hier berichteten Ergebnisse zeigen, dass angesichts der Häufigkeit positiver Testungen in der systematischen Untersuchung eine routinemäßige Untersuchung bei Kindern bis zu einem Alter von 3, wenn nicht sogar 5 Jahren, auch für EAEC gerechtfertigt wäre.

Bei EPEC und bei EAEC verläuft die Durchfallerkrankung zumeist unspezifisch und ohne wegweisende Charakteristika. Dies wird dadurch untermauert, dass in der Untersuchung abseits der Standard-Testung der Stuhlproben von unter 1 jährigen, bei nahezu keinem Patienten der Erreger auf Grund eines klinischen Verdachtes gefunden wurde. Umso wichtiger wäre eine entsprechende Ausweitung der Routinetestung. Des weiteren ist eine Testung auf EAEC und EPEC im Zusammenhang mit einer Reiseanamnese sinnvoll. Dies scheint nach den vorliegenden Ergebnissen in der Tropenambulanz des

Universitätsklinikums Düsseldorf zumindest teilweise bereits Eingang ins klinische Bewusstsein und das Testverhalten gefunden zu haben.

Wie auch die im Rahmen des EHEC-Ausbruches 2011 in Deutschland aufgetretenen Mosaikformen aus EHEC und EAEC zeigen [6], muss die Diagnostik der darmpathogenen *E. coli* bei zunehmender Verfügbarkeit von Sequenzinformationen in Zukunft weiterhin regelmäßig auf Relevanz und Sensitivität der *targets* hin überprüft werden.

Zusätzlich wären in Bezug auf die tatsächliche pathogenetische Bedeutung und die klinische Relevanz dieser Erreger weitere Untersuchungen unter Einschluss der klinischen Auswirkungen und Charakteristika erforderlich.

## 5 Zusammenfassung

Infektiöse Durchfallerkrankungen stellen nach wie vor nicht nur in Entwicklungsländern, sondern auch in Industrienationen ein großes medizinisches Problem dar. Der Stellenwert der darmpathogenen *E. coli* als Durchfallerreger hat in den vergangenen 2 Jahrzehnten deutlich zugenommen, muss jedoch regional unterschiedlich bewertet werden.

Darmpathogene *E. coli* werden anhand ihrer Virulenzfaktoren in 6 Gruppen eingeteilt (EPEC, EAEC, ETEC, EIEC, EHEC, DAEC). Die Diagnostik dieser Bakterien ist schwierig. Kulturell-biochemische Verfahren sind nicht anwendbar, und die Serotypisierung ist lediglich hinweisend. So hat sich die PCR als Nachweis von für Virulenzfaktoren kodierenden Genabschnitten zum Verfahren der Wahl entwickelt. Hier besteht jedoch noch Entwicklungsbedarf, was Auswahl von Zielsequenzen und praktische Anwendbarkeit angeht.

In dieser Arbeit wurde ein multiplex *Realtime* PCR Protokoll entwickelt, welches unter Zuhilfenahme von 8 Zielsequenzen gleichzeitig die oben genannten Klassen darmpathogener *E. coli* identifiziert, und welches in die diagnostische Routine eingebunden werden konnte.

Zur Erfassung der lokalen Prävalenzen von EPEC und EAEC wurde diese PCR während des Jahres 2006 bei allen aus dem Universitätsklinikum Düsseldorf mit der Frage nach diarrhoetypischen Erregern eingesandten Stuhlproben zusätzlich angewendet. Mit 8,9 % von 1610 untersuchten Proben für EPEC und 4,8 % für EAEC fanden sich höhere Prävalenzen als für die „typischen“ bakteriellen Durchfallerreger (*Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Campylobacter* spp.). EPEC und EAEC fanden sich gehäuft bei Kindern bis zum Alter von 5 Jahren. Für EPEC bestand die größte Häufung bei Kindern zwischen 1 und 2 Jahren (16,3 %). Für EAEC lag der Gipfel zwischen 2 und 3 Jahren (14,5 %). Der überwiegende Anteil von EPEC und EAEC aus der Gruppe der Erwachsenen wurde in den Proben aus der Tropenambulanz gefunden.

Die Ergebnisse legen nahe, dass Kinder bis zum Alter von 5 Jahren auf EPEC und EAEC getestet werden sollten. Des Weiteren zeigt sich, dass nicht nur EAEC, sondern auch EPEC bei Reiserückkehrern eine große Rolle zu spielen scheinen.

## Literaturnachweis

- [1] Robert Koch Institut, „Epidemiologisches Bulletin“, *Epidemiol. Bull.*, Nr. 50, S. 417–428, 2002.
- [2] J. Bryce, C. Boschi-Pinto, K. Shibuya, und R. E. Black, „WHO estimates of the causes of death in children“, *Lancet*, Bd. 365, Nr. 9465, S. 1147–1152, 2005.
- [3] A. C. Cheng, J. R. McDonald, und N. M. Thielman, „Infectious diarrhea in developed and developing countries.“, *J. Clin. Gastroenterol.*, Bd. 39, Nr. 9, S. 757–773, 2005.
- [4] J. P. Nataro, V. Mai, J. Johnson, W. C. Blackwelder, R. Heimer, S. Tirrell, S. C. Edberg, C. R. Braden, J. Glenn Morris Jr., und J. M. Hirshon, „Diarrheagenic *Escherichia coli* infection in Baltimore, Maryland, and New Haven, Connecticut“, *Clin Infect Dis*, Bd. 43, Nr. 4, S. 402–407, 2006.
- [5] M. B. Cohen, J. P. Nataro, D. I. Bernstein, J. Hawkins, N. Roberts, und M. A. Staat, „Prevalence of diarrheagenic *Escherichia coli* in acute childhood enteritis: A prospective controlled study“, *J. Pediatr.*, Bd. 146, Nr. 1, S. 54–61, 2005.
- [6] H. Englund und W. Hautmann, „Using an outbreak to study the sensitivity of the surveillance of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* and other enteropathic *Escherichia coli* in Bavaria, Germany, January to October 2011.“, *Euro Surveill. Bull. Eur. sur les Mal. Transm. = Eur. Commun. Dis. Bull.*, Bd. 17, Nr. 34, Jan. 2012.
- [7] M. M. Levine, „*Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic, and enteroadherent.“, *J. Infect. Dis.*, Bd. 155, Nr. 3, S. 377–389, 1987.
- [8] J. B. Nataro, J. P.; Kaper, „Diarrheagenic *Escherichia coli*“, *Clin. Microbiol. Rev.*, Bd. 11, Nr. 1, S. 142–201, 1998.
- [9] H. L. DuPont, S. B. Formal, R. B. Hornick, M. J. Snyder, J. P. Libonati, D. G. Sheahan, E. H. LaBrec, und J. P. Kalas, „Pathogenesis of *Escherichia coli* Diarrhea“, *N. Engl. J. Med.*, Bd. 285, Nr. 1, S. 1–9, Juli 1971.
- [10] G. Frankel, J. A. Giron, J. Valmassoi, und G. K. Schoolnik, „Multi-gene amplification: Simultaneous detection of three virulence genes in

- diarrhoeal stool“, *Mol. Microbiol.*, Bd. 3, Nr. 12, S. 1729–1734, 1989.
- [11] L. W. Riley, R. S. Remis, S. D. Helgerson, H. B. McGee, J. G. Wells, B. R. Davis, R. J. Hebert, E. S. Olcott, L. M. Johnson, N. T. Hargrett, P. A. Blake, und M. L. Cohen, „Hemorrhagic Colitis Associated with a Rare Escherichia coli Serotype“, *N. Engl. J. Med.*, Bd. 308, Nr. 12, S. 681–685, März 1983.
- [12] M. A. Karmali, B. T. Steele, M. Petric, und C. Lim, „Sporadic cases of haemolytic-uraemic syndrome associated with faecal cytotoxin and cytotoxin-producing Escherichia coli in stools.“, *Lancet (London, England)*, Bd. 1, Nr. 8325, S. 619–20, März 1983.
- [13] J. Konowalchuk, J. I. Speirs, und S. Stavric, „Vero response to a cytotoxin of Escherichia coli“, *Infect. Immun.*, Bd. 18, Nr. 3, S. 775–779, 1977.
- [14] a D. O'Brien, G. D. LaVeck, M. R. Thompson, und S. B. Formal, „Production of Shigella dysenteriae type 1-like cytotoxin by Escherichia coli.“, *J. Infect. Dis.*, Bd. 146, Nr. 6, S. 763–769, 1982.
- [15] A. O. O'Brien, T. A. Lively, M. E. Chen, S. W. Rothman, und S. B. Formal, „Escherichia coli O157:H7 strains associated with haemorrhagic colitis in the United States produce a Shigella dysenteriae 1 (SHIGA) like cytotoxin.“, *Lancet (London, England)*, Bd. 1, Nr. 8326 Pt 1, S. 702, März 1983.
- [16] M. Kist et al., *MiQ 9 /2013*. Urban & Fischer, 2013.
- [17] F. Kauffmann, „The serology of the coli group.“, *J. Immunol.*, Bd. 57, Nr. 1, S. 71–100, Sep. 1947.
- [18] N. A. Hinton und R. MacGregor, „A study of infections due to pathogenic serogroups of Escherichia coli“, *Can. Med. Assoc. J.*, Bd. 79, Nr. 5, S. 359, 1958.
- [19] R. Levine, Myron M.; Edelman, „Enteropathogenic escherichia coli of classical serotypes associated with infant diarrhea: epidemiology and pathogenesis“, *Epidemiol. Rev.*, Bd. 6, S. 31–51, 1984.
- [20] M. M. Baldini, J. B. Kaper, M. M. Levine, D. C. Candy, und H. W. Moon, „Plasmid-mediated adhesion in enteropathogenic Escherichia coli.“, *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, Bd. 2, Nr. 3, S. 534–8, Jan. 1983.
- [21] I. Sohel, J. L. Puente, S. W. Ramer, D. Bieber, C. Y. Wu, und G. K. Schoolnik, „Enteropathogenic Escherichia coli: identification of a gene

- luster coding for bundle-forming pilus morphogenesis“, *J. Bacteriol.*, Bd. 178, Nr. 9, S. 2613–2618, 1996.
- [22] J. a Girón, a S. Ho, und G. K. Schoolnik, „An inducible bundle-forming pilus of enteropathogenic *Escherichia coli*.“, *Science*, Bd. 254, Nr. 5032, S. 710–713, 1991.
- [23] T. K. McDaniel, K. G. Jarvis, M. S. Donnenberg, und J. B. Kaper, „A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens.“, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, Bd. 92, Nr. 5, S. 1664–1668, 1995.
- [24] E. Jerse, J. Yu, B. D. Tall, und J. B. Kaper, „A genetic locus of enteropathogenic *Escherichia coli* necessary for the production of attaching and effacing lesions on tissue culture cells.“, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, Bd. 87, Nr. 20, S. 7839–7843, 1990.
- [25] H. W. Moon, S. C. Whipp, R. a Argenzio, und R. a Giannella, „Attaching and effacing activities of rabbit and human enteropathogenic *Escherichia coli* in pig and rabbit intestines“, *Infect. an Immun.*, Bd. 41, Nr. 3, S. 1340–1351, 1983.
- [26] J. P. Nataro, M. M. Baldini, J. B. Kaper, R. E. Black, N. Bravo, und M. M. Levine, „Detection of an adherence factor of enteropathogenic *Escherichia coli* with a DNA probe.“, *J. Infect. Dis.*, Bd. 152, Nr. 3, S. 560–5, 1985.
- [27] J. P. Nataro, J. B. Kaper, R. Robins-Browne, V. Prado, P. Vial, und M. M. Levine, „Patterns of adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells.“, *Pediatr. Infect. Dis. J.*, Bd. 6, Nr. 9, S. 829–31, Sep. 1987.
- [28] J. P. Nataro, Y. Deng, D. R. Maneval, A. L. German, W. C. Martin, und M. M. Levine, „Aggregative adherence fimbriae I of enteroaggregative *Escherichia coli* mediate adherence to HEp-2 cells and hemagglutination of human erythrocytes“, *Infect. Immun.*, Bd. 60, Nr. 6, S. 2297–2304, 1992.
- [29] J. R. Czeuczulin, S. Balepur, S. Hicks, A. Phillips, R. Hall, M. H. Kothary, F. Navarro-Garcia, und J. P. Nataro, „Aggregative adherence fimbria II, a second fimbrial antigen mediating aggregative adherence in enteroaggregative *Escherichia coli*“, *Infect. Immun.*, Bd. 65, Nr. 10, S. 4135–4145, 1997.

- [30] J. P. Nataro, T. Steiner, und R. L. Guerrant, „Enteroaggregative Escherichia coli.“, *Emerg. Infect. Dis.*, Bd. 4, Nr. 2, S. 251–261, 1998.
- [31] T. S. Steiner, A. A. Lima, J. P. Nataro, und R. L. Guerrant, „Enteroaggregative Escherichia coli produce intestinal inflammation and growth impairment and cause interleukin-8 release from intestinal epithelial cells.“, *J. Infect. Dis.*, Bd. 177, Nr. 1, S. 88–96, 1998.
- [32] D. B. Huang, J. P. Nataro, H. L. DuPont, P. P. Kamat, A. D. Mhatre, P. C. Okhuysen, und T. Chiang, „Enteroaggregative Escherichia coli is a cause of acute diarrheal illness: a meta-analysis.“, *Clin. Infect. Dis.*, Bd. 43, S. 556–563, 2006.
- [33] B. Baudry, S. Savarino, P. Vial, J. Kaper, und M. Levine, „A sensitive and specific DNA probe to identify enteroaggregative Escherichia coli, a recently discovered diarrheal pathogen.“, *J. Infect. Dis.*, Bd. 161, Nr. 6, S. 1249–1251, 1990.
- [34] H. Schmidt, C. Knop, S. Franke, S. Aleksic, J. Heesemann, H. Schmidt, C. Knop, S. Franke, S. Aleksic, R. Heesemann, und H. Karch, „Development of PCR for screening of enteroaggregative Escherichia coli . These include : Development of PCR for Screening of Enteroaggregative Escherichia coli“, *J. Clin. Microbiol.*, Bd. 33, Nr. 3, S. 701–705, 1995.
- [35] J. R. Czeuczulin, T. S. Whittam, I. R. Henderson, F. Navarro-Garcia, und J. P. Nataro, „Phylogenetic analysis of enteroaggregative and diffusely adherent Escherichia coli“, *Infect. Immun.*, Bd. 67, Nr. 6, S. 2692–2699, 1999.
- [36] T. J. Ochoa, F. Barletta, C. Contreras, und E. Mercado, „New insights into the epidemiology of enteropathogenic Escherichia coli infection“, *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, Bd. 102, Nr. 9, S. 852–856, 2008.
- [37] K. L. Kotloff, J. P. Nataro, W. C. Blackwelder, D. Nasrin, T. H. Farag, S. Panchalingam, Y. Wu, S. O. Sow, D. Sur, R. F. Breiman, A. S. G. Faruque, A. K. M. Zaidi, D. Saha, P. L. Alonso, B. Tamboura, D. Sanogo, U. Onwuchekwa, B. Manna, T. Ramamurthy, S. Kanungo, J. B. Ochieng, R. Omere, J. O. Oundo, A. Hossain, S. K. Das, S. Ahmed, S. Qureshi, F. Quadri, R. A. Adegbola, M. Antonio, M. J. Hossain, A. Akinsola, I. Mandomando, T. Nhampossa, S. Ac??cio, K. Biswas, C. E. O’Reilly, E. D. Mintz, L. Y. Berkeley, K. Muhsen, H. Sommerfelt, R. M. Robins-Browne,

- und M. M. Levine, „Burden and aetiology of diarrhoeal disease in infants and young children in developing countries (the Global Enteric Multicenter Study, GEMS): A prospective, case-control study“, *Lancet*, Bd. 382, Nr. 9888, S. 209–222, 2013.
- [38] R. T. Hernandez, W. P. Elias, M. A. M. Vieira, und T. A. T. Gomes, „An overview of atypical enteropathogenic *Escherichia coli*.“, *FEMS Microbiol. Lett.*, Bd. 297, Nr. 2, S. 137–49, Aug. 2009.
- [39] M. S. Donnenberg und B. B. Finlay, „Combating enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) infections: The way forward“, *Trends Microbiol.*, Bd. 21, Nr. 7, S. 317–319, 2013.
- [40] E. Kozub-Witkowski, G. Krause, G. Frankel, D. Kramer, B. Appel, und L. Beutin, „Serotypes and virutypes of enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli* strains from stool samples of children with diarrhoea in Germany“, *J. Appl. Microbiol.*, Bd. 104, Nr. 2, S. 403–410, 2008.
- [41] T. S. Steiner, A. Samie, und R. L. Guerrant, „Infectious diarrhea: New pathogens and new challenges in developed and developing areas“, *Chinese J. Infect. Chemother.*, Bd. 7, Nr. 2, S. 147, 2007.
- [42] H. I. Huppertz, S. Rutkowski, S. Aleksic, und H. Karch, „Acute and chronic diarrhoea and abdominal colic associated with enteroaggregative *Escherichia coli* in young children living in western Europe“, *Lancet*, Bd. 349, Nr. 9066, S. 1660–1662, 1997.
- [43] W. L. Pabst, M. Altwegg, C. Kind, D. Hardegger, D. Nadal, und S. Mirjanic, „Prevalence of Enteroaggregative *Escherichia coli* among Children with and without Diarrhea in Switzerland“, *J. Clin. Microbiol.*, Bd. 41, Nr. 6, S. 2289–2293, 2003.
- [44] M. Blanco, J. E. Blanco, G. Dahbi, M. P. Alonso, A. Mora, M. A. Coira, C. Madrid, A. Juarez, M. I. Bernardez, E. A. Gonzalez, und J. Blanco, „Identification of two new intimin types in atypical enteropathogenic *Escherichia coli*“, *Int. Microbiol.*, Bd. 9, Nr. 2, S. 103–110, 2006.
- [45] M. Vidal, E. Kruger, C. Durán, M. Levine, V. Prado, C. Toro, R. Vidal, C. Dura, und R. Lagos, „Single Multiplex PCR Assay To Identify Simultaneously the Six Categories of Diarrheagenic *Escherichia coli* Associated with Enteric Infections Single Multiplex PCR Assay To Identify

- Simultaneously the Six Categories of Diarrheagenic *Escherichia coli* Associ“, *J. Clin. Microbiol.*, Bd. 43, Nr. 10, S. 5362–5365, 2005.
- [46] M. A. Pass, R. Odedra, und R. M. Batt, „Multiplex PCRs for identification of *Escherichia coli* virulence genes“, *J. Clin. Microbiol.*, Bd. 38, Nr. 5, S. 2001–2004, 2000.
- [47] K. Kimata, T. Shima, M. Shimizu, D. Tanaka, J. Isobe, Y. Gyobu, M. Watahiki, und Y. Nagai, „Rapid categorization of pathogenic *Escherichia coli* by multiplex PCR.“, *Microbiol. Immunol.*, Bd. 49, Nr. 6, S. 485–92, 2005.
- [48] K. R. S. Aranda, U. Fagundes-Neto, und I. C. A. Scaletsky, „Evaluation of multiplex PCRs for diagnosis of infection with diarrheagenic *Escherichia coli* and *Shigella* spp.“, *J. Clin. Microbiol.*, Bd. 42, Nr. 12, S. 5849–5853, 2004.
- [49] M. Rosenstraus, Z. Wang, S. Y. Chang, D. DeBonville, und J. P. Spadoro, „An internal Control for Routine Diagnostic PCR: Design, Properties, and Effect on Clinical Performance.“, *J. Clin. Microbiol.*, Bd. 36, Nr. 1, S. 191–97, 1998.
- [50] M. Kist et al., *MiQ 9/2000*. Urban & Fischer, 2000.
- [51] J. Franke, S. Franke, H. Schmidt, A. Schwarzkopf, L. H. Wieler, G. Baljer, L. Beutin, und H. Karch, „Nucleotide sequence analysis of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) adherence factor probe and development of PCR for rapid detection of EPEC harboring virulence plasmids“, *J. Clin. Microbiol.*, Bd. 32, Nr. 10, S. 2460–2463, 1994.
- [52] S. T. Gunzburg, N. G. Tornieporth, und L. W. Riley, „Identification of enteropathogenic *Escherichia coli* by PCR-based detection of the bundle-forming pilus gene“, *J. Clin. Microbiol.*, Bd. 33, Nr. 5, S. 1375–1377, 1995.
- [53] V. P. Gannon, M. Rashed, R. K. King, und E. J. Thomas, „Detection and characterization of the *eae* gene of Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* using polymerase chain reaction.“, *J. Clin. Microbiol.*, Bd. 31, Nr. 5, S. 1268–1274, 1993.
- [54] M. Batchelor, S. Knutton, A. Caprioli, V. Huter, M. Zaniol, G. Dougan, und G. Frankel, „Development of a universal intimin antiserum and PCR primers“, *J. Clin. Microbiol.*, Bd. 37, Nr. 12, S. 3822–3827, 1999.
- [55] V. Ramachandran, K. Brett, M. A. Hornitzky, M. Downton, K. A. Bettelheim,

- M. J. Walker, und S. P. Djordjevic, „Distribution of Intimin Subtypes among Escherichia coli Isolates from Ruminant and Human Sources“, *J. Clin. Microbiol.*, Bd. 41, Nr. 11, S. 5022–5032, 2003.
- [56] W. L. Zhang, B. Köhler, E. Oswald, L. Beutin, H. Karch, A. Caprioli, S. Suerbaum, H. Schmidt, und S. Morabito, „Genetic Diversity of Intimin Genes of Attaching and Effacing Escherichia coli Strains Genetic Diversity of Intimin Genes of Attaching and Effacing Escherichia coli Strains“, *J. Clin. Microbiol.*, Bd. 40, Nr. 12, S. 4486–4492, 2002.
- [57] P. M. Holland, R. D. Abramson, R. Watson, und D. H. Gelfand, „Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'---3' exonuclease activity of Thermus aquaticus DNA polymerase“, *Proc Natl Acad Sci U S A*, Bd. 88, Nr. 16, S. 7276–7280, 1991.
- [58] L. G. Lee, C. R. Connell, und W. Bloch, „Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes.“, *Nucleic Acids Res.*, Bd. 21, Nr. 16, S. 3761–3766, 1993.
- [59] S. L. Moseley, J. W. Hardy, M. I. Hug, P. Echeverria, und S. Falkow, „Isolation and nucleotide sequence determination of a gene encoding a heat-stable enterotoxin of Escherichia coli.“, *Infect. Immun.*, Bd. 39, Nr. 3, S. 1167–1174, 1983.
- [60] T. Inoue, T. Tsuji, M. Koto, S. Imamura, und A. Miyama, „Amino acid sequence of heat-labile enterotoxin from chicken enterotoxigenic Escherichia coli is identical to that of human strain H 10407“, *FEMS Microbiol. Lett.*, Bd. 108, Nr. 2, S. 157–161, Apr. 1993.
- [61] R. Lan, R. Lan, G. Stevenson, G. Stevenson, P. R. Reeves, und P. R. Reeves, „Comparison of Two Major Forms of the“, *Infect. an Immun.*, Bd. 71, Nr. 11, S. 6298–6306, 2006.
- [62] A. W. Paton, L. Beutin, und J. C. Paton, „Heterogeneity of the amino-acid sequences of Escherichia coli shiga-like toxin type-I operons“, *Gene*, Bd. 153, Nr. 1, S. 71–74, 1995.
- [63] a W. Paton, J. C. Paton, und P. a Manning, „Polymerase chain reaction amplification, cloning and sequencing of variant Escherichia coli Shiga-like toxin type II operons.“, *Microbial pathogenesis*, Bd. 15, Nr. 1. S. 77–82, 1993.
- [64] C. Hardegen, S. Messler, B. Henrich, K. Pfeffer, J. Würthner, und C. R.

- MacKenzie, „A set of novel multiplex Taqman real-time PCRs for the detection of diarrhoeagenic *Escherichia coli* and its use in determining the prevalence of EPEC and EAEC in a university hospital.“, *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.*, Bd. 9:5, 2010.
- [65] N. Hempen, T. Bellin, M. Pulz, und A. Matussek, „Rapid Detection of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* by Real-Time PCR with Fluorescent Hybridization Probes“, *J. Clin. Microbiol.*, Bd. 39, Nr. 1, S. 370–374, 2001.
- [66] J. E. Afset, K. Bergh, und L. Bevanger, „High prevalence of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) in Norwegian children with diarrhoea“, *J. Med. Microbiol.*, Bd. 52, Nr. 11, S. 1015–1019, 2003.
- [67] M. Diercke, J. Benzler, I. Schöneberg, I. Möcke, D. Altmann, H. Claus, und A. Gilsdorf, „Falldefinitionen für die Surveillance meldepflichtiger Infektionskrankheiten in Deutschland, Ausgabe 2015“, *Bundesgesundheitsblatt. Gesundheitsforschung. Gesundheitsschutz*, Bd. 57, Nr. 9, S. 1107–1110, 2014.
- [68] C. Toma, Y. Lu, N. Higa, N. Nakasone, I. Chinen, A. Baschkier, M. Rivas, und M. Iwanaga, „Multiplex PCR Assay for Identification of Human Diarrheagenic *Escherichia coli* Multiplex PCR Assay for Identification of Human Diarrheagenic *Escherichia coli*“, *J. Clin. Microbiol.*, Bd. 41, Nr. 6, S. 2669–71, 2003.
- [69] C. Bischoff, J. Lüthy, M. Altwegg, und F. Baggi, „Rapid detection of diarrheagenic *E. coli* by real-time PCR“, *J. Microbiol. Methods*, Bd. 61, Nr. 3, S. 335–341, 2005.
- [70] G. Mewis, „Entwicklung einer Multiplex-PCR zum Nachweis Enteropathogener *Escherichia coli*“, Charité-Universitätsmedizin Berlin, 2004.
- [71] D. B. Huang, Z. D. Jiang, und H. L. Dupont, „Association of virulence factor-positive and -negative enteroaggregative *Escherichia coli* and occurrence of clinical illness in travelers from the United States to Mexico“, *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, Bd. 69, Nr. 5, S. 506–508, 2003.
- [72] I. C. A. Scaletsky, M. L. M. Silva, und L. R. Trabulsi, „Distinctive patterns of adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to HeLa cells“, *Infect. Immun.*, Bd. 45, Nr. 2, S. 534–536, 1984.
- [73] Z. Jiang, D. Greenberg, J. P. Nataro, H. L. Dupont, und R. Steffen, „Rate

- of Occurrence and Pathogenic Effect of Enteroaggregative Escherichia coli Virulence Factors in International Travelers Rate of Occurrence and Pathogenic Effect of Enteroaggregative Escherichia coli Virulence Factors in International Travelers“, *J. Clin. Microbiol.*, Bd. 40, Nr. 11, S. 4185–4190, 2002.
- [74] N. M. R. Gioppo, W. P. Elias, M. C. Vidotto, R. E. Linhares, H. O. Saridakis, T. A. T. Gomes, L. R. Trabulsi, und J. S. Pelayo, „Prevalence of HEp-2 cell-adherent Escherichia coli and characterisation of enteroaggregative E. coli and chain-like adherent E. coli isolated from children with and without diarrhoea, in Londrina, Brazil“, *FEMS Microbiol. Lett.*, Bd. 190, Nr. 2, S. 293–298, 2000.
- [75] J. Cerna, J. P. Nataro, und T. Estrada-Garcia, „Multiplex PCR for detection of three plasmid-borne genes of enteroaggregative Escherichia coli strains“, *J. Clin. Microbiol.*, Bd. 41, Nr. 5, S. 15–18, 2003.
- [76] S. J. Savarino, a Fasano, J. Watson, B. M. Martin, M. M. Levine, S. Guandalini, und P. Guerry, „Enteroaggregative Escherichia coli heat-stable enterotoxin 1 represents another subfamily of E. coli heat-stable toxin.“, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, Bd. 90, Nr. 7, S. 3093–3097, 1993.
- [77] A. Zamboni, S. H. Fabbricotti, I. C. A. Scaletsky, und U. Fagundes-neto, „Enteroaggregative Escherichia coli Virulence Factors Are Found To Be Associated with Infantile Diarrhea in Brazil Enteroaggregative Escherichia coli Virulence Factors Are Found To Be Associated with Infantile Diarrhea in Brazil“, *J. Clin. Microbiol.*, Bd. 42, Nr. 3, S. 1058–1063, 2004.
- [78] C. Paiva de Sousa und J. D. Dubreuil, „Distribution and expression of the astA gene (EAST1 toxin) in Escherichia coli and Salmonella.“, *Int. J. Med. Microbiol.*, Bd. 291, Nr. 1, S. 15–20, 2001.
- [79] Q. Chen, X. Shi, Y. Li, Y. Jiang, Y. Lin, Y. Qiu, Q. Li, und Q. Hu, „Rapid genetic typing of diarrheagenic Escherichia coli using a two-tube modified molecular beacon based multiplex real-time PCR assay and its clinical application.“, *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.*, Bd. 13, S. 30, 2014.
- [80] D. B. Huang, P. C. Okhuysen, Z.-D. Jiang, und H. L. DuPont, „Enteroaggregative Escherichia coli: an emerging enteric pathogen.“, *Am. J. Gastroenterol.*, Bd. 99, Nr. 2, S. 383–9, Feb. 2004.
- [81] I. Robert Koch-institut, „Epidemiologisches Bulletin 3/2007“, Nr. 3, S. 15–

22, 2007.

- [82] M. F. Prère, S. C. Bacrie, O. Baron, und O. Fayet, „Bacterial aetiology of diarrhoea in young children: high prevalence of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) not belonging to the classical EPEC serogroups.“, *Pathol. Biol. (Paris)*., Bd. 54, Nr. 10, S. 600–2, 2006.
- [83] M. A. Foster, J. Iqbal, C. Zhang, R. McHenry, B. E. Cleveland, Y. Romero-Herazo, C. Fannesbeck, D. C. Payne, J. D. Chappell, N. Halasa, und O. G. Gomez-Duarte, „Enteropathogenic and enteroaggregative *E. coli* in stools of children with acute gastroenteritis in Davidson County, Tennessee“, *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, Bd. 83, Nr. 3, S. 319–324, 2015.
- [84] M. Keskimäki, M. Eklund, H. Pesonen, T. Heiskanen, und A. Siitonen, „EPEC, EAEC and STEC in stool specimens: Prevalence and molecular epidemiology of isolates“, *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, Bd. 40, Nr. 4, S. 151–156, 2001.
- [85] L. R. Trabulsi, R. Keller, und T. A. Tardelli Gomes, „Typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli*“, *Emerg. Infect. Dis.*, Bd. 8, Nr. 5, S. 508–513, 2002.
- [86] S. Santona, N. Diaz, P. L. Fiori, M. Francisco, M. Sidat, P. Cappuccinelli, und P. Rappelli, „Original Article Genotypic and phenotypic features of enteropathogenic *Escherichia coli* isolated in industrialized and developing countries“, *J Infect Dev Ctries*, Bd. 7, Nr. 3, S. 214–219, 2013.
- [87] C. Forestier, M. Meyer, S. Favre-Bonte, C. Rich, G. Malpuech, C. Le Bouguenec, J. Sirot, B. Joly, und C. De Champs, „Enteroadherent *Escherichia coli* and diarrhea in children: a prospective case-control study“, *J. Clin. Microbiol.*, Bd. 34, Nr. 12, S. 2897–2903, 1996.
- [88] J. E. Afset, L. Bevanger, P. Romundstad, und K. Bergh, „Association of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) with prolonged diarrhoea“, *J. Med. Microbiol.*, Bd. 53, Nr. 11, S. 1137–1144, 2004.
- [89] J. a Adachi, Z. D. Jiang, J. J. Mathewson, M. P. Verenkar, S. Thompson, F. Martinez-Sandoval, R. Steffen, C. D. Ericsson, und H. L. DuPont, „Enteroaggregative *Escherichia coli* as a major etiologic agent in traveler’s diarrhea in 3 regions of the world.“, *Clin. Infect. Dis.*, Bd. 32, S. 1706–1709, 2001.

- [90] J. Gascón, M. Vargas, L. Quintó, M. Corachán, M. T. Jimenez de Anta, und J. Vila, „Enteroaggregative *Escherichia coli* strains as a cause of traveler’s diarrhea: a case-control study.“, *J. Infect. Dis.*, Bd. 177, Nr. 5, S. 1409–1412, 1998.
- [91] C. Schultsz, J. Van den Ende, F. Cobelens, T. Vervoort, A. Van Gompel, J. C. F. M. Wetsteyn, und J. Dankert, „Diarrheagenic *Escherichia coli* and acute and persistent diarrhea in returned travelers“, *J. Clin. Microbiol.*, Bd. 38, Nr. 10, S. 3550–3554, 2000.
- [92] J. Tobias, E. Kassem, U. Rubinstein, A. Bialik, S.-R. Vutukuru, A. Navaro, A. Rokney, L. Valinsky, M. Ephros, D. Cohen, und K. Muhsen, „Involvement of main diarrheagenic *Escherichia coli*, with emphasis on enteroaggregative *E. coli*, in severe non-epidemic pediatric diarrhea in a high-income country.“, *BMC Infect. Dis.*, Bd. 15, Nr. 1, S. 79, 2015.
- [93] Robert Koch Institut, „Epidemiologisches Bulletin“, *Epidemiol. Bull.*, Nr. 20, S. 177–186, 2013.
- [94] P. Abbasi, M. Kargar, A. Doosti, J. Mardaneh, S. Ghorbani-dalini, und M. A. Dehyadegari, „Characterization of Shiga-toxin producing *E. coli* ( STEC ) and enteropathogenic *E. coli* ( EPEC ) using multiplex Real-Time PCR“, *Iran. J. Microbiol.*, Bd. 6, Nr. 3, S. 169–174, 2014.
- [95] A. Sjöling, L. Sadeghipoorjahromi, D. Novak, und J. Tobias, „Detection of major diarrheagenic bacterial pathogens by multiplex PCR panels“, *Microbiol. Res.*, Bd. 172, S. 34–40, 2015.
- [96] T. B. Souza, D. M. Lozer, S. M. S. Kitagawa, L. C. Spano, N. P. Silva, und I. C. A. Scaletsky, „Real-time multiplex PCR assay and melting curve analysis for identifying diarrheagenic *Escherichia coli*“, *J. Clin. Microbiol.*, Bd. 51, Nr. 3, S. 1031–1033, 2013.

## Danksagung

Mein ganz besonders herzlicher Dank und Respekt geht an Herr Prof. MacKenzie für seine unendliche Geduld, seine ausdauernde Betreuung und seine umsichtige Beratung bei allen Problemstellungen, nicht nur im fachlichen Sinne. Ohne ihn wäre diese Arbeit nicht zustande gekommen, und mir wären viele Erfahrungen verwehrt geblieben.

Bei Herrn Prof. Pfeffer möchte ich mich zunächst für die Gelegenheit bedanken, wissenschaftlich in seinem Institut arbeiten zu dürfen, und des Weiteren für die guten Bedingungen, die ich dabei vorgefunden habe.

Bei Herrn Dr. Würthner möchte ich mich für die Initiative und die Überlassung der Ideen zu dieser Arbeit bedanken, wenn es auch nicht möglich war, alle umzusetzen.

Herzlichen Dank auch an Frau Dr. Messler, die in der täglichen Arbeit im Labor jederzeit ein offenes Ohr und viele gute Ideen hatte.

Ebenfalls gilt mein Dank Frau Prof. Henrich für die innovative Unterstützung in technischen Fragen der Diagnostik.

Wenn auch nicht namentlich im einzelnen genannt, so gilt mein besonderer Dank all denjenigen Menschen, die sowohl im Institut, als auch im privaten Umfeld in so vielen Situationen Unterstützung geleistet und Nachsicht gezeigt haben.

Zum Schluss noch einen lieben Dank an Herrn Sascha Kirschbaum, dessen unermüdliche „Erinnerungen“ maßgeblich zur Fertigstellung dieser Arbeit beigetragen haben.

## **Eidesstattliche Versicherung**

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt und die hier vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen Medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.

27.3.2017,

Christoph Hardegen