



Laborinformationen zum EHEC Ausbruchsstamm (Stand 01.06.2011)

Sehr geehrte Kolleginnen und Kollegen,
im Folgenden möchten wir einige relevante Aspekte zur mikrobiologischen Labordiagnostik im Rahmen des aktuellen EHEC Ausbruchs zusammenstellen und Ihnen das Protokoll für den spezifischen Nachweis des EHEC-Ausbruchsstamms (HUSEC041; O104:H4) zur Verfügung stellen.

Kenntnisstand zum Isolat

Nach IfSG ist der Erreger wie ein enterohämorrhagischer *Escherichia coli* (EHEC) zu bewerten. Der Erreger wird aber aufgrund des fehlenden *eae* Gens auch als Shiga Toxin-bildender *E. coli* (STEC) bezeichnet. Folgende Konstellation von Genmarkern ist typisch:

Shiga Toxin 1 (*stx1*): negativ; Shiga Toxin 2 (*stx2*): positiv; Intimin (*eae*): negativ; Eisenaufnahmesystem (*iha*): positiv

Das Robert-Koch-Institut hat bereits veröffentlicht, dass es sich um ein Isolat der **Serogruppe O104** handelt. Wir konnten bereits **H4** als H-Antigen molekularbiologisch nachweisen, der Multilocus-Sequenztyp (MLST) ist ST678. In der Referenzkollektion von HUS-assoziierten EHEC Isolaten wird ein **O104:H4** als „HUSEC041“ bezeichnet (<http://klinikum.uni-muenster.de/index.php?id=3491>).

Phänotypisch handelt es sich bei Kultur auf Sorbitol-MacConkey Agar (SMAC) um ein **Sorbitol-fermentierendes Isolat**. Als resistenzphänotypische Besonderheit scheint der Ausbruchsstamm eine **Extended-Spectrum Betalactamase (ESBL)** zu bilden (typisches Wachstum auf konventionellen ESBL-Screeningagars); Ciprofloxacin und Aminoglykosid sind sensibel.

Meldepflicht

Nach §6 IfSG besteht für den behandelnden Arzt eine Meldepflicht für das Hämolytisch-Urämische Syndrom (HUS). Nach §7 IfSG besteht für das feststellende Labor eine Meldepflicht für den Nachweis von Shigatoxin/Verotoxin bzw. von EHEC.

Klinik

Der Ausbruchsstamm wurde bei Fällen von nicht-blutiger/blutiger Diarrhö, hämorrhagischer Colitis und Hämolytisch-Urämischem Syndrom (HUS) nachgewiesen. Meist sind Frauen betroffen; seltener Kinder und Männer. Teilweise sind auch Verlaufsformen des HUS mit neurologischen Komplikationen zu beobachten (z.B. Status epilepticus).

Diagnostik

Das Isolat ist im Rahmen üblicher Methoden zur EHEC Diagnostik detektierbar. Aus Sicht des Konsiliarlabors für HUS ist neben den oben genannten Charakteristika die auf der nächsten Seite beschriebene **PCR-Strategie (entweder Single- oder Multiplex-Ansatz)** möglich, mit der nach jetzigem Kenntnisstand eine **spezifische Differenzierung des Ausbruchsstammes HUSEC041 (O104:H4) von allen anderen HUS-assoziierten EHEC** möglich ist. Hierbei werden vier Gene auf ihr Vorhandensein überprüft. Sind alle vier vorhanden (nachgewiesen durch entsprechende Banden in der PCR mit der entsprechenden Größe), ist das Vorhandensein des Ausbruchsstammes HUSEC041 (O104:H4) höchstwahrscheinlich. DNA als Positivkontrolle stellen wir gerne auf Anfrage zur Verfügung.

Bestätigungsdiagnostik am Konsiliarlabor für HUS

Die im Rahmen des Ausbruchsgeschehens nachgewiesenen Isolate senden Sie bitte gern inklusiver klinischer Angaben mit dem beiliegenden Einsendeschein an das Konsiliarlabor für HUS am Institut für Hygiene zur kostenfreien Bestätigungsdiagnostik.

PCR zum spezifischen Nachweis von HUSEC041 (O104:H4)

Primerbezeichnung	Primersequenz (5'—3')	Target	Länge des PCR-Produkts (bp)	Referenz	Primerkonzentration
LP43	ATC CTA TTC CCG GGA GTT TAC G	<i>stx2</i>	584	Cebula et al. 1995	150 nM
LP44	GCG TCA TCG TAT ACA CAG GAG C				
TerD1	AGT AAA GCA GCT CCG TCA AT	<i>terD</i>	434	Taylor et al. 2002	240 nM
TerD2	CCG AAC AGC ATG GCA GTC T				
104rfbO-f	TGA ACT GAT TTT TAG GAT GG	<i>rfbO104</i>	351	Hier	360 nM
104rfbO-r	AGA ACC TCA CTC AAA TTA TG				
fliCH4-a	GGC GAA ACT GAC GGC TGC TG	<i>fliC H4</i>	201	Hier	240 nM
fliCH4-b	GCA CCA ACA GTT ACC GCC GC				

Reaktionsbedingungen

25 µl PCR Ansatz mit REDTaq ReadyMix (Sigma-Aldrich)
mit 2 µl DNA Template

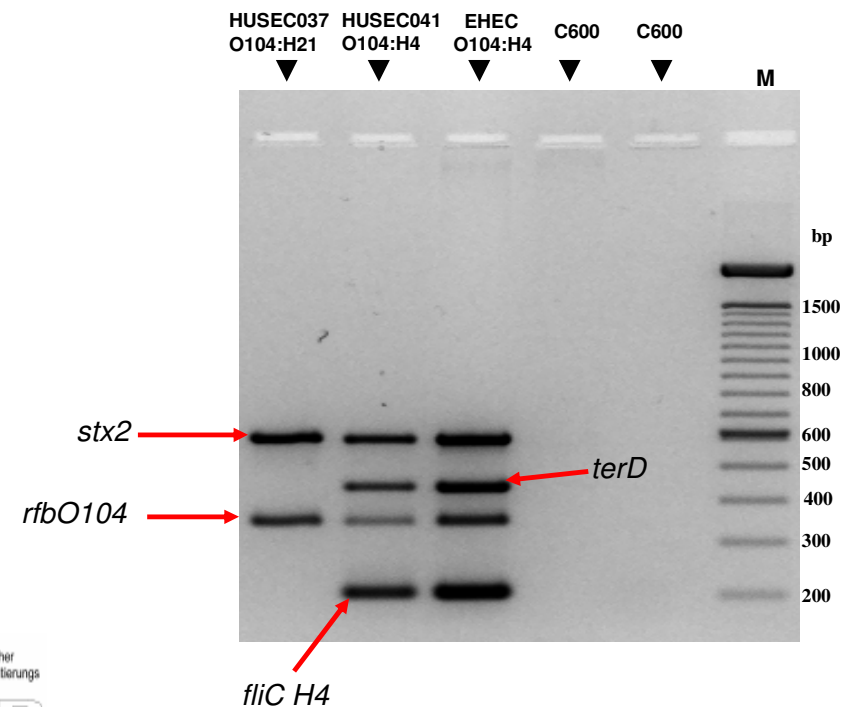
94 °C 5 min Denaturierung

30 Zyklen mit

- | | | |
|------------------|-------|------|
| 1. Denaturierung | 94 °C | 30 s |
| 2. Annealing | 55 °C | 60 s |
| 3. Elongation | 72 °C | 60 s |

72 °C 5 min. finale Elongation

Nachweis im 2%igen Agarosegel (Exemplarisch in der Abbildung rechts)



Alle Ergebnisse beziehen sich ausschließlich auf die untersuchten Proben. Ohne schriftliche Genehmigung des Prüflabors darf dieser Befundbericht nicht auszugsweise veröffentlicht werden.

***Parameter außerhalb des Akkreditierungsbereiches

Akkreditiert nach DIN EN ISO/EC 17025 2005 und erfüllt DIN EN ISO 15189 (2007)

Einsenderetikett/Stempel

Klinik/Praxis

Station

Telefon

Fax



Konsiliarlabor für Hämolytisch-Urämisches Syndrom (HUS)

am Institut für Hygiene
Universitätsklinikum Münster
 Direktor: Prof. Dr. Dr. h.c. H. Karch
 Robert-Koch-Str. 41
 48149 Münster
 Tel. 0251 83 55367 (Labor)
 Fax: 0251 83 55688
 www.ehec.org



Patientenetikett einkleben oder Patientendaten eintragen

Name _____

Vorname _____

Geburtsdatum _____

Geschlecht _____

Klinik-Nr. _____

Adresse _____

Untersuchungsauftrag

Entnahmedatum

Datum Name und Unterschrift (des Einsenders)

Hauptdiagnose/Grunderkrankung

Weitere Angaben (bitte zutreffendes ankreuzen) *n. b. = nicht bekannt

- Krankheitsbeginn (Datum) _____

- Krankheitsdauer <3d 3-7d >7d andauernd

- Enteritis nein ja n. b.* rezidivierend

- Hämolyt.-Uräm. Syndrom (HUS) nein ja n. b.*

- z. Zt. andere Infektionen nein ja n. b.* wenn ja, welche: _____

- Immunsuppression nein ja n. b.* wenn ja, wodurch: _____

- laufende Antibiotikatherapie nein ja n. b.* wenn ja, welche: _____

- Fieber nein ja, max. _____°C n. b.*

- Diarrhö nein ja

Untersuchungsmaterial/Auftrag (bitte ankreuzen)

Stuhl (mindestens 1 g)

Erregernachweis (PCR)

EHEC (Enterohämorrhagische E. coli)

EHEC SF O157:H⁻ Direktnachweis

Shiga Toxin-Nachweis

EHEC Serotypisierung des Erregers

sonstige darmpathogene E. coli

EPEC (Enteropathogene E. coli)

EAEC (Enter aggregative E. coli)

EIEC (Enteroinvasive E. coli)

ETEC (Enterotoxische E. coli)

Serum (mindestens 500 µl)

O157 Immunoblot (IgM, IgG)

Erregerisolat

Shiga Toxin-Subtypisierung

Erregertypisierung

MLST (Multilocus-Sequenz-Typisierung)

Virulenzgenachweis (bitte spezifizieren):

Sonstige Untersuchung (bitte spezifizieren):

Kostenübernahme/Rechnungsadresse (unbedingt angeben):