

Übersicht über Verfahren zum Nachweis von Escherichia coli O157 und anderer verotoxinbildender E. coli (VTEC) = A review of isolation and detection procedures for Escherichia coli O157 and other verotoxin-producing E. coli (VTEC)

Autor(en): **Stephan, Roger**

Objektyp: **Article**

Zeitschrift: **Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene = Travaux de chimie alimentaire et d'hygiène**

Band (Jahr): **88 (1997)**

Heft 6

PDF erstellt am: **12.07.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-982344>

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern. Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden. Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

Haftungsausschluss

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

Übersicht über Verfahren zum Nachweis von *Escherichia coli* O157 und anderer verotoxinbildender *E. coli* (VTEC)*

A Review of Isolation and Detection Procedures for *Escherichia coli* O157 and Other Verotoxin-producing *E. coli* (VTEC)

Key words: *E. coli* O157: H7, Methods, Verocytotoxin-producing *E. coli* (VTEC)

Roger Stephan

Institut für Lebensmittelsicherheit und -hygiene der Universität Zürich, Zürich

Einleitung

Seit der ersten Beschreibung einer lebensmittelbedingten Infektion mit enterohämorrhagischen *E. coli* (EHEC) des Serovars O157:H7 (1) haben auch der Serovar O157:H- und andere O-Serogruppen wie z. B. O111, O26, O103, O22 und O118 bei VTEC-bedingten Erkrankungen des Menschen an Bedeutung gewonnen. Und laufend wird die Liste der bisher bereits über 160 beschriebenen VTEC-Serovare länger. Aufgrund der niedrigen minimalen Infektionsdosis sind Methoden mit einer hohen Nachweisempfindlichkeit gefordert. Der Erregernachweis aus Lebensmitteln wird zusätzlich durch den meist geringen Anteil verotoxinbildender *E. coli* (VTEC) an der gesamten *E. coli*-Flora erschwert, so dass Screening-Verfahren benötigt werden, die auch geringe VTEC-Zahlen aus der gesamten *E. coli*-Zahl erkennen lassen.

Unterschiede im biochemischen Verhalten der VTEC im Vergleich zur übrigen *E. coli*-Flora sind kaum vorhanden. *E. coli* O157:H7 wurde zwar im Gegensatz zu etwa 93% der übrigen *E. coli* als sorbitolnegativ beschrieben (2), doch sind mittlerweile bereits Stämme bekannt, die innerhalb von 24 Stunden ebenfalls Sorbit umsetzen (3, 4). Daneben fehlt, im Gegensatz zu anderen Serovaren, den meisten der O157:H7 Stämme das Enzym β -D-Glucuronidase (5). Von den *E. coli* O157:H- sind jedoch nur gerade die Hälfte aller Stämme sorbitol- und β -D-glucuronidase-negativ.

* Vortrag gehalten am Symposium «Enterohämorrhagische *E. coli* in Lebensmitteln» der Schweizerischen Gesellschaft für Mikrobiologie, Universität Zürich-Irchel, 16. Oktober 1997

Screening-Verfahren, die nur auf diesen biochemischen Eigenschaften beruhen, erfassen somit einen Teil der O157 *E. coli* und auch VTEC-Stämme aller anderen Serogruppen nicht. Heute stehen aber eine ganze Reihe anderer Verfahren zur Auswahl, die auf immunologischen und molekularbiologischen Prinzipien beruhen. Im folgenden soll eine Übersicht über Methoden und kommerziell erhältliche Testsysteme für den Nachweis von *E. coli* O157:H7 und der Gruppe anderer verotoxinbildender *E. coli* gegeben werden.

Nachweis und Identifizierung von *E. coli* O157:H7

Anreicherung

Wachstumsversuche von *Dolye* and *Schoeni* (6) in Trypton-Soja-Bouillon (TSB) haben gezeigt, dass sich *E. coli* O157:H7 zwischen 30 °C und 42 °C mit Generationszeiten um eine halbe Stunde schnell vermehrt. Zwischen 44 °C und 45 °C war dagegen nur noch eine schlechte, über 45,5 °C bzw. unter 10 °C keine Vermehrung mehr festzustellen (7).

Neben der Bebrütungstemperatur spielt jedoch das Anreicherungsmedium eine sehr wesentliche Rolle. In der Literatur sind mehrere flüssige Anreicherungsmedien beschrieben (Tabelle 1). Aktuelle Untersuchungen von *Müller* und *Bülte* (15) zeigen aber wesentliche Unterschiede im Wachstumsverhalten von EHEC/VTEC-

Tabelle 1. Anreicherungsmedien für den Nachweis von *Escherichia coli* O157 (Literaturübersicht)

Anreicherungsbouillon	Antibiotikum-Supplement	Literatur
mTSB	–	(8)
mTSB+n	Novobiocin	(8)
mTSB+a	Acriflavin	(9)
dm TSB+ca	Acriflavin	(10)
EEB	Vancomycin	(11)
	Cefixim	
	Cefsulodin	
LST+n	Novobiocin	(12)
mEC+n	Novobiocin	(5)
BRILA	–	(13)
BPWE+vcc	Vancomycin	(14)
	Cefixim	
	Cefsulodin	

TSB = Trypton-Soja-Bouillon; EEB = *E. coli* enrichment broth; LST = Laurylsulfat-Tryptose-Bouillon; EC = *Escherichia coli*-Bouillon; BRILA = Brillantgrün-Galle-Lactose-Bouillon; BPWE = Peptonwasser; m = modifiziert

Stämmen in verschiedenen Anreicherungsmedien mit und ohne Antibiotikazusätzen. Andere Versuche haben gezeigt, dass zur Wiederbelebung von geschädigten O157 eine wenig selektive Bouillon wie Trypton-Soja-Bouillon mit Novobiocin-Zusatz (TSB+n) verwendet werden sollte, da z. B. gepuffertes Peptonwasser mit Antibiotikazusatz zu stark hemmend wirken kann.

Eine Anreicherung von 6 Stunden in modifizierter Trypton-Soja-Bouillon (mTSB) bei 42 °C wird durch *Bolton et al.* (16) als am geeignetsten angesehen. *Heuvelink et al.* (17) empfehlen dagegen eine Anreicherung in modifizierter *E. coli*-Bouillon mit Novobiocin (mEC+n) bei 37 °C für 18–20 Stunden. *Müller* und *Bülte* (15) empfehlen aufgrund ihrer umfangreichen Vergleichsuntersuchungen für Fleisch und Fleischerzeugnisse eine Anreicherung in Brillantgrün-Galle-Lactose-Bouillon. Wie zur Wahl des Anreicherungsmediums gehen auch die Literaturangaben zum Schütteln der Anreicherung während der Bebrütung auseinander. Viele Literaturangaben sehen jedoch ein Schütteln auch bei Verwendung verschiedenster Anreicherungsmedien bei 100 rpm vor (8, 11, 13, 18, 19).

Um die Nachweisempfindlichkeit weiter zu verbessern, sind in der Literatur zudem verschiedenste Separations- bzw. Konzentrationstechniken beschrieben (20–22). Die heute wohl bedeutendste und auch kommerziell (DYNAL) erhältliche stellt die immunmagnetische Separation (IMS) dar. Stämme der Serogruppe O157 werden an magnetische Kügelchen gebunden, die anschliessend mittels eines magnetischen Feldes separiert werden. Trotz möglicher Kreuzreaktionen mit anderen bakteriellen Antigenen kann so die Nachweisgrenze für *E. coli* O157 um das Hundertfache gesenkt (23) und noch 1 KBE/25 g nachgewiesen werden (24).

O157-Screening auf festen Selektivmedien

Aufgrund der biochemischen Besonderheiten der meisten O157:H7 Stämme lassen sich diese nach einer Anreicherung auf sorbithaltigen Agarplatten, die mit MUG (4-Methylumbelliferyl- β -D-glucuronid) ein fluorogenes Substrat der β -D-Glucuronidase enthalten, isolieren. Mittlerweile sind im Handel auch verschiedenste kommerziell hergestellte Medien erhältlich (Tabelle 2): Der Sorbit-MacConkey (SMAC)-Agar (Difco, Oxoid) und der Cefixim-Tellurit-SMAC (Oxoid) ermöglichen nur die Beurteilung der Sorbitfermentation; dagegen erlauben Hemorrhagic Colitis-Agar (SIFIN), SMAC mit MUG (Biotest), Galle-Chrysoidin-Sorbit-Agar mit MUG (Biotest), Fluorocult-*E. coli*-Agar (Merck) sowohl die Beurteilung der Sorbitfermentation wie auch den Nachweis der β -D-Glucuronidase. Der Rainbow Agar O157 (Biolog) ermöglicht die Beurteilung der β -Galactosidase und der β -D-Glucuronidase. Vergleichsuntersuchungen von *McCleery* and *Rowe* (25) zeigen aber vor allem beim Nachweis von subletal geschädigten *E. coli* O157 Unterschiede zwischen einzelnen Selektivmedien. So hemmt z. B. auch Tellurit das Wachstum von unbeweglichen O157-Stämmen (26).

Eine weitere Screening-Möglichkeit bietet der Enterohämolyisin-Agar (Oxoid, Biotest, Unipath). Der Nachweis der Bildung des Hämolsins auf speziellen Blutplatten ermöglicht, einen Teil der O157 *E. coli*, aber auch verotoxinbildende *E. coli*

Tabelle 2. O157-Screening auf festen Selektivmedien

Medium	Hersteller (als Beispiel)	Beurteilungskriterium
Sorbit-MacConkey (SMAC)-Agar Cefixim-Tellurit-SMAC-Agar	Difco, Oxoid, Sifin Oxoid, Sifin, Dynal	Sorbit-Fermentation
Hemorrhagic Colitis (HC)-Agar SMAC-Agar mit MUG Galle-Chrysoidin-Sorbit-Agar Fluorocult-E. coli-Agar	Sifin Biotest Biotest Merck	Sorbit-Fermentation Nachweis der β -D-Glucuronidase
Rainbow Agar O157	Biolog	Nachweis der β -Galactosidase β -D-Glucuronidase
Chromagar O157	Dynal	Abbau chromogener Substanzen
BCM-157:H7-Agar	Biosynth	keine Angaben
Enterohämolysin-Agar	Oxoid, Biotest, Unipath	Enterohämolysinbildung

anderer Serogruppen zu erfassen. Dabei treten nach einer Bebrütung über Nacht schmale, trübe Hämolysehöfe auf, die gut von den grossen, klaren schon nach 4 Stunden auftretenden Höfen der α -hämolysierenden *E. coli* zu unterscheiden sind. Dieser Nährboden weist jedoch in einer Mischflora, wie sie z. B. in einem Lebensmittel vorkommen kann, eine sehr geringe Selektivität auf. Daher wurde neuerdings eine Modifikation durch Supplementierung mit Vancomycin eingeführt (Oxoid).

Immunologische Isolierung

Allen Vorgehensweisen gemeinsam ist, dass, ausgehend von einer Anreicherung, der immunologische Nachweis mittels spezifischer Antikörper gegen den Serotyp O157 entweder auf einem Filter oder in Bouillonkulturen erfolgt. *Dolye* and *Schoeni* (8) beschrieben mit der Hydrophobic-Grid-Membrane-Technik ein Immunoblotverfahren auf Nitrocellulosemembranen. Unter Verwendung polyklonaler Antikörper konnten sie noch bis zu 1,5 *E. coli* O157:H7 pro g Hackfleisch erfassen. Dieses Vorgehen stellt aber ein sehr aufwendiges Verfahren dar. Mittlerweile sind etliche kommerziell vertriebene immunologische Systeme erhältlich (Abb. 1). Es sind dies mit dem EHEC-Tek (Organon), VIDAS *E. coli* O157 (BioMérieux), *E. coli* O157 (Tecra), EZ Coli Rapid Detection System (Difco), Micro Screen™ *E. coli* O157:H7 (Neogen Corporation) und Singlepath *E. coli* O157:H7 (Merck) vor allem EIA-Systeme. Die Nachweisgrenze bei den meisten dieser Kits liegt bei 1 KBE/g Lebensmittel.

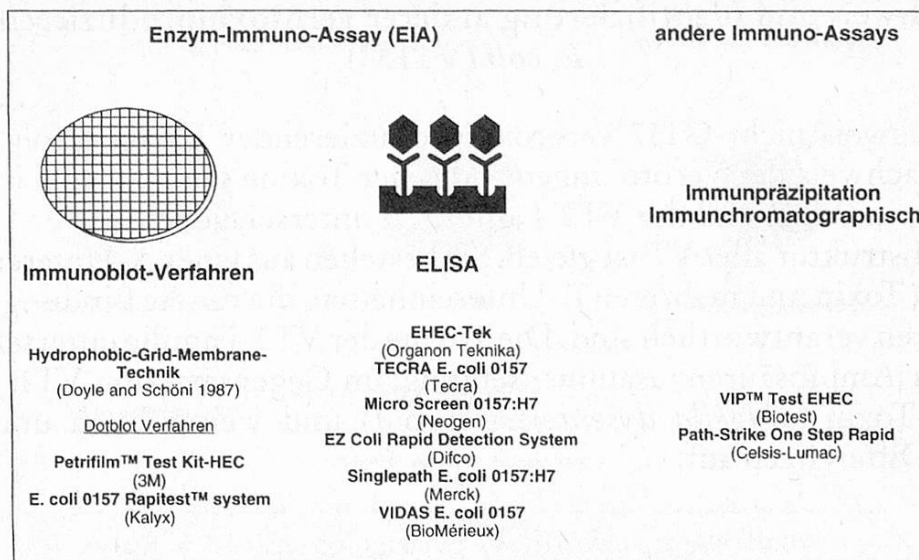


Abb. 1. Immunologische Isolierung von *E. coli* O157

Molekularbiologischer Nachweis

Feng (27) zeigte, dass sich *E. coli* O157:H7 über eine einzige Modifikation im 5'-Ende seines *uid A* Strukturgenes spezifisch nachweisen lässt. Auch unter Einbezug einer Vielzahl anderer Serotypen, aber auch anderer Enterobacteriaceae, erwies sich dieser Nachweis als sehr spezifisch. Mit dem von ihm beschriebenen Oligonucleotid PF-27 gelang ihm auch die Identifizierung biochemischer Varianten des O157-Serotypes, die unbeweglich, MUG-negativ und sorbitolpositiv waren (28). Deng (29) und Meng (30) entwickelten einen Multiplex-PCR-Ansatz, mit dem gleichzeitig über drei unterschiedliche DNA-Gensequenzen (*eae A*, *stx I*, *stx II*) *E. coli* O157:H7 Kolonien spezifisch identifiziert werden können.

Serologische Bestätigung und weitere Charakterisierung von *E. coli* O157-verdächtigen Isolaten

Um falschpositive Ergebnisse auszuschliessen, müssen O157-verdächtige Kolonien aber biochemisch als *Escherichia coli* bestätigt und anschliessend serologisch mit Antiseren gegen O- und H-Antigene typisiert werden. Für die Bestimmung des O157-Antigens sind mehrere kommerzielle Antiseren erhältlich (Oxoid, Difco, Sifin, Pro-Lab Diagnostics). Bei der Verwendung von polyklonalen Antikörpern sind aber Kreuzreaktionen mit *E. hermannii*, *Brucella abortus*, *Brucella melitensis*, *Yersinia enterocolitica* O:9, *Salmonella* spp. oder *Pseudomonas* spp. beschrieben. Borczyk et al. (31) konnten z. B. von 1300 in der Latex-Agglutination verdächtigen *E. coli* O157 nur gerade 125 serologisch bestätigen. Weiter müssen alle bestätigten *E. coli* O157 auf ihre Toxinbildungs- und Haftungsfähigkeit hin überprüft werden.

Nachweis und Identifizierung anderer verotoxinproduzierender *E. coli* (VTEC)

Der Nachweis nicht-O157 verotoxinproduzierender *E. coli* erfolgt entweder über den Nachweis der Verotoxingene oder der Toxine selbst. Dabei ist zwischen dem Verotoxin (VT)1 und der VT2-Familie zu unterscheiden.

Die Grobstruktur aller VT ist gleich. Sie bestehen aus einer A-Untereinheit, dem eigentlichen Toxin und mehreren B-Untereinheiten, die für die Bindung des Toxins an Rezeptoren verantwortlich sind. Die Toxine der VT2-Familie unterscheiden sich aber in ihrer Aminosäurezusammensetzung, im Gegensatz zum VT1, wesentlich vom Shiga-Toxin (*Shigella dysenteriae* Typ I) und weisen auch untereinander erhebliche Differenzen auf.

Anreicherung

Auch für die Anreicherung von non-O157 VTEC werden grundsätzlich die bereits im Zusammenhang mit dem O157-Nachweis beschriebenen Flüssigmedien verwendet. Müller und Bülte (15) weisen aber darauf hin, dass zwischen verschiedenen Anreicherungsmedien erhebliche Unterschiede auch in bezug auf das Wachstumsverhalten von non-O157 VTEC bestehen und empfehlen für deren Nachweis aus Lebensmitteln eine 24stündige Schüttelanreicherung bei 37 °C in Brillantgrün-Galle-Lactose-Bouillon.

Immunologischer Toxinnachweis

Neben dem aufwendigen, aber sehr empfindlichen (1–10 pg VT/ml) Verozelltest (32) mit anschließendem Neutralisationstest zur VT1- und VT2-Bestätigung sind mittlerweile verschiedene ELISA-Systeme zum VT-Nachweis beschrieben worden (33–35). Heute stehen eine Vielzahl kommerzieller Kits als Enzyme-Immuno-Assays (Premier EHEC Meridian, Hiss; VeroTest Micro Carb, Microtest; TECRA, Meridian Diagnostics; Optimum Verotoxin Antigen Test, Merlin) oder als Latex-Agglutination (VTEC-RPLA, Oxoid) zum Nachweis von Shiga-Toxinen zur Verfügung (Abb. 2). Die unterschiedlichen Toxine werden dabei zusammen (Hiss, Microtest) oder getrennt (Oxoid) nachgewiesen. In diesen käuflichen EIA's werden Antikörper gegen die Shiga-Toxine oder der Gangliosid Rezeptor Gb3 zur Bindung der Toxine aus der Anreicherungsbouillon verwendet. Eine Verbesserung der Sensitivität dieser EIA's kann durch die Verwendung des zytotoxischen Mitomycin-C-Zusatzes zur Anreicherungsbouillon erreicht werden.

Aufgrund von veränderten Affinitäten zu den Antikörpern wie auch zu den Gb3-Rezeptoren lassen sich VT2-Varianten aber mittels käuflicher EIA Kits nur ungenügend nachweisen. Auch sind, bedingt durch Antikörper-Kreuzreaktionen, falschpositive Ergebnisse mit Pseudomonaden bekannt.

Daneben kann Verotoxin nach dessen Bindung an eine Nitrocellulosemembran mittels Immunoblottechnik nachgewiesen werden. Der durch die Verwendung

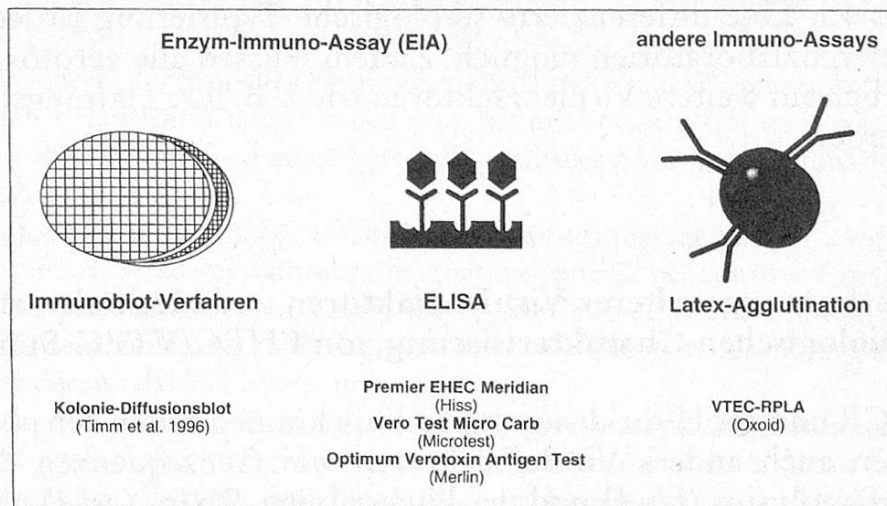


Abb. 2. Immunologischer Nachweis von Verotoxin

einer zusätzlichen zweiten Membran modifizierte Kolonie-Diffusionsblot ermöglicht es, die auf Verotoxinproduktion überprüften Kolonien direkt für weitere Charakterisierungsuntersuchungen zu verwenden (36).

Um eine Bewertung des Laborergebnisses vornehmen zu können, muss aber in jedem Fall der Erreger isoliert, typisiert und auf weitere Virulenzmerkmale hin überprüft werden.

Molekularbiologischer Nachweis von VT-Genen

Der Nachweis der Verotoxingene kann einerseits mittels Gensonden durch Hybridisierung oder mit der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) erfolgen. Es sind dazu in der Literatur eine Vielzahl von Primer-Paaren und PCR-Protokollen beschrieben, die den Nachweis von VT1, VT2 und VT2-Varianten ermöglichen (37–41). In der Regel ist aber auch für diesen Nachweis bei Lebensmitteln eine Anreicherung notwendig. *Bergum* und *Jackson* (42) beschreiben zwar den direkten VTEC-Nachweis mittels PCR aus Hackfleisch, zeigen aber auch die vielfältigen lebensmittelbedingten Störfaktoren, die die direkte Durchführung der PCR ohne Voranreicherung in Frage stellen. Einen quantitativen, automatisierten, auf einer modifizierten PCR-Reaktion basierenden Nachweis von VTEC aus der Anreicherungsbouillon bietet das Taq ManTM SLT PCR Amplification/Detection System (Perkin Elmer). Nach einem positiven PCR-Ergebnis muss aber die entsprechende Kolonie z. B. mittels der Hybridisierungstechnik aus der Mischflora isoliert und näher charakterisiert werden.

Biochemische und serologische Typisierung sowie weitere Charakterisierung von verotoxinbildenden Kolonien

Die biochemische Identifizierung einer isolierten, verotoxinbildenden Kolonie ist unerlässlich, da auch andere Enterobacteriaceae als Träger von VT-Genen

beschrieben sind. Eine differenzierte serologische Typisierung ist jedoch nur in einzelnen Referenzlaboratorien möglich. Zudem müssen alle verotoxinbildenden *E. coli* zusätzlich auf weitere Virulenzfaktoren wie z. B. ihre Haftungsfähigkeit hin überprüft werden.

Bestimmung weiterer Virulenzfaktoren und Methoden zur epidemiologischen Charakterisierung von EHEC/VTEC-Stämmen

Mit der PCR und der Hybridisierungstechnik können neben den phagencodierten VT-Genen auch andere Virulenzfaktoren wie Gensequenzen des Intimins (*eaeA*), des Hämolysins (*hlyA*) und des hitzestabilen Toxins (*astA*) nachgewiesen werden. Auch dazu finden sich in der Literatur Angaben zu Primer-Paaren und PCR-Protokollen (43–45).

Weiterführende Methoden, die im Rahmen einer epidemiologischen Charakterisierung von EHEC/VTEC-Stämmen Anwendung finden können, sind neben der phänotypischen Phagentypisierung (46) vor allem genotypische Methoden, wie Plasmidprofilanalysen (47), Ribotypisierung (48), die RAPD-Technik (49), die Pulsfeld-Gelelektrophorese (50) sowie die Verwendung von Restriktionsfragment-Längenpolymorphismen (RFLP) (51, 52).

Dank

Für die Durchsicht des Manuskriptes möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. M. Bülte herzlich bedanken.

Zusammenfassung

Beim Nachweis verotoxinbildender *Escherichia coli* muss grundsätzlich zwischen Verfahren für den spezifischen Nachweis von *E. coli* O157:H7 und der Gruppe anderer verotoxinbildender (non-O157) *E. coli* unterschieden werden.

Nach einer Anreicherung und anschließender immunomagnetischer Separation stehen heute neben verschiedensten Selektiv-/Elektivnährmedien eine Vielzahl kommerziell erhältlicher immunologischer Kits für den spezifischen Nachweis der O157 *E. coli* zur Verfügung. Daneben wird in der Literatur auch die Möglichkeit der spezifischen molekularbiologischen Identifizierung von O157 beschrieben.

Die Erfassung nicht-O157 verotoxinproduzierender *E. coli* erfolgt entweder über den Nachweis der Verotoxingene oder der Toxine selbst. Hier stehen neben der Polymerase-Kettenreaktion vor allem immunologische Methoden zum Toxinnachweis zur Verfügung.

Aus dem Überblick über die diagnostischen Verfahren wird deutlich, dass ein zuverlässiger Erreger- und Toxinnachweis nur durch Kombination kultureller, molekularbiologischer und immunologischer Methoden gelingt. Um eine Bewertung des Laborergebnisses vornehmen zu können, muss aber in jedem Fall der Erreger isoliert, typisiert und auf die verschiedenen Virulenzmerkmale hin überprüft werden.

Résumé

En ce qui concerne les procédés employés pour la recherche d'*Escherichia coli* produisant des vérotoxines, il faut différencier d'une part les méthodes spécifiques à la recherche des souches de *E. coli* O157:H7, et d'autre part celles utilisées pour la détermination des souches d'autres sérotypes (non-O157).

Il existe aujourd'hui de nombreuses méthodes spécifiques de mise en évidence de *E. coli* O157, comme p.ex.: la séparation immunomagnétique opérée sur cultures enrichies, différents milieux de culture sélectifs et électifs ainsi que de nombreux kits immunologiques. En outre, la possibilité d'une identification spécifique du sérotype O157 par des méthodes de la biologie moléculaire est décrite dans la littérature.

La recherche des souches de *E. coli* non-O157 produisant des vérotoxines peut se faire soit par la mise en évidence des gènes contrôlant la vérotoxine en utilisant la PCR («polymerase chain reaction»), soit par la recherche de la toxine elle-même par des méthodes surtout immunologiques.

Il est clair que le diagnostic, tant de l'agent que de la toxine, ne sera sûr que s'il s'appuie aussi bien sur des méthodes culturelles et immunologiques que sur celles de la biologie moléculaire. L'évaluation des résultats du laboratoire doit en tout cas se baser sur la culture et l'identification de l'agent ainsi que sur la démonstration de ses différents facteurs de virulence.

Summary

For the assay of verotoxinogenic *Escherichia coli* a distinction has to be drawn between procedures for the specific assay of *E. coli* O157:H7 and those for the assay of other verotoxinogenic (non-O157) *E. coli*.

Following enrichment and subsequent immunomagnetic separation there is a variety of commercial immunological testkits available for the specific assay of O157 *E. coli* alongside diverse selective and elective nutrient media. However, in the literature there are also reports about a possible specific identification of O157 with molecular biological methods.

The detection of non-O157 *E. coli* is carried out either via the assay of verotoxin genes or of the toxins themselves. While the further is carried out with the polymerase chain reaction the toxin assay is mainly performed with the help of immunological methods.

This overview on the spectrum of diagnostic tools shows that a reliable assay of bacteria and/or toxins can only be achieved by using a combination of cultural, molecular biological and immunological methods. However, in order to be able to assess the laboratory results the agent itself must always be isolated, isotyped and checked for the different factors of virulence.

Literatur

1. Riley, L.Q., Remis, R.S., Helgerson, S.D., McGee, H.B., Wells, J.G., Davis, B.R., Hebert, R.J., Olcott, E.S., Johnson, L.M., Hargrett, N.T., Blake, P.A. and Cohen, M.L.: Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. N. Engl. J. Med. 308, 681-685 (1983).
2. Honish, A.: Summary of *Escherichia coli* O157:H7 at an Edmonton extended care facility. Alb. Soc. Serv. Com. Health 10, 363-368 (1986).

3. Gunzer, F., Böhm, H., Rüssmann, H., Bitzan, M., Aleksic, S. and Karch, H.: Molecular detection of sorbitol-fermenting *Escherichia coli* O157 in patients with haemolytic-uraemic syndrome. *J. Clin. Microbiol.* **30**, 1807–1810 (1992).
4. Hayes, P.S., Blom, K., Geng, P., Lewis, J., Strockbine, N.A. and Swaminathan, B.: Isolation and characterization of a β -D-glucuronidase-producing strain of *Escherichia coli* serotype O157:H7 in the United States. *J. Clin. Microbiol.* **33**, 3347–3348 (1995).
5. Okrend, A.J.G., Rose, B.E. and Bennett, B.: A screening method for the isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from ground beef. *J. Food Prot.* **53**, 249–252 (1990).
6. Dolye, M.P. and Schoeni, S.L.: Survival and growth characteristics of *Escherichia coli* associated with haemorrhagic colitis. *Appl. Environ. Microbiol.* **48**, 855–856 (1994).
7. Raghubeer, E.V. and Matches, J.R.: Temperature range for growth of *Escherichia coli* serotype O157:H7 and selected coliformes in *E. coli* medium. *J. Clin. Microbiol.* **28**, 803–805 (1990).
8. Dolye, M.P. and Schoeni, S.L.: Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from retail fresh meats and poultry. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**, 2394–2396 (1987).
9. Kim, M.S. and Dolye, M.P.: Dipstick immunoassay to detect enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in retail ground beef. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 1764–1767 (1992).
10. Padhye, N.V. and Dolye, M.P.: Rapid procedure for detecting enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in food. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**, 2693–2698 (1991).
11. Weagant, S.D., Bryant, J.L. and Jinneman, K.G.: An improved rapid technique for isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from foods. *J. Food Prot.* **58**, 7–12 (1995).
12. Hitchins, A.D., Feng, P., Watkins, W.D., Rippey, S.R. and Chandler, L.A.: *Escherichia coli* and the coliform bacteria, p. 27–50. In: *Bacteriological analytical manual*, 7th ed. Association of Official Analytical Chemists International, Arlington, V.A. 1992.
13. Bülte, M., Heckötter, S., Keil, P., Schuy, Ch., Müller, A. und Aleksic, S.: Enterohämorrhagischen *E. coli* (EHEC) – aktuelle Lebensmittelinfektionserreger auch in der Bundesrepublik Deutschland? – Nachweismöglichkeiten für VTEC und EHEC. *Fleischwirtsch.* (im Druck).
14. Chapman, P.A., Wright, D.J. and Siddons, C.A.: A comparison of immunomagnetic separation and direct culture for isolation of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 from bovine faeces. *J. Med. Microbiol.* **40**, 424–427 (1994).
15. Müller, A. und Bülte, M.: Wachstumsverhalten von verotoxinogenen / entero-hämorrhagische *Escherichia coli*-Stämmen in verschiedenen Anreicherungsmedien mit und ohne Antibiotikazusatz. *Proced.*, 38. Tagung des Arbeitsgebietes «Lebensmittelhygiene», Garmisch (im Druck).
16. Bolton, J.F., Crozier, L. and Williamson, J.K.: Optimisation of methods for the isolation of *Escherichia coli* O157 from beefburgers. *PHLS Microbiol. Digest* **12**, 67–70 (1995).
17. Hewvelink, A.E., Zwartkruis-Nahuis, J.T.M. and De Boer, E.: Evaluation of media and test kits for the detection and isolation of *Escherichia coli* O157 from minced beef. *J. Food Prot.* **60**, 817–824 (1997).
18. Bennett, A.R., MacPhee, S. and Betts, R.P.: Evaluation of methods for the isolation and detection of *Escherichia coli* O157 in minced beef. *Lett. Appl. Microbiol.* **20**, 375–379 (1995).
19. Johnson, R.P., Durham, R.J., Johnson, S.T., MacDonald, L.A., Jeffery, S.R. and Butman, B.T.: Detection of *Escherichia coli* O157:H7 in meat by an enzyme-linked immunosorbent assay, EHEC-Tek. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 386–388 (1995).
20. Bassel, R.M., Ritcher, E.R. and Banwart, G.J.: Monitoring microbial numbers in food by density centrifugation. *Appl. Environ. Microbiol.* **45**, 1156–1159 (1983).

21. *Payen, M.J., Cambell, S., Patchett, R.A. and Kroll, R.G.:* The use of immobilised lectins in the separation of *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Listeria* and *Salmonella* spp. from pure cultures and foods. *J. Appl. Bacteriol.* **73**, 41–52 (1992).
22. *Miles, C.A., Morley, M.J., Hudson, W.R. and Mackey, B.M.:* Principles of separating microorganisms from suspensions using ultrasound. *J. Appl. Bacteriol.* **78**, 47–54 (1995).
23. *Wright, D.J., Chapman, P.A. and Siddons, C.A.:* Immunomagnetic separation as a sensitive method for isolation *Escherichia coli* O157 from food samples. *Epidemiol. Infect.* **113**, 31–39 (1994).
24. *Piel, I. und Bülte, M.:* Neue Ergebnisse zum Nachweis und zum Virulenzspektrum von *E. coli* O157-Stämmen aus Lebensmitteln. *Proced., 37. Tagung des Arbeitsgebietes «Lebensmittelhygiene», Garmisch 1996.*
25. *McCleery, D.R. and Rowe, M.T.:* Development of a selective plating technique for the recovery of *Escherichia coli* O157:H7 after heat stress. *Lett. Appl. Microbiol.* **21**, 252–256 (1995).
26. *Karch, H., Janetzki-Mittmann, C., Aleksic, S. and Datz, M.:* Isolation of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 strains from patients with Hemolytic-Uremic-Syndrome by using immunomagnetic separation, DNA-based methods and direct culture. *J. Clin. Microbiol.* **34**, 516–519 (1996).
27. *Feng, P.:* Identification of *Escherichia coli* serotype O157:H7 by DNA probe specific for an allele of *uid A* gene. *Mol. Cell. Probes* **7**, 151–154 (1993).
28. *Feng, P.:* *Escherichia coli* serotype O157:H7: novel vehicles of infection and emergence of phenotypic variants. *Emerg. Infect. Dis.* **1**, 16–21 (1995).
29. *Deng, M.Y. and Fratamico, P.M.:* A multiplex PCR for rapid identification of Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 isolated from Foods. *J. Food Prot.* **59**, 570–576 (1995).
30. *Meng, J., Zhao, S., Dolye, M.P., Mitchell, S.E. and Kresovich, S.:* A multiplex PCR for identifying Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7. *Lett. Appl. Microbiol.* **24**, 172–176 (1997).
31. *Borczyk, A.A., Harnett, N., Lombos, M. and Lior, H.:* False-positive identification of *Escherichia coli* O157 by commercial latex agglutination test. *Lancet* **226**, 946–947 (1990).
32. *Konowalchuk, J., Spiers, J.I. and Straviric, S.:* Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli* O157:H7. *Infect. Immun.* **18**, 775–779 (1977).
33. *Basta, M., Karmali, M. and Lingwood, C.:* Sensitive receptor-specified enzyme linked immunosorbent assay for *Escherichia coli* Verocytotoxin. *J. Clin. Microbiol.* **27**, 1617–1622 (1989).
34. *Downes, F.P., Green, J.H., Greene, K., Strockbine, N.A., Wells, J.G. and Wachsmuth, I.K.:* Development and evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays for detection of Shiga-like toxin I and Shiga-like toxin II. *J. Clin. Microbiol.* **27**, 1292–1297 (1989).
35. *Acheson, D.W., Keusch, G.T., Lightowers, M. and Donohue-Rolfe, A.:* Enzyme-linked immunosorbent assay for Shiga-like toxin II using P1 alycoprotein from hydatid cysts. *J. Infect. Dis.* **161**, 134–137 (1990).
36. *Timm, M., Klie, H., Richter, H. und Perlberg, K.W.:* Eine Methode zur gezielten Isolierung Verotoxin-bildender *Escherichia coli*-Kolonien. *Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.* **109**, 270–272 (1996).
37. *Karch, H. and Meyer, T.:* Evaluation of oligonucleotide probes for identification of Shiga-like-toxin producing *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.* **27**, 1180–1186 (1989).
38. *Karch, H. and Meyer, T.:* Single primer pair for amplifying segments of distinct Shiga-like toxin genes by polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* **27**, 2751–2757 (1989).

39. Schmidt, H., Plaschke, B. and Franke, S.: Differentiation in virulence patterns of *Escherichia coli* possessing *eae* genes. Med. Microbiol. Immun. **183**, 23–31 (1994).
40. Rüssmann, H., Kothe, E., Schmidt, H., Franke, S., Harmsen, D., Capriloli, A. and Karch, H.: Genotyping of Shiga-like toxin genes in non-O157 *Escherichia coli* strains associated with haemolytic uraemic syndrome. J. Med. Microbiol. **42**, 404–410 (1995).
41. Burnens, A.P., Frey, A., Lior, H. and Nicolet, J.: Prevalence and clinical significance of vero-cytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) isolated from cattle in herds with and without calf diarrhoea. J. Vet. Med. B **42**, 311–318 (1995).
42. Bergum, D. and Jackson, M.P.: Direct detection of Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* in ground beef using the polymerase chain reaction. Mol. Cell. Probes **9**, 259–264 (1995).
43. Schmidt, H., Rüssmann, H., Schwarzkopf, A., Aleksic, S., Heesemann, J. and Karch, H.: Prevalence of attaching and effacing *Escherichia coli* in stool samples from patients and controls. Zbl. Bakt. **281**, 201–213 (1994).
44. Schmidt, H., Beutin, L. and Karch, H.: Molecular analysis of the plasmid encoded hemolysin of *Escherichia coli* O157:H7 strain EDL 933. Infect. Immun. **63**, 1055–1061 (1995).
45. Yamamoto, T. and Echeverria, P.: Detection of the enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 gene sequences in enterotoxigenic *E. coli* strains pathogenic for humans. Infect. Immun. **64**, 1441–1445 (1996).
46. Ahmed, R., Bopp, C., Broczyk, A. and Kasatiya, S.: Phagotyping scheme for *Escherichia coli* O157:H7. J. Infect. Dis. **155**, 806–809 (1987).
47. Paros, M., Tarr, P.I., Kim, H., Besser, T.E. and Hancock, D.D.: A comparison of human and bovine *Escherichia coli* O157:H7 isolates by toxin genotype, plasmid profile and bacteriophage λ -restriction fragment length polymorphism profile. J. Infect. Dis. **168**, 1300–1303 (1993).
48. Martin, I.E., Tyler, S.D., Tyler, K.D., Khakhria, R. and Johnson, W.M.: Evaluation of ribotyping as epidemiologic tool for typing *Escherichia coli* serogroup O157 isolates. J. Clin. Microbiol. **34**, 720–723 (1996).
49. Birch, M., Denning, D.W. and Law, D.: Rapid genotyping of *Escherichia coli* O157 isolates by random amplification of polymorphic DNA. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. **15**, 297–302 (1996).
50. Böhm, H. and Karch, H.: DNA fingerprinting of *Escherichia coli* O157:H7 strain by pulsed-field gel electrophoresis. J. Clin. Microbiol. **30**, 2169–2172 (1992).
51. Samadpour, M., Grimm, L.M., Desai, B., Dalia, A., Ongert, J.E. and Tarr, P.: Molecular epidemiology of *Escherichia coli* O157:H7 strains by bacteriophage restriction fragment length polymorphism analysis: application to multistate foodborne outbreak and a day-care centre cluster. J. Clin. Microbiol. **31**, 3179–3183 (1993).
52. Datz, M., Janetzki-Mittmann, C., Franke, S., Gunzer, F., Schmidt, H. and Karch, H.: Analysis of the enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 DNA region containing lambdoid phage gene p and Shiga-like toxin structural genes. Appl. Environ. Microbiol. **62**, 791–797 (1996).

Dr. Roger Stephan
 Institut für Lebensmittelsicherheit und
 -hygiene der Universität Zürich
 Winterthurerstrasse 270–272
 CH-8057 Zürich