

GenoType[®] EHEC

Escherichia coli (*E. coli*) gehört in der Bakteriensystematik zu den Enterobacteriaceae. Sie sind wichtiger Bestandteil der normalen Darmflora des Menschen. Die meisten Stämme sind völlig ungefährlich und somit apathogen. Daneben existieren aber auch *E. coli* Varianten mit pathogenen Eigenschaften für Mensch und Tier. Erst in den letzten Jahren wurde die Bedeutung der enterohämorrhagischen *E. coli* (EHEC) als weltweit eine der häufigsten Gründe für Darmerkrankungen mit Durchfällen nachgewiesen. So zählen EHEC neben Salmonellen und Campylobacter in Deutschland mittlerweile zu den wichtigsten bakteriellen Durchfallerregern. Diese Bakterien sind bewegliche, oft auch bewegungslose gramnegative Stäbchen, die aufgrund ihrer Antigenstruktur in verschiedene Serovare einzuteilen sind. Als wichtigster und häufigster Serovar gilt O157:H7. EHEC stellen eine Untergruppe der Shigatoxin-produzierenden *E.coli* (STEC) dar. Charakteristisch für diese Bakteriengruppe ist die Bildung von Zellgiften, von denen eines dem der Ruhrerreger (Shigellen) fast identisch ist. Synonym werden für diese Toxine auch die Begriffe Verotoxine oder *Shiga-like-toxins* benutzt. EHEC besitzen weitere Faktoren, die für die Auslösung einer Infektion wichtig sind (Tab.1).

Pathogenitätsfaktor	Lokalisation	Mechanismus	Wirkort
Shigatoxine (<i>stx1</i> ; <i>stx2</i>)	Lambdoider Prophage, chromosomal integriert	Hemmung der Proteinbiosynthese, Apoptose	Epithel- und Endothelzellen
Intimin (<i>eae</i>); Typ III-Sekretionapparat	Chromosomal auf Pathogenitätsinsel	Adhärenz, Sekretion	Darmepithel
Serinprotease (<i>espP</i>)	Plasmid	Störung der Blutgerinnung	Faktor V
EHEC-Hämolysin (<i>hlyA</i>)	Plasmid	Hämolyse	Erythrozyten/ Leukozyten

Tabelle 1: EHEC Virulenzfaktoren

EHEC-Erreger verursachen ein breites Spektrum klinischer Symptomatik. Diese erstrecken sich von leichtem Durchfall und akuten lokalen entzündlichen Prozessen des Dickdarms über eine hämorrhagische Colitis (HC) zu den postinfektiösen Syndromen. Als solche gelten das hämolytisch-urämische Syndrom (HUS) sowie die thrombotisch-thrombozytopenische Purpura (TTP), die insbesondere bei Kleinkindern und älteren Personen zu lebensbedrohlichen Komplikationen führen können. Die Inkubationszeit beträgt in Abhängigkeit von der Infektionsdosis 1-3 Tage, kann aber bis zu 8 Tagen betragen. Aufgrund der Säuretoleranz der Bakterien ist die Infektionsdosis relativ gering (10-100 Erreger).

Als natürliches Reservoir für EHEC-Bakterien gilt der Darm von Rindern und kleineren Wiederkäuern, sowie die von diesen gewonnenen Lebensmittel. Diverse Studien in Europa und den USA ergaben, dass in mindestens 70% der Rinderbestände die Tiere zeitweise EHEC mit dem Kot ausscheiden. Auch bei anderen Tieren (Schwein, Hund, Kaninchen, Pferd, Katze) konnten EHEC nachgewiesen werden. Bei direktem Kontakt mit Tieren und deren Ausscheidungen, sowie dem Verzehr von kontaminierten, rohen Tierprodukten kann eine Infektion auf dem Menschen erfolgen. Von Bedeutung sind aber auch Mensch-zu-Mensch Infekt-Ketten, was vor allem in Gemeinschaftseinrichtungen epidemiologisch zu beachten ist. Eine rechtzeitige bakteriologische Abklärung von Durchfällen bei hospitalisierten Kindern, bei Ausbrüchen in Altenheimen sowie in anderen Gemeinschaftseinrichtungen ist daher unabdingbar. In Abb. 1 sind verschiedene labordiagnostische Verfahren zur sicheren Verdachtsdiagnose von EHEC-Infektionen dargestellt

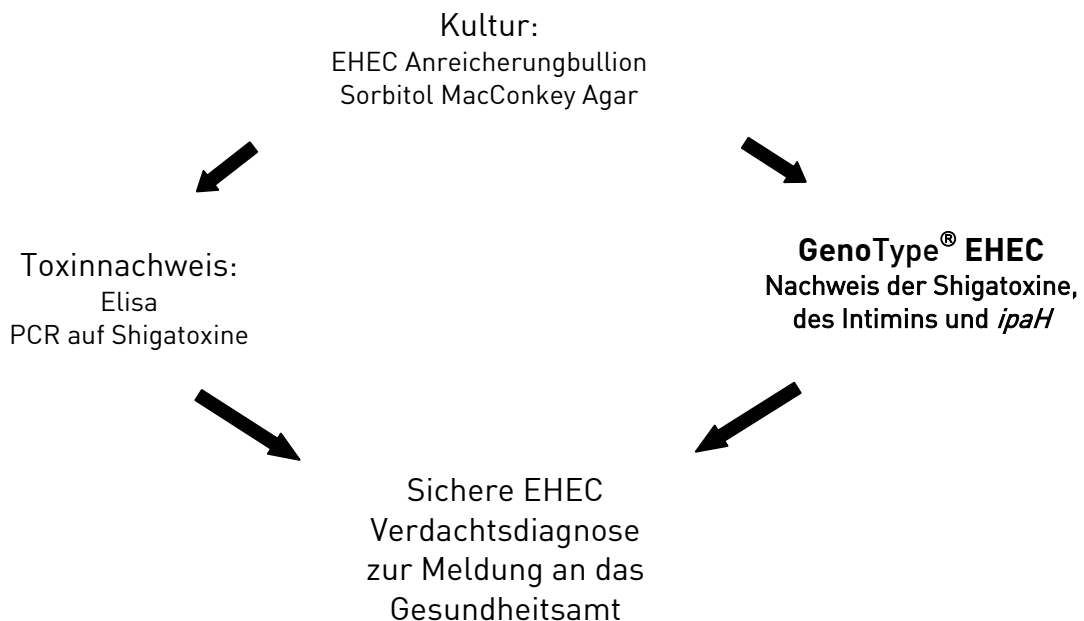


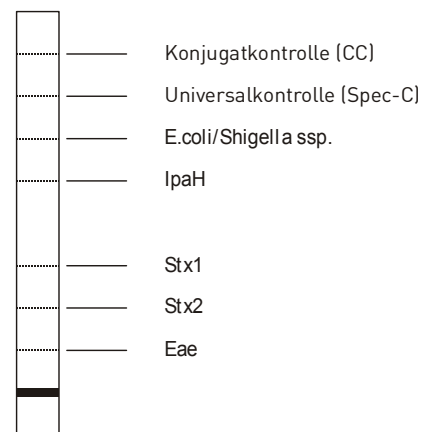
Abbildung 1: Labordiagnostische Verfahren zum Nachweis einer EHEC-Infektion

Da sich die Keime bei der Kultivierung äußerlich nicht von den apathogenen *E.coli* unterscheiden, ist der mikrobiologische Nachweis von EHEC mit besonderen Schwierigkeiten verbunden. Außerdem kann trotz Verwendung spezieller Nährmedien oder einer serologischen Bestimmung nur ein Teil der beschriebenen Erregertypen erfasst werden, da es sich bei EHEC-Bakterien um eine serofermentativ nicht einheitliche Gruppe handelt.

Erstes und wichtigstes diagnostisches Suchkriterium beim Nachweis einer EHEC-Infektion muss deshalb das von den Bakterien gebildete Shigatoxin sein. Diese Bestimmung erfordert den Einsatz molekularbiologischer diagnostischer Verfahren. Hier bietet der **GenoType® EHEC** eine neue Möglichkeit, EHEC-Infektionen sicher, schnell, leicht und ohne großen Geräteaufwand zu diagnostizieren.

Molekulargenetische Diagnostik zum Nachweis einer EHEC-Infektion

Mit der Entwicklung des **GenoType® EHEC** steht jetzt ein molekulargenetisches Testsystem zur Verfügung, das die schnelle Identifizierung von EHEC Bakterien ermöglicht. Der Test erlaubt basierend auf der **DNA•STRIP®**-Technologie, eine Aussage über das Vorhandensein von *E.coli* und *Shigella* ssp.. EHEC-Bakterien können mit diesem Test durch den Nachweis der wichtigsten Leitmerkmale der EHEC, den Shiga-Toxin-Genen 1 und 2 (*stx1*, *stx2*) sowie des Intimin-Gens (*eae*), eindeutig identifiziert werden. Zur Unterscheidung der EHEC von Shigellen und EIEC (Enteroinvasive *E. coli*) dient das Gen *ipaH*, eines der Shigellen-spezifischen Invasingene.



Nach Kultivierung der Bakterien aus Stuhlproben und Isolation der Bakterien DNA wird zunächst eine PCR durchgeführt. Dabei werden selbst geringste Mengen vorhandener DNA lokusspezifisch amplifiziert. Im Anschluss erfolgt dann die Reverse Hybridisierung mit den im Kit enthaltenen Teststreifen. Zur Auswertung steht eine Schablone zur Verfügung, die die Entwicklungszonen auf dem Streifen definiert und somit eine eindeutige Aussage bezüglich des Vorhandenseins von EHEC ermöglicht.

EHEC – ein Steckbrief

Familie:	Enterobacteriaceae
Art:	<i>Escherichia coli</i>
Serovare:	O157:H7; O157:H-; O26:H11; O111:H-; O103:H2 u. a.
Morphologie:	bewegliche (manchmal unbewegliche), gramnegative Stäbchen
Virulenzfaktoren:	Shigatoxine [<i>stx</i>], Intimine [<i>eae</i>], Hämolysin (<i>hlyA</i>), Serinprotease [<i>espP</i>] u.a.
Reservoir:	Wiederkäuer, u. a. Rinder, Schafe, Ziegen, Rehe und Hirsche
Infektionsweg:	rohes Rinderhackfleisch, Mettwurst, Rohmilch, Sprossen, nicht pasteurisierter Apfelsaft, Bade- und Trinkwasser
Inkubationszeit:	1-3 Tage, bis zu 8 Tage möglich
Infektionsdosis:	10-100 Keime
Klinische Symptomatik:	wässrig-blutige Durchfälle, begleitet von Übelkeit und Erbrechen bis hin zur hämorrhagischen Kolitis mit Leibschmerzen, Fieber
Komplikationen:	Hämolytisch-urämisches Syndrom (HUS), thrombotisch-thrombozytopenische Purpura (TTP) v.a. bei älteren Menschen und Kleinkindern
Diagnostik:	Kultur, Toxinnachweis
Therapie:	rein symptomatisch; antibakterielle Therapie ist kontraindiziert, da dies die Bakterienausscheidung verlängert und Toxinbildung stimuliert

GenoType[®] EHEC

Within the system of bacteriology, *Escherichia coli* (*E. coli*) are classified as enterobacteria. These are an important component of the intestinal flora of humans. Most variations are non-pathogenic and are therefore completely harmless. Besides these, however, is the *E. coli* variant with has pathogenic properties for both humans and animals. In the last few years the significance of enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) as one of the most common causes of intestinal disease producing diarrhoea has been proven. Within this time, EHEC has become, alongside salmonella and campylobacter, one of the most habitual pathogens in the occurrence of diarrhoea. These bacteria can be mobile but are also often immobile rod-shaped gram-negatives that because of their antigen-structure can be divided into various serovar types. The most important and regularly occurring serovars is O157:H7. EHECs have a sub-group of shiga toxin-producing *E.coli* (STECs). A typical characteristic for this bacteria group is the formation of cytotoxins, one of which is almost identical with the causative agent of dysentery (Shigellosis). These toxins are also known as sclerosing-toxins or *shiga-like-toxins*. EHECs have other properties that can lead to the outbreak of an infection (Tab.1).

Pathogenicity factor	Localisation	Mechanism	Area of activity
Shiga toxins (<i>stx1</i> ; <i>stx2</i>)	Lambdoid prophage, chromosomally integrated	Restriction of protein-biosynthesis, apoptosis	Epithial and Endothelial cells
Intimins (<i>eae</i>); Typ III-secretion apparatus	Chromosomally on Pathogenicity island	Adhesion, Secretion	Intestinal epithelium
Serine proteases (<i>espP</i>)	Plasmid	Disruption of haemocoagulation	Faktor V
EHEC-Haemolysin (<i>hlyA</i>)	Plasmid	Haemolysis	Erythrocyte/ Leucocyte

Table 1: EHEC Virulence factors

EHEC agents cause a wide variety of clinical symptoms. These range from mild diarrhoea and acute local infections within the colon to haemorrhagic colitis (HC) to the post-infection syndromes. Of the latter, it is haemolytic-uraemic syndrome (HUS) and thrombotic-thrombocytopenic purpura (TTP) that can lead to life-threatening complications for infants and elderly people in particular.

The incubation period, depending on the infective dose, is about 1-3 days, but can extend up to 8 days. Due to its acidity-tolerance, the dose required for infection to occur is relatively small (10-100 pathogens).

EHEC bacteria find a natural reservoir in the intestines of cattle and small ruminants, as well as the meat produced from their slaughter. Diverse studies in Europe and the USA have found that at least 70% of cattle livestock over time expunge EHEC via faecal discharge. EHEC can also be found in other animals (pigs, dogs, rabbits, horses, cats). Human infection can occur when there is contact with animals and their excrement, or by the consumption of contaminated raw animal products. Also of importance is the epidemiological infection chain from human to human, often observed within health facilities. It is therefore of paramount importance that there be a prompt bacteriological clarification in cases of diarrhoea among hospitalized children and similar outbreaks in residential homes for the elderly or in other such health facilities. In diagram 1, the various laboratory diagnostic methods are set out for secure diagnosis where EHEC infection is suspected.

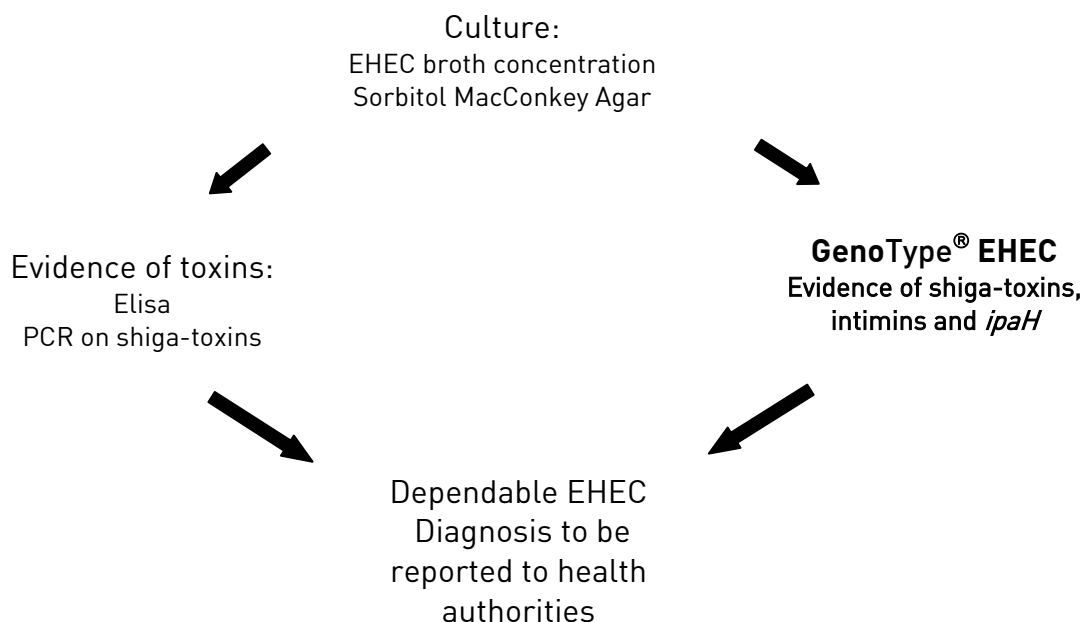


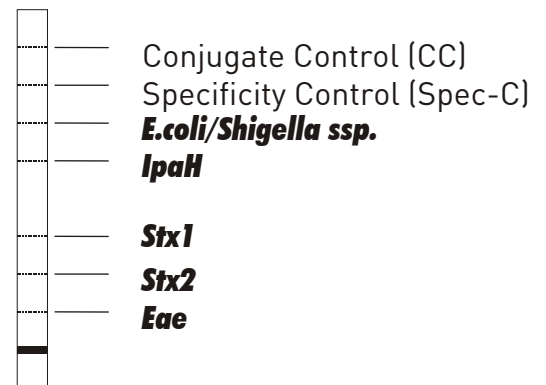
Diagram 1: Laboratory diagnostic methods to prove existence of an EHEC infection

Because the germs during cultivation cannot be distinguished from non-pathogenic *E.coli* by their appearance, establishing microbiological proof of EHEC is particular problematic. Moreover, despite the use of special nutritional methods or serological conditions, only some of the causatives agents as described can be collected, because with EHEC bacteria we are dealing with a diverse sero-fermentation group. Therefore, the first and most important diagnostic search criterion must be the shiga-toxins that are produced by these bacteria. This requires the employment of molecular-biological diagnostic methods. In this instance, **GenoType® EHEC** offers the possibility to make a dependable diagnosis of EHEC infections quickly and easily without the need for complicated apparatus.

Molecular-genetic diagnosis of an EHEC infection with **GenoType® EHEC**

The development of the **GenoType® EHEC** makes available a molecular-genetic test system that allows the rapid identification of EHEC bacteria. Based on **DNA•STRIP®** Technology™, the test enables a diagnosis to be made about the existence of *E.coli* and *Shigella* ssp. By using this test for evidence of the most significant characteristics of EHEC, the Shiga toxin genes 1 and 2 (*stx1*, *stx2*) and the intimis gene (*eae*), the bacteria can be unequivocally identified. The *ipaH* gene, one of the shigellosis-specific invasive genes, is used to distinguish EHEC from shigellosis and EIEC (Enteroinvasive *E. coli*).

After the bacteria have been cultivated from faecal specimens and the bacterial DNA isolated, a PCR is then carried out. This allows locus-specific amplification of even the smallest amounts of any DNA that is present. Finally, reverse hybridization is implemented using the test-strips in the kit. A template is provided for the evaluation, defining the reaction zones on the strip thus allowing an unambiguous assessment of the existence of EHEC.



EHEC – characteristics

Family:	Enterobacteriaceae
Type:	<i>Escherichia coli</i>
Serovars:	O157:H7; O157:H-; O26:H11; O111:H-; O103:H2 inter alia.
Morphology:	mobile (sometimes immobile), gram-negative rod-shaped
Virulence factors:	Shiga-toxin (<i>stx</i>), Intimis (<i>eae</i>), Haemolysin (<i>hlyA</i>), Serin proteases (<i>espA</i>) inter alia.
Reservoir:	Ruminants, including cattle, sheep, goats and deer
Infection path:	raw ground beef, sausage meat, untreated milk, sprouts, unpasteurized apple juice, bathing and drinking water
Incubation period:	1-3 days, up to 8 days possible
Infection dose:	10-100 pathogens
Clinical	
Symptoms:	watery diarrhoea containing blood, accompanied by nausea and vomiting, or more severely haemorrhagic colitis with stomach ache, fever
Complications:	Haemolytic-uraemic Syndrome (HUS), thrombotic-thrombocytopenic purpura (TTP) especially hazardous for elderly people and infants
Diagnosis:	Culture, evidence of toxin
Therapy:	purely symptomatic; anti-bacterial treatment is contraindication, because this delays the expulsion of the bacteria and stimulates toxin build-up