

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
11. Juli 2002 (11.07.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 02/053771 A2

- (51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12Q 1/68
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP01/11901
- (22) Internationales Anmeldedatum:
15. Oktober 2001 (15.10.2001)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität:
101 00 493.1 8. Januar 2001 (08.01.2001) DE
- (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von
US): BIOTECON DIAGNOSTICS GMBH [DE/DE];
Tegeler Weg 33, 10589 Berlin (DE).
- (72) Erfinder; und
- (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): GRABOWSKI,
Reiner [DE/DE]; Theodor-Heuss-Strasse 39, 37075
Göttingen (DE). GRÖNEWALD, Cordt [DE/DE]; Sprengelstr.
19, 13353 Berlin (DE). SCHNEIDER, Astrid
[DE/DE]; Sprengelstr. 19, 13353 Berlin (DE). PAR-
DIGOL, Andreas [DE/DE]; Eleonore-Prochaska-Strasse
3, 14480 Postdam (DE). BERGHOF, Kornelia [DE/DE];
Rhodoländer Weg 85, 12355 Berlin (DE).
- (74) Anwalt: GRÜNECKER, KINKELDEY, STOCKMAIR
& SCHWANHÄUSSER; Maximilianstrasse 58, 80538
München (DE).
- (81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,
CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE,
GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ,
LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN,
MW, MX, MZ, NO, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG,
SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN,
YU, ZA, ZW.
- (84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW),
eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK,
ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR),
OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

- ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts
- mit dem Sequenzprotokollteil der Beschreibung in elektronischer Form getrennt veröffentlicht; auf Antrag vom Internationalen Büro erhältlich

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: DETECTION OF PATHOGENIC BACTERIA

(54) Bezeichnung: NACHWEIS VON PATHOGENEN BAKTERIEN

(57) Abstract: The invention relates to oligonucleotides, which can be used to detect pathogenic bacteria. Said oligonucleotides assist in a method which enables pathogenic bacteria to be selected from non-pathogenic bacteria. The detection of the bacteria preferably includes a polymer chain reaction (PCR). The invention also relates to oligonucleotides, which can be used as a positive test for the PCR.

(57) Zusammenfassung: Gegenstand der Erfindung sind Oligonukleotide, die zum Nachweis von pathogenen Bakterien verwendet werden können. Mit Hilfe dieser Oligonukleotide kann ein Verfahren angewendet werden, das die Auswahl von pathogenen Bakterien aus nicht-pathogenen Bakterien ermöglicht. Bevorzugt schliesst der Nachweis der Bakterien eine PCR ein. Es werden auch Oligonukleotide bereitgestellt, die als Positivkontrolle für die PCR verwendet werden können.



WO 02/053771 A2

Nachweis von pathogenen Bakterien

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zum Nachweis von EHEC-Bakterien sowie hierfür geeignete Oligonukleotide.

Im Zeitalter weltweiten Transports und rationeller Verarbeitungsmethoden wächst die Bedeutung der durch Lebensmittel übertragenen pathogenen Bakterien. Häufig werden Rohstoffe aus vielen Landesteilen an einem zentralen Ort gesammelt, durchmischt und zu einem bestimmten Lebensmittel verarbeitet. Wenn eines der Rohprodukte Träger eines pathogenen Keimes war, dann kann sich dieser während des Produktionsprozesses vermehren und zur Kontamination einer großen Lebensmittelcharge führen.

Escherichia coli ist in diesem Zusammenhang als sehr wichtiger pathogener Keim aufgetreten. Hinter *Campylobacter* und *Salmonella* ist es der dritthäufigste lebensmittelverderbende Keim. Das Bakterium kommt normaler Weise als harmloser Kommensale im Darm des Menschen vor. Es kann jedoch bestimmte Pathogenitätsgene aufnehmen und dann zu einer todbringenden Gefahr werden. So sind eine ganze Reihe von *E. coli*-Subtypen charakterisiert worden, die ein hohes pathogenes Potential besitzen. Dazu zählen die Shigella-Stämme, die eigentlich systematisch *E. coli* zuzuordnen sind. Des Weiteren zu nennen seien EPEC (enteropathogene *E. coli*), die insbesondere bei Säuglingen Durchfallerkrankungen verursachen, ETEC (enterotoxinogene *E. coli*), die extrazelluläre hitzestabile und hitzelabile Toxine bilden und im wesentlichen für die Reisediarrhoe verantwortlich sind und EIEC, die in Darmschleimhautzellen eindringen und eine Bakterienruhr verursachen.

Eine besonders gefährliche Gruppe pathogener *E. coli*-Stämme sind die EHECs (enterohämorrhagische *E. coli*). Zur Gruppe der EHECs ist auch der besonders häufig auftretende Serotyp O157:H7 zu zählen. Dieser, wie auch die übrigen Mitglieder der Gruppe, können das hämolytisch-urämische Syndrom (HUS) verursachen, das zum Tode führen kann. HUS ist begleitet von blutigem Durchfall und akutem Nierenversagen.

Das endemische Vorkommen der EHECs beschränkt sich in der Natur weitgehend auf Rinder, wenn auch andere Quellen, insbesondere Schweine als Reservoir dokumentiert sind. Infolge dessen sind verarbeitete Rindfleischprodukte, unter diesen besonders das Hackfleisch, häufig mit EHECs kontaminiert. In einigen Lebensmitteluntersuchungen waren mehr als 50% der Hackfleischproben EHEC-positiv. Es wurden in den letzten Jahren auch andere Lebensmittel, wie Salate, Radieschen, Milch und Milchprodukte als EHEC-Quellen identifiziert.

In den USA kamen in der letzten Dekade jährlich mehr als 20000 *E. coli* O157:H7-Infektionen vor (Boyce et al. 1995, N.Engl. J. Med. 333, 364-368), von denen ca. 250 tödlich ausgingen. Aufgrund mangelnder Diagnostik können die realen Zahlen jedoch noch viel höher liegen. In Europa und Japan werden *E. coli* O157:H7-Infektionen primär im Sommer berichtet. Demgegenüber sind in der südlichen Hemisphäre nicht-O157 EHEC-Serotypen von besonders großer Bedeutung.

Das pathogene Potential eines EHEC-Stammes wird durch seine Pathogenitätsfaktoren bestimmt. So ist das Vorkommen von Stt-Genen (Shiga-like toxin oder vtx = Verotoxinen) eine notwendige, jedoch keine hinreichende Voraussetzung für Pathogenität. Zusätzlich sind andere Faktoren charakterisiert worden (Nataro und Kaper 1998, Clin.Microb.Rev. 11, 142-201), die notwendig sind, um den Wirt zu infizieren. Viele dieser Faktoren sind nicht konstant im Genom kodiert, sondern liegen auf transferierbaren Plasmiden oder in Phagengenomen. Deshalb kann auch die Ausstattung von EHEC-Stämmen mit Pathogenitätsfaktoren einer zeitlichen Variabilität unterliegen.

Der sichere diagnostische Nachweis von EHEC-Stämmen mit den bekannten Methoden verursacht große Probleme. So sind mikrobiologische Verfahren kaum geeignet einen sicheren Nachweis zu führen. Stoffwechselphysiologische Unterschiede zwischen apathogenen *E. coli* und pathogenen EHEC-Stämmen sind kaum vorhanden. Der für *E. coli* O157:H7 häufig charakteristische Defekt des uidA-Gens (β -Glucuronidase) (Cebula et al. 1995, J. Clin. Microb.33, 248-250), ist kein sicheres Merkmal der EHEC-Gruppe. Aus diesem Grunde müssen diagnostische Methoden auf molekularbiologische Merkmale zurückgreifen.

Eine in der Vergangenheit häufig verwendete Methode war die Serotypisierung durch einen ELISA. Diese weist jedoch viele Nachteile auf, da sie relativ zeitaufwendig ist und viele Arbeitsschritte erfordert. Außerdem ist ihre Sensitivität für viele diagnostische Anwendungen nicht ausreichend. Darüber hinaus ist der Serotyp alleine kein hinreichendes Merkmal für Pathogenität.

Eine weitere Methode *E. coli*-Stämme zu differenzieren besteht darin DNA-Sequenzunterschiede zu untersuchen. Die Vorgehensweise basiert insbesondere darauf, dass pathogene Stämme bestimmte Toxingene besitzen. So können z.B. die Shiga-ähnlichen Toxingene (Shiga-like toxins, *slt*, oder Verotoxingene, *vtx*) direkt nachgewiesen werden (Takeshi et al. 1997, *Microb. Immun.* 41, 819-822, Paton and Paton 1999, *J. Clin. Microb.* 37, 3362-3365). Die PCR kann angewendet werden, um Teile des Gens zu amplifizieren. Diese Fragmente können sichtbar gemacht werden, so dass sie als diagnostisches Merkmal dienen.

Der Nachteil dieses Verfahrens besteht darin, dass *Stx*-Gene keine ausreichende Voraussetzung für Pathogenität sind. Weitere DNA-Sequenz-Merkmale sind notwendig, um eine eindeutige Korrelation zwischen Genotyp und Pathogenität herzustellen. Die *E. coli*-Stämme, die *Stx*-Gene besitzen werden als VTEC (Verotoxin bildende *E. coli* oder STEC) bezeichnet. Sie bilden somit eine größere Gruppe als die EHEC.

Es wurden auch andere genetische Marker für EHEC oder Untergruppen aus diesen erprobt. Hierzu zählen das *fimA*-Gen (Li et al. 1997, *Mol. Cell. Probes*, 11, 397-406) und das *fliC*-Gen (Fields et al. 1997, *J. Clin. Microb.* 35, 1066-1070). Sie haben jedoch alle den Nachteil nur einen Teil der EHEC-Gruppe abzubilden.

Da die EHEC-Gruppe phylogenetisch keine systematische Einheit bildet, stellt sich die schwierige Aufgabe, genetische Polymorphismen zu finden, durch welche sie eindeutig charakterisiert ist. Diese Polymorphismen sollten zudem so zuverlässig sein, dass sie auch Heterogenitäten und genetische Instabilitäten innerhalb der EHEC-Gruppe erfassen. Neben dem spezifischen Nachweis sollten sie einen möglichst sensitiven Nachweis der EHEC erlauben.

Es gibt bereits einige Nachweissysteme für als EHECs klassifizierte *E. coli*. Soweit diese auf einer immunologischen Detektion beruhen, ist ihre Sensitivität jedoch nicht ausreichend. Außerdem sind Antikörpernachweise sehr empfindlich gegenüber externen Verunreinigungen. Extrakte aus Lebensmittel sind sehr problematisch, da sie die antigenen Oberflächen der Bakterien verdecken oder gar zerstören. Soweit dennoch einige Oberflächenantigene zur Exposition gelangen sind es häufig zu wenige, um mit ausreichender Sensitivität einen sicheren Nachweis zu gewährleisten.

Der vorliegenden Erfindung lag das technische Problem zugrunde, ein Verfahren anzugeben, das den sicheren Nachweis von EHEC-Bakterien in einer beliebigen Probe gewährleistet und das möglichst geringen Beeinträchtigungen durch weitere Probenbestandteile, wie PCR-Inhibitoren, der DNA nicht-pathogener Bakterien oder dem Quenching-Phänomen (s. Kapitel „Optimierung der Online-PCR“) unterliegt. Ferner lag der vorliegenden Erfindung das weitere Problem zugrunde, die für den EHEC-Nachweis erforderlichen Mittel zur Verfügung zu stellen.

Das erste Problem wird erfindungsgemäß gelöst durch ein Verfahren zum Nachweis von EHEC-Bakterien, umfassend den Schritt des Nachweises des Vorkommens einer Nukleinsäuresequenz aus dem *Stx*-Locus und/oder *eae*-Locus und/oder *hlyA*-Locus in der Probe.

Das zweite Problem wird erfindungsgemäß gelöst durch ein Oligonukleotid, ausgewählt aus einer der Nukleinsäuren umfassend mindestens eine Sequenz mit einer der SEQ ID Nummern 1 – 98 und/oder Derivaten hiervon.

Definitionen:

Fragmente von Oligonukleotiden:

Fragmente von Oligonukleotiden entstehen durch Deletion von einem oder mehreren Nukleotiden am 5'- und/oder 3'- Ende eines Oligonukleotids.

Gen:

Das Gen umfasst den offenen Leserahmen oder kodierenden Bereich einer DNA. Auch das Cistron ist ein Gen, das zusammen mit anderen Cistrons jedoch auf einer mRNA liegt. DNA-Regionen, die die Transkription des Gens regulieren, wie der Promotor, Terminator, Enhancer gehören ebenfalls zum Gen.

Identische DNA-Sequenzen / Prozent Identität

Zur Bestimmung der Identität (im Sinne von vollständiger Übereinstimmung, entsprechend 100 % Identität) von DNA oder RNA-Sequenzen werden Teilsequenzen eines größeren Polynukleotids betrachtet. Diese Teilsequenzen umfassen 10 Nukleotide und sind dann identisch, wenn alle 10 Bausteine bei zwei Vergleichssequenzen identisch sind. Die Nukleotide Thymin und Uridin seien identisch. Als Teilsequenzen können alle möglichen Fragmente eines größeren Polynukleotids betrachtet werden.

Als Beispiel seien zwei Polynukleotide betrachtet, die 20 Nukleotide umfassen und sich in dem 5. Baustein unterscheiden. In einem Sequenzvergleich findet man dann sechs 10-er Nukleotide, die identisch sind und 5, die nicht identisch sind, da sie sich in einem Baustein unterscheiden.

Außerdem kann die Identität graduell bestimmt werden, wobei die Einheit in Prozent angegeben wird. Zur Bestimmung des Grades der Identität werden auch Teilsequenzen betrachtet, die minimal die Länge der tatsächlich genutzten Sequenz, z.B. als Primer, oder aber 20 Nukleotide umfassen.

Als Beispiel werden Polynukleotide A mit einer Länge von 100 Nukleotiden und B mit einer Länge von 200 Nukleotiden verglichen. Aus Polynukleotid B wird ein Primer abgeleitet mit einer Länge von 14 Nukleotiden. Zur Bestimmung des Grades der Identität wird Polynukleotid A mit dem Primer in seiner ganzen Länge verglichen. Wenn die Sequenz des Primers in Polynukleotid A vorkommt, wobei sie aber in einem Baustein abweicht, dann gibt es ein Fragment mit einem Identitätsgrad von 13:14 \rightarrow 92,3 %.

Im zweiten Beispiel werden die zuvor genannten Polynukleotide A und B in ihrer Gesamtheit verglichen. In diesem Fall werden alle möglichen Vergleichsfenster einer Länge von 20 Nukleotiden angelegt und für sie der Identitätsgrad bestimmt. Sind also Nukleotid Nr. 50-69 von Polynukleotid A und B mit Ausnahme von Nukleotid Nr. 55 identisch, dann ergibt sich für diese Fragmente ein Identitätsgrad von 19:20 \rightarrow 95 %.

Multiplex-PCR

Eine Multiplex-PCR sei eine Polymerase-Kettenreaktion oder DNA- oder RNA-Amplifikationsreaktion, in welcher mehr als zwei Primer verwendet werden, die nicht als Vorwärts-Rückwärts-Primerpaar angesehen werden. Dies führt bei Anwesenheit aller nachzuweisenden Nukleotidzielmoleküle zur Entstehung von mindestens zwei verschiedenen Amplikons. Diese Amplikons sollten sich zumindest in der Region, in welcher die Primer binden unterscheiden, sie können jedoch auch völlig unterschiedlichen Genen zuzuordnen sein. Im Falle des Nachweise der EHEC besteht die Multiplex-PCR im gleichzeitigen Nachweis von zwei oder drei Genen aus der Gruppe StI, StII, eae und hlyA.

Nukleotide

Nukleotide sind die Bausteine der DNA oder RNA. Dabei bedeuten die Abkürzungen:

G = Guanosin, A = Adenosin, T = Thymin, C = Cytidin, R = G oder A, Y = C oder T, K = G oder T, W = A oder T, S = C oder G, M = A oder C, B = C, G oder T, D = A, G oder T, H = A, C oder T, V = A, C oder G, N = A, C, G oder T, I = Inosin.

Online-Detektion:

Online-Detektion ist im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung definiert als der simultane Ablauf von zwei Vorgängen: der Detektion von DNA oder RNA und einem Prozess, der zur Bereitstellung einer detektierbaren Menge von DNA oder RNA führt. Bei diesem Prozess kann es sich z.B. handeln um die Freisetzung von genomischer DNA/RNA aus Zellen, um die Anreicherung von DNA/RNA aus einem komplexen Gemisch oder um die Amplifikation von Polynukleotiden z.B. durch eine PCR. Detektion sei die Wahrnehmung eines Signals, das mit dem Vorhandensein und eventuell der Menge von DNA/RNA korreliert. Im Falle der PCR kann ein solches Signal also mit zunehmender Amplifikation der Ziel-DNA steigen. Auch in miniaturisierter Form, z.B. auf einem Chip kann eine Online-Detektion durchgeführt werden. Das Signal kann z.B. durch fluoreszierende Moleküle einer Sonde, durch radioaktive Moleküle oder durch enzymgekoppelte Farb- oder Fluoreszenzintensivierung erzeugt werden.

Der Begriff Online-Detektion sei synonym zu Realtime-Detektion.

Primer:

Primer sind Oligonukleotide, die als Startermoleküle bei einer PCR dienen. Dabei hybridisieren sie an ein Zielmolekül, bei welchem es sich z.B. um DNA oder RNA handeln kann, und werden durch eine Polymerase verlängert. Sie können aber gleichzeitig auch als Sonde dienen.

Sonde:

Sonden sind Oligonukleotide, die an Ziel-DNA- oder RNA-Moleküle hybridisieren. Sie dienen der direkten oder indirekten Detektion dieser Ziel-DNA- oder RNA-Moleküle. Zu diesem Zweck können sie mit fluoreszierenden oder farbstoffhaltigen Molekülen gekoppelt sein. Außerdem können sie indirekt in einem ELISA nachgewiesen werden. In einer speziellen Ausführung erzeugen sie durch FRET (Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer) nur dann ein Signal, wenn zwei Sonden in definierter Weise benachbart hybridisieren. In diesem Fall wird ein Farbstoff auf einer Sonde durch einen Lichtstrahl angeregt und überträgt seine Anregungsenergie auf den Farbstoff der benachbarten Sonde. Diese emittiert daraufhin Licht einer definierten Wellenlänge. Sie können gleichzeitig als Primer dienen.

EHEC und VTEC

EHEC sind enterohämorrhagische *E. coli* und eine Subgruppe der VTEC. *E. coli* des Serotyps O157 seien eine Subgruppe der EHEC.

VTEC zeichnen sich dadurch aus, dass sie entweder das *StxI* (*vtx1*) oder das *StxII* (*vtx2*) oder beide Gene besitzen. EHEC sind VTEC, die zusätzlich das *eae*-Gen und/oder *hlyA*-Gen (kodiert für Intimin) besitzen. Außerdem können sie durch das Vorhandensein weiterer Pathogenitätsgene, wie *hlyB*, *hlyC*, *finA*, *fliC* u.a. charakterisiert werden.

Stx-Locus

Stx-Locus bedeutet den Locus enthaltend das *StxI*-Gen bzw. *StxII*-Gen, welche auch als *vtxI*-Gen bzw. *vtxII*-Gen bezeichnet werden. Die Nukleinsäuresequenz dieses Locus ist aus dem Stand der Technik bekannt, beispielsweise aus Paton, A.W. et al. 1995, *Gene* 153 (1), 71-74. Der Begriff „Locus“, wie in diesem Zusammenhang verwendet, umfasst neben dem kodierenden Bereich weiterhin einen Abschnitt von jeweils 1000 Nukleotiden am 5'-Ende vom Startcodon bzw. am 3'-Ende vom Stopcodon.

eae-Locus und hlyA-Locus

Die Sequenzen des eae-Locus bzw. hlyA-Locus sind ebenfalls aus dem Stand der Technik bekannt, wie beispielsweise aus Makino, K., et al. 1998, DNA Res. 5 (1), 1-9.

Derivate der erfindungsgemäßen Oligonukleotide

Als Derivate der erfindungsgemäßen Oligonukleotide werden Sequenzen verstanden, die sich in mindestens einem Nukleotid von den spezifischen Sequenzen nach SEQ ID Nummern 1 – 98 unterscheiden, beispielsweise durch mindestens einen Basen-austausch, eine Insertion, Deletion oder Addition. Hierunter fallen auch Oligonukleotide, die zu mindestens 80 % identisch sind zu einer der spezifischen Sequenzen gemäß SEQ ID Nummern 1 – 98 sowie Oligonukleotide mit einer vergleichbaren Spezifität der Hybridisierung. Letzteres bedeutet, dass das Derivat das gleiche Hybridisierungsmuster mit einer vorgegebenen nukleinsäurehaltigen Probe ergibt, wie das Oligonukleotid mit einer der spezifischen Sequenzen mit einer der SEQ ID Nummern 1 – 98.

Biochip

Unter Biochip werden Träger für den Hochdurchsatz an Analysen verstanden, wie sie beispielsweise von AFFYMETRIX vertrieben werden. Die Chips ermöglichen das Austesten von zahlreichen verschiedenen Nukleinsäuren auf einem Trägers.

Die Analytik von DNA weist wesentliche Vorteile gegenüber dem serologischen Nachweis auf, da es für die DNA-Analytik standartisierte, einfache Reinigungsverfahren gibt, mit denen DNA von externen Matrices getrennt und aufgereinigt werden kann. Auf Grund der Größe des bakteriellen Genoms kann man außerdem aus einer beträchtlichen Zahl von individuellen Sequenzmotiven auswählen, während

die Auswahl der zuvor erwähnten exponierten Oberflächenantigene relativ gering ist.

Als Sequenzen zum spezifischen Nachweis von EHEC-Bakterien eignen sich Sequenzen aus dem *Stt*-Locus, dem *eae*-Locus und dem *hlyA*-Locus. Dabei reicht es für den Nachweis von EHEC in einer vorgegebenen Probe aus, wenn eine Teilsequenz aus dem *Stt*-Locus und einem weiteren der genannten Loci in der Analysenprobe nachgewiesen werden kann. Bei dem *Stt*-Locus handelt es sich tatsächlich um zwei verschiedene Genloci, *SttI* und *SttII*, wobei jedoch bei zahlreichen EHEC-Stämmen nur einer der beiden Loci vorkommt. Eine ausreichend hohe Aussagekraft besitzt der gleichzeitige Nachweis von Sequenzen aus dem *Stt*-Locus und dem *eae*-Locus in einer einzigen Probe. Eine ähnlich hohe Zuverlässigkeit besitzt der gleichzeitige Nachweis einer Sequenz aus dem *Stt*-Locus und dem *hlyA*-Locus. Ein besonders hoher Grad an Zuverlässigkeit hinsichtlich einer EHEC-Kontamination ist dann gegeben, wenn Sequenzen aus den drei verschiedenen Loci *Stt*, *eae* und *hlyA* gleichzeitig in einer Probe nachgewiesen werden.

Bei einer weiteren bevorzugten Ausführungsform wird die zu untersuchende Nukleinsäure einer PCR zugeführt. Diese hat zur Folge, dass EHEC-spezifische Amplicons erzeugt werden, sofern Nukleinsäuren von EHEC-Bakterien in der Probe vorliegen. Dabei lässt sich im einfachsten Fall die PCR als einfache lineare PCR mit nur einem Oligonukleotid als Primer ausgestalten, vorzugsweise erfolgt die PCR jedoch mit sog. Vorwärts- und Rückwärtsprimern für jeden zu amplifizierenden Genomabschnitt der bakteriellen Nukleinsäure.

Bei einer weiteren bevorzugten Ausführungsform wird eine Primerkombination eingesetzt, wobei mindestens ein Primer ausgewählt wird umfassend mindestens eine Sequenz aus einer der SEQ ID Nummern 1 – 45 und 95 – 98, auch als Sequenzen der Kategorien A - C bezeichnet, und einem Primer, umfassend mindestens eine Sequenz ausgewählt aus einer der SEQ ID Nummern 46 – 83 und 93 und 94, auch als Sequenzen der Kategorien D und E bezeichnet. Erfindungsgemäß lassen sich für den Nachweis auch Derivate der genannten Primer einsetzen. Die Derivate führen in der Regel zur Amplifikation der gleichen Genomabschnitte wie die konkreten Primer gemäß der SEQ ID Nummern 1 - 98 angegeben.

Bei einer weiteren bevorzugten Ausführungsform wird ein Primerpaar bestehend aus einem Vorwärtsprimer und einem Rückwärtsprimer, ausgewählt aus der Kategorie A - C, mit einem Primerpaar umfassend einen Vorwärtsprimer und einen Rückwärtsprimer, ausgewählt aus der Kategorie D und E, eingesetzt. Eine bevorzugte Ausführungsform verwendet ein Primerpaar aus einer der Kategorie A – C in Kombination mit einem Primerpaar aus Kategorie D und einem weiteren Primerpaar aus Kategorie E.

Bei einer weiteren bevorzugten Ausführungsform umfasst der Nachweis den Einsatz eines weiteren Primers umfassend mindestens eine Sequenz, ausgewählt aus einer Sequenz der Kategorie F. Diese Sequenzen sind charakteristisch für die Gattung *E. coli*. So kann beispielsweise bei einer bevorzugten Strategie des EHEC-Nachweises die Analysenprobe zunächst mit einer Sequenz, ausgewählt aus der Kategorie F analysiert werden. Ein positives Ergebnis deutet auf das Vorliegen von *E. coli* in der Analysenprobe hin. In einem zweiten Schritt lässt sich dann näher spezifizieren unter Einsatz der Sequenzen aus den Kategorien A – E, ob es sich bei dem nachgewiesenen *E. coli* um ein Mitglied der EHEC-Gruppe handelt. Die zusätzliche Analyse mit Sequenzen aus der Kategorie F könnten natürlich auch als zusätzliche Maßnahme nach der Analyse mit den Sequenzen aus den Kategorien A – E erfolgen.

Bei einer weiteren bevorzugten Ausführungsform werden die verschiedenen Oligonukleotide und somit die verschiedenen PCR-Ansätze in Form einer Multiplex-PCR durchgeführt. Dabei werden in einem einzigen Reaktionsansatz mit Hilfe der verschiedenen Oligonukleotide verschiedene Amplikons in der PCR erzeugt. Alternativ lässt sich die Multiplex-PCR auch aufteilen auf verschiedene PCRs, wobei eine sequenzielle Abfolge von PCR durchgeführt wird, wobei jede PCR mit einem spezifischen Primer bzw. Primerpaar durchgeführt wird. In beiden Fällen wird bei Vorliegen von EHEC-Bakterien in der Analysenprobe ein Bandenmuster erhalten, das das Vorhandensein von EHEC-Bakterien anzeigt.

Bei einer weiteren bevorzugten Ausführungsform wird in dem Nachweisverfahren von der sog. Chip-Technologie (Biochips) Gebrauch gemacht. Dabei lässt sich ei-

nerseits eine Vielzahl an verschiedenen Analysenproben auf einem Chip analysieren, indem die einzelnen Spots auf dem Chip-Analysenmaterial aus verschiedenen Quellen enthalten. Andererseits kann der Chip einen Satz Oligonukleotide tragen, wobei jeder Spot ein spezifisches Oligonukleotid enthält und dieses Oligonukleotidmuster mit Analysenproben in Kontakt gebracht wird. Falls das Analysenmaterial EHEC-Nukleinsäure enthält, hybridisiert diese mit den auf den auf dem Chip vorgelegten EHEC-spezifischen Sonden und ergibt ein entsprechendes Signalmuster.

Bei einer weiteren bevorzugten Ausführungsform kann der Nachweis weitere Schritte umfassen, wie z. B. eine Amplifikation der nachzuweisenden Nukleinsäure, wobei diese vorzugsweise mittels PCR erfolgt und/oder eine Southernhybridisierung mit EHEC-spezifischen Sonden, wobei diese Hybridisierung ohne vorherige Amplifikation oder nach erfolgter Amplifikation der nachzuweisenden Nukleinsäure erfolgt. Weiterhin lässt sich die nachzuweisende Nukleinsäure mittels der Ligasekettenreaktion nachweisen. Schließlich kann die nachzuweisende Nukleinsäure mittels isothermer Nukleinsäureamplifikation angereichert werden.

Bei einer weiteren bevorzugten Ausführungsform lässt sich das Amplifizieren der Zielnukleinsäure auch mittels einer Online-Detektion verfolgen.

Bei einer weiteren bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Amplifikation der nachzuweisenden Nukleinsäure und/oder die Detektion der erhaltenen Amplikons auf einem Biochip, wobei es besonders bevorzugt ist, die Amplifikation und Detektion auf einem Chip durchzuführen.

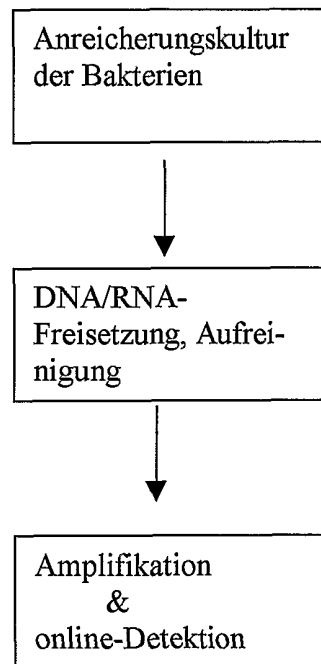
Erfindungsgemäße Mittel zum Durchführen des oben beschriebenen Verfahrens sind Oligonukleotide ausgewählt aus einer Nukleinsäure, umfassend mindestens eine Sequenz mit einer der SEQ ID Nummern 1 – 98 oder Derivate hiervon. Die genannten Oligonukleotide lassen sich einerseits als Primer im Rahmen einer PCR einsetzen und andererseits auch als Sonden, beispielsweise im Rahmen einer Southernblot hybridisierung. Je nach den Bedürfnissen des gewünschten Nachweises kann der Fachmann die geeignete Kombination an Oligonukleotiden als Primer bzw. Sonden zusammenstellen.

Bei einer besonders bevorzugten Ausführungsform wird eine Kombination aus Oligonukleotiden eingesetzt, wobei mindestens ein Oligonukleotid ausgewählt wird aus Sequenzen der Kategorie A - C und mindestens ein Oligonukleotid ausgewählt wird aus Sequenzen der Kategorie D und E.

Bei einer weiteren besonders bevorzugten Ausführungsform umfasst die erfindungsgemäße Kombination weiterhin ein Oligonukleotid ausgewählt aus Sequenzen der Kategorie F, welche spezifisch für die Gattung *E. coli* sind. Vorzugsweise kommen die genannten Oligonukleotide bzw. Kombinationen davon in Form eines Kits zum Nachweis von EHEC-Bakterien zum Einsatz, wobei der Kit auch weitere Reagenzien zum Nachweis der Bakterien bzw. zum Durchführen der Nachweisreaktionen umfasst. Hierzu zählen beispielsweise die für die PCR erforderlichen Reagenzien und Enzyme und ggf. geeignete Trägermaterialien, wie beispielsweise bei der Chip-Technologie gewünscht.

Die erfindungsgemäßen Oligonukleotide bzw. Oligonukleotidkombinationen sind somit ein geeignetes Mittel zum spezifischen und sicheren Nachweis von EHEC-Bakterien in beliebigen Analysenproben.

Mit der Erfindung der Polymerasekettenreaktion ist es möglich einzelne DNA-Polynukleotide zu amplifizieren, und anschliessend mit extrem hoher Empfindlichkeit nachzuweisen. Diese Technik eröffnet große neue Möglichkeiten, birgt in sich jedoch auch neue Probleme. So können bei der DNA-Amplifikation leicht falsche Fragmente amplifiziert werden, die zu falsch-positiven Ergebnissen in der Analytik führen. Außerdem ist es sehr schwierig aus der Fülle der Möglichkeiten die diagnostischen DNA-Sequenzen auszuwählen, die charakteristisch für EHEC sind.



Schema des Nachweises von EHEC durch PCR und simultane Detektion

Die vorliegende Erfindung besteht in Verfahren und Oligonukleotiden, die einen qualitativen und quantitativen Nachweis der EHEC erlauben. Dieses Verfahren beinhaltet auch eine Positivkontrolle für die PCR-Reaktion, die die Gattungen *E. coli* und *Shigella* nachweist. Dies ist wichtig, da bei negativen EHEC-Befunden der korrekte Ablauf der PCR-Reaktion sichergestellt sein muss. Das Nachweisverfahren besteht im Ganzen aus vier Schritten: Vermehrung der Bakterien, Aufreinigung der DNA/RNA, Amplifikation der Polynukleotide und Detektion derselben. In einem besonderen Verfahren können die beiden letzteren Schritte auch simultan erfolgen.

Die Vermehrung der Bakterien erfolgt indem die zu untersuchende Matrix, z.B. ein Lebensmittel oder Fäkalproben, mit einem gängigen bakteriellen Medium inkubiert werden. Bakterielle Medien sind kommerziell erhältlich und können z.B. eine proteolytisch verdaute Grundsubstanz, wie Sojabouillon, Gallensalze, und einen Puffer, wie Dikaliumhydrogenphosphat, enthalten. Außerdem ist es vorteilhaft dem Anreicherungsmedium einen Inhibitor zuzusetzen, welcher das Wachstum der EHEC gegenüber anderen Bakterien im Anreicherungsmedium begünstigt. Solche Inhibitoren können Antibiotika, wie z.B. Novobiocin sein.

Im zweiten Schritt werden die Polynukleotide aufgereinigt. Hierzu werden die Bakterien i.d.R. zunächst durch Zentrifugation und/oder Filtration vom Medium getrennt. Es kann ein weiterer Waschschrift erfolgen. Anschließend werden die Bakterien aufgeschlossen. Dies erfolgt durch Erhitzen, durch ein alkalisches oder saures Milieu oder durch Reagenzien, die die Bakterienzellwand destabilisieren, wie deionisierende Chemikalien oder Lysozym. Die genomische DNA bzw. die RNA kann nun direkt in eine PCR-Reaktion eingesetzt werden, oder sie wird weiter aufgereinigt. Für diese Aufreinigung geeignet sind Materialien, an deren Oberfläche die Polynukleotide binden, wie z.B. positiv geladene Oberflächen oder Silikat-Oberflächen. Dieses Material kann in Säulen eingebaut sein und ist kommerziell erhältlich.

Die größte Bedeutung beim Nachweis der Bakterien kommt der PCR-Reaktion und der Detektion der Amplikons zu. Wie bereits zuvor erläutert ist es sehr schwierig, Unterschiede in DNA-Sequenzen zwischen EHEC und anderen Bakterien, insbesondere harmlosen *E. coli*-Stämmen zu finden. Eine singuläre PCR-Reaktion mit der Amplifikation eines einzigen DNA- oder RNA-Bereiches alleine scheint kein sehr sicheres Fundament der Stammabgrenzung zu bilden. Ein bevorzugtes Element der Erfindung besteht darin, das verschiedene Bereiche des EHEC-Genoms simultan und/oder sequenziell amplifiziert werden. Vorzugsweise werden zur abschließenden Analyse weitere DNA/RNA-Sequenzen dann in einem konsekutiven Schritt amplifiziert. Wenn alle signifikanten Amplikons simultan detektiert werden können, z.B. auf einem Chip, dann können der „erste“ Amplifikationsschritt und der „konsekutive“ Amplifikationsschritt auch in einer einzigen PCR-Reaktion, bzw. in einem einzigen PCR-Reaktionsgefäß ablaufen. Der Schlüssel zur Verwendung der Primer und Sonden ist nachfolgend gegeben.

Das System zur Detektion von EHEC stellt Primer zur Verfügung, die in bestimmten Kombinationen die Gruppe der EHEC optimal abbilden. Der Nachweis wird z. B. in zwei unabhängigen PCR-Läufen in Primer-Multiplexansätzen durchgeführt. In einem ersten Lauf werden Primer und Sonden der Kategorie A, B und/oder C eingesetzt. In dem zweiten Lauf werden nur Proben verwendet, die im ersten Lauf positiv waren. In diesem zweiten Lauf werden Primer und Sonden der Kategorien D

und E verwendet. Innerhalb einer Kategorie sind jeweils ein Vorwärtsprimer und ein Rückwärtsprimer miteinander kombinierbar. Es werden also Multiplex-PCRs durchgeführt, in denen in einer Reaktion gleichzeitig mehrere Ziel-DNA- oder -RNA-Fragmente vermehrt werden. Auf Grund dieses Vorgehens lässt sich ein sehr differenziertes Bild von der vorliegenden bakteriellen Population gewinnen. Je nach den praktischen Anforderungen an die Sensitivität des EHEC-Nachweises und wenn die simultane Detektion möglich ist, können auch alle Nachweisprimer (für Kategorie A+B+C und D oder E und eventuell Kategorie F) in einer einzigen Multiplex-PCR eingesetzt werden.

Tab.1: Vorwärtsprimer Kategorie A

Nr.	Sequenz des Primers
1	CTGGGGAAGGTTGAGTAG
2	GTCCTGCCTGAYTATCATGG
3	ACAAGACTCTGTTCGTGTAGG
4	AAGAATTTCTTTTGRAAGYRTTAATGC
5	AATTCTGGGWAGCGTGGCATTAAACTG

Tab.2: Rückwärtsprimer Kategorie A

Nr.	Sequenz des Primers
6	CCCACTTTAACTGTAAAGGT
7	CGTCATCATTATATTTTGTATACTCCACC
8	CACTTGCTGAAAAAATGAAAG

Tab.3: Sonden Kategorie A

Nr.	Sequenz der Sonde	Sondenpaar
9	AGCGTGGCATTAACTGAATTGTCA	1
10	ATCATGCATCGCGAGTTGCCAGAAT	1
11	GTCCTGCCTGAMTATCATGGACAAGACTCT	2
12	TTCGTGTWGGAAGAATTTCTTTTGRAAGYRTTAAT	2
13	ATGAGTTTCCTTCTATGTGYCCGGYAGATGGAA	3
14	TCCGTGGGATTACGCACAATAAAATATTTGTGGGATT	3
15	AAAYATTATTAATAGCTGCATCRCTTTCATTT	4
16	TTCAGCAAGTGYGCTGGCKRCGCCWGATTCTGTA	4,5
17	ACTGGRAAGGTGGAGTATACAAAATATAATGAT	5
95	ATTAAYRCTTYCAAAGAAATTCTTCC	6
96	CAGTATTAATGCCACGCTWCCCAGAATT	6
97	CCTTCTATGTGYCCGGYAGATGGAA	7
98	TSCGTGGGATTACGCACAAT	7

Tab.4: Vorwärtsprimer Kategorie B

Nr.	Sequenz des Primers
18	GGCACTGTCTGAAACTGCT
19	GAAACTGCTCCTGTKTATAC
20	GATGACRCCGGRAGAMGTG
21	CTGAACTGGGGGMGAATCAGCAATGTG

Tab.5: Rückwärtsprimer Kategorie B

Nr.	Sequenz des Primers
22	YGCCATTGCATTAACAGA
23	GCWGCKGTATTACTTTCCCATAA
24	GGCCTGTGCGCCAGTTATCTGACATTCTGGTTG
25	TCTCTTCATTACGGCGCG

Tab.6: Kategorie C Vorwärtsprimer

Nr.	Sequenz des Primers
26	GGCGCTGTCTGAGGCATCT
27	GAGGCATCTCCGCTTTATAC
28	AATGACGGCTCAGGATGTT
29	CTGAACTGGGGAAGAATAAGTAATGTT

Tab.7: Kategorie C Rückwärtsprimer

Nr.	Sequenz des Primers
30	GCAGCGATTGTATTCGCTTCCCACAAAACA
31	GCCCTGTCTCCAACAATCTGGCATTCTGTTTT
32	CTGTTTTTGGCTCACGGAACG
33	CGCCATGGAATTAGCAGAAAAG

Tab.8: Sonden Kategorie B

Nr.	Sequenz der Sonde	Sondenpaar
34	CCCCAGTTCAGWGTGAGGTCC	1
35	CCGGAAGCACATTGCTGATTC	1
36	GAATATCCTTTAATAATATATCAGCGATACTKGG	2
37	WGTGGCSGTTATACTGAATTGYCATCATCAGGG	2

38	CGTTCYGTTCGCKCCGTGAATGAAGAKA	3
39	CAACCAGAATGTCAGATAACTGGCGACAGGCC	3

Tab.9: Sonden Kategorie C

Nr.	Sequenz der Sonde	Sondenpaar
40	CCCCAGTTCAGGGTAAGGTCA	1
41	CTGGAAGAACATTACTTATTC	1
42	AGGATATCTTTTAATAGTCTTTCTGCGATTCTCGG	2
43	TGTTGCGGTCATCCTTAATTGCCACTCAACCGG	2
44	TTATTCAGTTCGTTCCGTGAGCCAAAAC	3
45	AAACAGAATGCCAGATTGTTGGAGACAGGGC	3

Tab.10: Kategorie D Vorwärtsprimer

Nr.	Sequenz des Primers
46	CATGCTGCITTTTTAGAAGA
47	CATGCTGCRTTTTAGAAGA
48	CATGCTGCITTTTTAGAAGACTCT
49	CATGCTGCRTTTTAGAAGACTCT
50	AATGAATGGGAAAAGGAGCATGGC
51	CTCTCTGTCTTTGCTTGCTGATT
52	CTCGTCAGCATGCAGTAGAAAGAGCAGTCG
53	CATTGGGATGAGAAGATCGGTGAACTTGACAGG

Tab.11: Kategorie D Rückwärtsprimer

Nr.	Sequenz des Primers
54	CGTCTTTATCTCCGAGYTCAG
55	ACATCGTCTTTATCTCCGAGYTCAG
56	TTTACCAACATCCGTCTTATTATAAGATACGG
57	CCTTCACCAGCAAATACTTCTG
58	TGAGCCTGCTCCAGAATAAACC
59	TCAATTTTGAATAATCATATACA

Tab.12: Sonden Kategorie D

Nr.	Sequenz der Sonde	Sonden- paar
60	AGAGAAAGAAAACAGAGTGGTAAATATGAATATATGACAT	1
61	TCTTATTGTAAATGGTAAGGATACATGGTCTGTAAAAG	1
62	GGGACCATAGACCTTTCAACAGGTAATGTATCAAGTGTTTT	2
63	ACATTTATAACACCAACATTTACCCCAGGAGAAGAAG	2
64	GGCATATATTAATTATCTGGAAAATGGAGGGCTTTTAGAGGC	3
65	CAACCGAAGGAGTTTACACAACAAGTGTTTGATCCTC	3
66	CATTGGGATGAGAAGATCGGTGAACTTGCAGGCAT	4
67	AACCCGTAATGCTGATCGCAGTCAGAGTGGTAAGGC	4

Tab.13: Kategorie E Vorwärtsprimer

Nr.	Sequenz des Primers
68	GGCCTGGTTACAACATTATGG
69	ACGCGAAAGATACCGCTCTTGGTAT
70	CCAGGCTTCGTCACAGTTGCA
71	GGAACGGCAGAGGTTAATCTGCAG
72	AGTGGTAATAACTTTGACGGTAGTTC

Tab.14: Kategorie E Rückwärtsprimer

Nr.	Sequenz des Primers
73	ATCCCCATCGTCACCAGA
74	AACATTATCACCATAATACTG
75	TAGTTTACACCAACGGTCGCCGC
76	CATTACCCGTACCATGACGGT
77	CGGAACTGCATTGAGTAAAGGAGATCA

Tab.15: Sonden Kategorie E

Nr.	Sequenz der Sonde	Sondenpaar
78	TCCAGTGAACTACCGTCAAAGTTATYACCAC	1
79	CCAGCATKTTTTCGGAATCATAGAACGGTAATAAGAA	1
80	ATGTTGGGCTATAACGTCTTCATTGATC	2
81	AGGATTTTTCTGGTGATAATACCCGT	2
82	AGGTATTGGTGGCGAATACTGGCGAGACTATTTCAAAGTAG	3
83	TTAACGGCTATTTCCGCATGAGCGGCTGGCATGAGTCATAC	3
93	TCCAGTGAACTACCGTCAAAGTTATYACCAC	4
94	CCAGCATKTTTTCGGAATCATAGAACGGTAATAAGAA	4

Zusätzlich zum Nachweis der EHEC ist es vorteilhaft den korrekten Ablauf des Verfahrens zu kontrollieren. Die vorliegende Erfindung gewährleistet diese Kontrolle, indem sie den gattungsspezifischen Nachweis von *E. coli* ermöglicht. So ist insbesondere eine Differenzierung gegenüber Enterobakterien, wie der Gattung *Citrobacter*, vorteilhaft, da diese Bakterien in vielen Fällen in einem horizontalen

Gentransfer Pathogenitätsgene von *E. coli* übernommen haben. Eine falsch-positive Klassifizierung als VTEC kann somit vermieden werden.

Da *E. coli* und Shigella in molekularbiologischer Betrachtungsweise und auch in vielen taxonomischen Einordnungen eine Einheit bilden, werden diese beiden Gattungen bei der Kontrolle nicht getrennt. Dies ist in der Praxis sehr sinnvoll, da in der mikrobiologischen Routinediagnostik in der Regel auch nicht mehr zwischen diesen Gattungen differenziert wird.

Tab. 16+17 enthält Primer, die den Nachweis von *E. coli* und Shigella erlauben. Für die Untersuchung können Aliquots der gleichen DNA/RNA-Proben verwendet werden wie für den EHEC-Nachweis. Außerdem ist es möglich die *E. coli*-Kontrollreaktion simultan, d.h. in einem Reaktionsgefäß zusammen mit dem EHEC-Nachweis, oder parallel durchzuführen. Des weiteren ist der *E. coli*/Shigella-Nachweis auch geeignet diese Gattungen von anderen zu unterscheiden.

Tab.16: Kategorie F Vorwärtsprimer

Nr.	Sequenz des Primers
84	CGG GTC AGG TAA TTG CAC AGT A
85	CGG GTC AGG TGA TTG CAC AGT A
86	CGG GTC AGG TGA TTG CAC AAT A
87	CGG GTC AGG TAA TTG CAC AAT A

Tab.17: Kategorie F Rückwärtsprimer

Nr.	Sequenz des Primers
88	GCA ACA GTT CAG CAA AGT CCA T

Tab.18: Sonden Kategorie F

Nr.	Sequenz der Sonde	Sondenpaar
89	CGG TGA AGC CAC CGA CAT CGT	1
90	TGG CAG GTT CCG GCC TTC ACT CTC	1
91	AAGCCACCGACATCGTG	2
92	AAGCCACTGACATCGTG	2

Der Nachweis der Amplikons kann durch Gelelektrophorese und Detektion der DNA-Banden erfolgen. Alternativ können die Amplikons mit Hilfe von Sonden detektiert und auch quantifiziert werden. Es gibt verschiedene Möglichkeiten die Sonden so zu modifizieren, dass eine direkte oder indirekte Visualisierung ermöglicht wird. So können sie mit einem Ankermolekül gekoppelt werden, das als Linker dient. Ein solches Ankermolekül kann z.B. ein Protein sein, dass von einem Antikörper erkannt wird. Dieser Antikörper kann mit einem Enzym gekoppelt sein, dass eine Farbreaktion hervorruft, wodurch die Detektion zustande kommt. z.B. wird die Peroxidase oder Katalase für diese Zwecke eingesetzt. Außerdem kann eine Sonde auch radioaktiv markiert werden, wobei die Messung der radioaktiven Aktivität zum Nachweis und zur Quantifizierung führt.

Eine weitere Möglichkeit besteht darin, ein fluoreszierendes Molekül an die Sonde zu koppeln. In diesem Fall muss gewährleistet sein, dass die Fluoreszenz nur emittiert oder detektiert wird, wenn die Sonde an einen Einzelstrang des Amplikons bindet. Dies kann erreicht werden, indem das Sonden-Amplikon-Hybrid von dem übrigen PCR-Gemisch getrennt wird. Z.B. können Sonden an feste Oberflächen gebunden werden, die Einzelstrangamplikons „einfangen“, wobei freie Sonden abgewaschen werden.

Eine elegante Methode besteht in der Online-Detektion der PCR-Produkte. In diesem Fall kommt es nur dann zu einem Fluoreszenzsignal, wenn eine fluoreszenzmarkierte Sonde an ein Amplikon anlagert. Dieses kann geschehen, indem der Sondenanteil des Amplikon-Sonden-Hybrids selektiv enzymatisch abgebaut wird. Auch kann durch die Entfaltung der Sonde, wenn sie sich an das Amplikon bindet, ein Quenching des Fluoreszenzsignals aufgehoben werden.

Eine weitere Möglichkeit ist, dass zwei fluoreszenzmarkierte Sonden eingesetzt werden. Nur wenn beide benachbart an ein Amplikon binden, kann ein sogenannter FRET (Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer) ein Signal erzeugen (Fig. 1). Dieses Verfahren hat den großen Vorteil, dass mehrere Spezifitätsebenen Bestandteil des Nachweises sind: erstens binden die Primer an ein bestimmtes Zielmolekül, zweitens müssen beide Sonden an das „richtige“ Amplikon binden und drittens dabei in der richtigen Reihenfolge nebeneinander liegen. Bei dieser benachbarten Anordnung ist außerdem der Abstand der Sonden für die erfolgreiche Emission des Signals entscheidend. Jedes dieser Erfordernisse leistet einen Beitrag zum Erhöhen der Spezifität des Nachweises.

Alternativ gibt es auch Fluoreszenzmoleküle, die in die DNA-Doppelhelix interkalieren und dann ein Signal emittieren. Dieser unspezifische Nachweis von PCR-Produkten hat jedoch den Nachteil, dass fehlerhafte Amplifikationsprodukte auch detektiert werden.

Die Durchführung der Untersuchung bedarf nach der obigen Beschreibung einer großen Zahl von Komponenten. Deshalb ist es besonders vorteilhaft diese in einer oder mehreren Verpackungseinheiten eines Kits anzubieten. Ein solches Kit kann also die Reagenzien und Chemikalien für die Bakterienanreicherung, die Komponenten für die DNA-Freisetzung und Reinigung, wie auch das Verbrauchsmaterial zur Durchführung der PCR und zur Detektion enthalten.

Figurenbeschreibung

Figur 1 zeigt chematisch das Prinzip des FRET

Figur 2 zeigt PCR-Produkte mit Primern der Kategorie D

Figur 3 zeigt PCR-Produkte mit Primern der Kategorie E

Figur 4 zeigt die Amplifikation und Realtime-Detektion der StII- und StIII-Gene bei EHEC-Stämmen.

Figur 5 zeigt die Amplifikation und Realtime-Detektion der eae-Gene bei EHEC-Stämmen in einer Multiplex-PCR-Reaktion zusammen mit den StI-Genen.

Die folgenden Beispiele erläutern die Erfindung

Die gezeigten Figuren 1 – 5 wurden unter folgenden Bedingungen erstellt:

- Figur 1: Es ist der schematische Ablauf des FRET gezeigt. Es stehen zahlreiche Kombinationen an Donor und Akzeptor zur Verfügung. Wichtig ist jedoch, dass sich das Absorptionsspektrum des Akzeptors mit dem Emissionsspektrum des Donors überlappt. Nur so ist sichergestellt, dass eine Anregung des Donors auch zu einer ausreichend starken Fluoreszenz beim Akzeptor führt.
- Figur 2: Nachweis von EHEC mit Primern der Kategorie D. Die Versuchsbedingungen entsprechen im Wesentlichen den im Kapitel „Nachweis von EHEC-Stämmen durch PCR“. Der Nachweis im Agarosegel erfolgte ebenfalls wie im obigen Kapitel beschrieben.
- Figur 3: Nachweis von EHEC mit Primern der Kategorie E. Die Versuchsbedingungen entsprechen im Wesentlichen den im Kapitel „Nachweis von EHEC-Stämmen durch PCR“. Der Nachweis im Agarosegel erfolgte ebenfalls wie im obigen Kapitel beschrieben.
- Figur 4: Diese zeigt die Amplifikation von StI- und StII-Genen durch Realtime-PCR. Verwendet wurden Sonden, die die Detektion sowohl der StI- als auch der StII-Gene erlauben. Diese wurden jeweils mit gleichen Fluoreszenzfarbstoffen (Lighcycler RED 640 und Fluorescein) gekoppelt, so dass die Detektion in nur einem Kanal (F2) erfolgt. Es ist zu erkennen, dass bei der Amplifikation der StII-Gene Signalkurven mit Amplituden entstehen, die größer als 14 sind. Die Signalkurven der StI-Gene liegen

signifikant tiefer. Wenn sowohl SltI- als auch SltII-Gene vorkommen, dann weist die Amplitude das höchste Niveau auf. Sie ist somit als Indikator für das Vorkommen und die Differenzierung zwischen den SltI- und SltII-Genen geeignet.

Aus Figur 4 ist auch zu sehen, dass je nach Verwendung verschiedener Sonden die Signalamplitude für die SltI-Gene unterschiedlich hoch ist. Für das abgebildete Experiment wurden die Primer Nr. 1+6 und Nr. 18+22, sowie die Sonden Nr. 9+10 (für Stamm-Nr. 1-10), Sonden Nr. 95+96 (für Stamm-Nr. 11-20), Sonden Nr. 97+98 (für Stamm-Nr. 21-30) und Sonden 34+35 (für Stamm Nr. 1-30) verwendet. Die Sonden waren mit den Farbstoffen Fluorescein und Lightcycler Red640 gekoppelt. Die Detektion erfolgte bei einer Lichtwellenlänge von 640 nm.

Es ist zu erkennen, daß die Sonden Nr. 97+98 bei Stämmen, die nur das Slt1-Gen (s. Tabelle S. 56) besitzen, die höchste Amplitude ergeben. Diese Sonden-Primerkombination ist für die online-PCR deshalb besonders gut geeignet. .

Nachweis der Slt-Gene: 25 (Slt2 ohne eae)// 5, 15 (Slt2 ohne eae), 3, 4 (Slt2+eae)// 2 (Slt2 ohne eae) 13, 14 (Slt2+eae)// 23 (Slt2+eae)//24 (Slt2+eae)//22 (Slt2 ohne eae)// 12 (Slt2 ohne eae)//28, 29, 30 (Slt1+eae), 27 (Slt1+eae), 26 (Slt1+Slt2+eae)//6, 16 (Slt1+Slt2+eae), 7, 8, 9, 10, 17, 18, 19, 20 (Slt1+eae)//1, 11, 21 (Wasser).

Figur 5: Sie zeigt die Amplifikation und Realtime-Detektion der eae-Gene bei EHEC-Stämmen in einer Multiplex-PCR mit den Slt-Genen (Fig.4).

Die Multiplex-Reaktion wurde zusammen mit den Sonden und Primern aus Fig. 4 durchgeführt. Für den Nachweis des eae-Gens wurden die Primer Nr. 68+73 und die Sonden Nr. 93+94 verwendet. Die Sonden Nr. 93+94 waren mit den Farbstoffen Fluorescein und Lightcycler Red705

gekoppelt. Die Detektion erfolgte bei einer Lichtwellenlänge von 710 nm.

Es sind zwei Kurvenscharen zu erkennen. Die Kurven mit Amplituden >5 zeigen ein positives Resultat für das *eae*-Gen. Hierbei handelt es sich um Stämme, die ein *eae*-Gen besitzen (s. Legende Fig.4, Tabelle S. 56). Die Kurven mit Amplituden <5 zeigen ein negatives Resultat (Wasserproben oder Stämme ohne *eae*-Gen (Proben 1, 11, 21, 5, 15, 25)).

Nachweis von VTEC-Stämmen durch PCR

Die vorliegende Erfindung ist geeignet zum Nachweis von VTEC-Stämmen durch die Polymerasekettenreaktion. Bezogen auf das gesamte Genom unterscheiden sich VTEC-Stämme nur geringfügig von herkömmlichen *E. coli*-Stämmen. Aus diesem Grunde ist es nicht einfach die DNA- oder RNA-Sequenzen zu identifizieren, die die VTEC-Gruppe eindeutig abbilden. Da die VTEC auch in sich Unterschiede, z.B. in den Serotypen aufweisen, ist ein einzelnes Sequenzmerkmal nicht geeignet einen eindeutigen Nachweis zu liefern.

Die Erfindung beruht darauf, dass eine Kombination von mehreren genotypischen Merkmalen z.T. simultan und soweit notwendig z.T. konsekutiv für den Nachweis genutzt wird. Außerdem werden Primer und Sonden bereitgestellt, die die Vorteile der PCR für die Amplifikation und Detektion der VTEC-Stämme nutzen.

Der Nachweis der VTEC-Stämme kann in verschiedenen Schritten, umfassend Bakterienanreicherung, DNA-/RNA-Freisetzung und Isolierung, PCR und (eventuell simultan) Nachweis der Amplikons erfolgen.

Zur Anreicherung werden die Bakterien in 2 ml LB-Medium (10 g Bacto Trypton, 5 g Yeast Extrakt, 10 gNaCl in 1 l Wasser) ÜN bei 37°C geschüttelt. Die Bakterien-

kultur wurde dann bei 10000xg abzentrifugiert und in 100µl Wasser resuspendiert. Anschließend wurde 50µl 100 mM NaOH hinzugegeben. Die Zellen waren nach 5 min lysiert. Dann wurde die Lösung mit 100 µl 0,5 M Tris pH 8 neutralisiert. Abschliessend wurde die Suspension 10 min bei 10000xg zentrifugiert, um unlösliche Bestandteile zu entfernen. Von dieser Lösung wurde jeweils 1µl in die PCR-Reaktionen eingesetzt.

Die PCR-Reaktion wurde wie folgt angesetzt:

Probenvolumen – 1 µl
10xPCR-Puffer – 2,5 µl
10 mM dNTP – 0,25 µl
10 µM Vorwärtsprimer
 Kategorie A – 0,2 µl
10 µM Rückwärtsprimer
 Kategorie A – 0,2 µl
10 µM Vorwärtsprimer
 Kategorie B – 0,2 µl
10 µM Rückwärtsprimer
 Kategorie B – 0,2 µl
10 µM Vorwärtsprimer
 Kategorie C – 0,2 µl
10 µM Rückwärtsprimer
 Kategorie C – 0,2 µl
50 mM MgCl₂ – 0,75 µl
5U/µl Taq-Polymerase – 0,3 µl
Wasser – add. 25 µl

Das obige Reaktionsgemisch wurde in 200µl-Reaktionsgefässen fest verschlossen und gemäss nachfolgendem Protokoll in einem PCR-Gerät inkubiert:

95° C – 5 min

92° C – 1 min
 52° C – 1 min x 35
 72° C – 0,5 min

72° C – 5 min

In dem Reaktionsgemisch wurden jeweils ein Vorwärts- und ein Rückwärtsprimer der Kategorie A, B, C (Tab. 1-9) eingesetzt. Beispielsweise wurden mit den Primern Nr. 1, 6, 18, 22, 26 und 30 Amplikons bei den in der nachfolgenden Tabelle aufgelisteten Stämmen erzeugt. Positive Ergebnisse lagen also bei diesen serologisch als VTEC klassifizierten Stämmen vor, da in jedem Fall durch PCR erzeugte Banden im Ethidiumbromid-gefärbten 1%-igen Agarosegel zu erkennen waren.

Tab.: Nachweis von VTEC-Stämmen mit den Primern der Kategorie A-C

	Stammnr. (Biotecon Di- agnostics)	VTEC- Serotyp	Ergebnis positiv (+) /negativ(-)
1	Bc 4734	O26:H11	+
2	Bc 4735	O157:H-	+
3	Bc 4736		+
4	Bc 4737		+
5	Bc 4738	O157:H7	+
6	Bc 4945	O26:H-	+
7	Bc 4946	O157:H7	+
8	Bc 4947	O111:H-	+
9	Bc 4948	O157:H	+
10	Bc 4949	O5	+
11	Bc 5643	O2:H5	+
12	Bc 5644	O128	+
13	Bc 5645	O55:H-	+

	Stammnr. (Biotecon Di- agnostics)	VTEC- Serotyp	Ergebnis positiv (+) /negativ(-)
14	Bc 5646	O69:H-	+
15	Bc 5647	O101:H9	+
16	Bc 5648	O103:H2	+
17	Bc 5850	O22:H8	+
18	Bc 5851	O55:H-	+
19	Bc 5852	O48:H21	+
20	Bc 5853	O26:H11	+
21	Bc 5854	O157:H7	+
22	Bc 5855	O157:H-	+
23	Bc 5856	O26:H-	+
24	Bc 5857	O103:H2	+
25	Bc 5858	O26:H11	+
26	Bc 7832		+
27	Bc 7833	O Rauh- form:H-	+
28	Bc 7834	ONT:H-	+
29	Bc 7835	O103:H2	+
30	Bc 7836	O57:H-	+
31	Bc 7837	ONT:H-	+
32	Bc 7838		+
33	Bc 7839	O128:H2	+
34	Bc 7840	O157:H-	+
35	Bc 7841	O23:H-	+
36	Bc 7842	O157:H-	+
37	Bc 7843		+
38	Bc 7844	O157:H-	+
39	Bc 7845	O103:H2	+
40	Bc 7846	O26:H11	+
41	Bc 7847	O145:H-	+

	Stammnr. (Biotecon Di- agnostics)	VTEC- Serotyp	Ergebnis positiv (+) /negativ(-)
42	Bc 7848	O157:H-	+
43	Bc 7849	O156:H47	+
44	Bc 7850		+
45	Bc 7851	O157:H-	+
46	Bc 7852	O157:H-	+
47	Bc 7853	O5:H-	+
48	Bc 7854	O157:H7	+
49	Bc 7855	O157:H7	+
50	Bc 7856	O26:H-	+
51	Bc 7857		+
52	Bc 7858		+
53	Bc 7859	ONT:H-	+
54	Bc 7860	O129:H-	+
55	Bc 7861		+
56	Bc 7862	O103:H2	+
57	Bc 7863		+
58	Bc 7864	O Rauh- form:H-	+
59	Bc 7865		+
60	Bc 7866	O26:H-	+
61	Bc 7867	O Rauh- form:H-	+
62	Bc 7868		+
63	Bc 7869	ONT:H-	+
64	Bc 7870	O113:H-	+
65	Bc 7871	ONT:H-	+
66	Bc 7872	ONT:H-	+
67	Bc7873		+

	Stammnr. (Biotecon Di- agnostics)	VTEC- Serotyp	Ergebnis positiv (+) /negativ(-)
68	Bc 7874	O Rauh- form:H-	+
69	Bc 7875	O157:H-	+
70	Bc 7876	O111:H-	+
71	Bc 7877	O146:H21	+
72	Bc 7878	O145:H-	+
73	Bc 7879	O22:H8	+
74	Bc 7880	O Rauh- form:H-	+
75	Bc 7881	O145:H-	+
76	Bc 8275	O157:H7	+
77	Bc 8318	O55:K:-H-	+
78	Bc 8325	O157:H7	+
79	Bc 8333		+
80	Bc 8332	ONT	+
81	Bc 5580	O157:H7	+
82	Bc 5582	O3:H	+
83	Bc 5579	O157:H7	+

Außerdem konnten die Amplikons mit fluoreszenzmarkierten Sondenpaaren aus den Kategorien A, B, C, also z.B. mit den Sonden SEQ ID Nr. 9, 10, 34, 35, 95, 96, 97, 98 und 40 + 41 nachgewiesen werden.

Nachweis von EHEC-Stämmen durch PCR

Enterohämorrhagische *E. coli* können als lebensmittelverderbende Keime schwere Durchfallerkrankungen hervorrufen. Sie sind verantwortlich für das HUS (hämoly-

tisch-urämisches Syndrom), das eine blutige Diarrhöe und akutes Nierenversagen impliziert. Die Erkrankung kann tödlich enden.

Die EHEC können systematisch als eine Untergruppe der VTEC angesehen werden. Aus diesem Grunde kann der Nachweis in zwei Schritten erfolgen, in welchen zuerst die VTEC gemäss Beispiel 1 nachgewiesen werden und aus den positiven Befunden dann der EHEC-Nachweis erfolgt.

Im vorliegenden Beispiel werden Stämme der nachfolgenden Tabelle untersucht:

Nr.	Biotecon Nr.	Serovar	VTEC +/-	EHEC +/-
1	BC 12503	O157H-	+	+
2	BC 12507	O157H-	+	+
3	BC 12408	O84H21	+	+
4	BC 12518	O157H7	+	+
5	BC 12530	O156H-	+	+
6	BC 12538	O157H7	+	+
7	BC 12543	O111H-	+	+
8	BC 12544	O26H11	+	+
9	BC 12545	O103H2	+	+
10	BC 12546	O118H-	+	+
11	BC 12547	O118H-	+	+

Der Nachweis der EHEC-Stämme kann in verschiedenen Schritten, umfassend Bakterianreicherung, DNA-/RNA-Freisetzung und Isolierung, PCR und (eventuell simultan) Nachweis der Amplikons erfolgen.

Zur Anreicherung werden die Bakterien in 2 ml LB-Medium (10 g Bacto Trypton, 5 g Yeast Extrakt, 10 g NaCl in 1 l Wasser) ÜN bei 37°C geschüttelt. Die Bakterienkultur wurde dann bei 10000xg abzentrifugiert und in 100µl Wasser resuspendiert. Anschließend wurde 50µl 100 mM NaOH hinzugegeben. Die Zellen waren nach 5 min lysiert. Dann wurde die Lösung mit 100 µl 0,5 M Tris pH 8 neutralisiert. Ab-

schliessend wurde die Suspension 10 min bei 10000xg zentrifugiert, um unlösliche Bestandteile zu entfernen. Von dieser Lösung wurde jeweils 1µl in die PCR-Reaktionen eingesetzt.

Die PCR-Reaktion wurde wie folgt angesetzt:

Probenvolumen – 1 µl
10xPCR-Puffer – 2,5 µl
10 mM dNTP – 0,25 µl
10 µM Vorwärtsprimer
 Kategorie A – 0,2 µl
10 µM Rückwärtsprimer
 Kategorie A – 0,2 µl
10 µM Vorwärtsprimer
 Kategorie B – 0,2 µl
10 µM Rückwärtsprimer
 Kategorie B – 0,2 µl
10 µM Vorwärtsprimer
 Kategorie C – 0,2 µl
10 µM Rückwärtsprimer
 Kategorie C – 0,2 µl
50 mM MgCl₂ – 0,75 µl
5U/µl Taq-Polymerase – 0,3 µl
Wasser – add. 25 µl

Das obige Reaktionsgemisch wurde in 200µl-Reaktionsgefässen fest verschlossen und gemäss nachfolgendem Protokoll in einem PCR-Gerät inkubiert:

95° C – 5 min

92° C – 1 min
52° C – 1 min x 35
72° C – 0,5 min

72° C – 5 min

In dem Reaktionsgemisch wurden jeweils ein Vorwärts- und ein Rückwärtsprimer der Kategorie A, B, C (Tab. 1-9) eingesetzt. Beispielsweise wurden mit den Primern Nr. 1, 6, 18, 22, 26 und 30 Amplikons erzeugt. Positive Ergebnisse lagen also bei diesen serologisch als EHEC klassifizierten Stämmen vor, da in jedem Fall durch PCR erzeugte Banden im Ethidiumbromid-gefärbten 1%-igen Agarosegel zu erkennen waren.

Die DNA der positiven Befunde wurde erneut in einem zweiten Ansatz untersucht. In diesem wird eine PCR mit Vorwärts- und Rückwärtsprimer der Kategorien D und E eingesetzt. Es wird das nachfolgende Protokoll verwendet:

Probenvolumen – 1 µl
10xPCR-Puffer – 2,5 µl
10 mM dNTP – 0,25 µl
10 µM Vorwärtsprimer
 Kategorie C – 0,2 µl
10 µM Rückwärtsprimer
 Kategorie C – 0,2 µl
10 µM Vorwärtsprimer
 Kategorie D – 0,2 µl
10 µM Rückwärtsprimer
 Kategorie D – 0,2 µl
50 mM MgCl₂ – 0,75 µl
5U/µl Taq-Polymerase – 0,3 µl
Wasser – add. 25 µl

Das obige Reaktionsgemisch wurde in 200µl-Reaktionsgefässen fest verschlossen und gemäss nachfolgendem Protokoll in einem PCR-Gerät inkubiert:

95° C – 5 min

92° C – 1 min
52° C – 1 min x 35
72° C – 0,5 min

72° C – 5 min

Als Primer der Kategorie D kann z.B. die Kombination Primer Nr. 46, 54 und Nr. 68, 73 verwendet werden. Es ist auch möglich dieses Primerpaar in parallelen PCR-Reaktionen einzusetzen. Die Ergebnisse von zwei separaten PCR-Ansätzen sind nachfolgend dargestellt.

Da die Banden der Figuren 2 und 3 unterschiedliche Größen haben, können sie auch in einem Gel, aus einer einzigen PCR-Reaktion stammend, als Doppelbande nachgewiesen werden. Darüber hinaus können die Banden durch die zuvor beschriebene FRET-Technologie detektiert werden, indem Sondenpaare der Kategorien D und E verwendet werden. Beispielsweise können also die Sonden Nr. 60, 61 und 78,79 für diesen Zweck verwendet werden.

Spezifität des EHEC-Nachweises

Wie zuvor beschrieben erfolgt der EHEC-Nachweis vorzugsweise in mindestens zwei Schritten, umfassend PCR-Reaktionen mit den Primer-Kategorien A-C und D-E. Dabei werden positive Resultate aus dem ersten Schritt in dem zweiten weiter untersucht. Falls der erste Schritt negativ ausfällt, kann dieses Ergebnis durch eine entsprechende Kontrolle, in welcher *E. coli* nachgewiesen wird, überprüft werden. Es ist darüber hinaus wichtig, dass die Primer der Kategorien A-C keine falsch-

positiven Ergebnisse anzeigen. Aus diesem Grunde wurde ihre Spezifität intensiv untersucht. Nachfolgend sind die Ergebnisse dargestellt.

Zur Anreicherung werden die Bakterien in 2 ml LB-Medium (10 g Bacto Trypton, 5 g Yeast Extrakt, 10 g NaCl in 1 l Wasser) ÜN bei 37°C geschüttelt. Die Bakterienkultur wurde dann bei 10000xg abzentrifugiert und in 100µl Wasser resuspendiert. Anschließend wurde 50µl 100 mM NaOH hinzugegeben. Die Zellen waren nach 5 min lysiert. Dann wurde die Lösung mit 100 µl 0,5 M Tris pH 8 neutralisiert. Abschliessend wurde die Suspension 10 min bei 10000xg zentrifugiert, um unlösliche Bestandteile zu entfernen. Von dieser Lösung wurde jeweils 1µl in die PCR-Reaktionen eingesetzt.

Die PCR-Reaktion wurde wie folgt angesetzt:

Probenvolumen – 1 µl
10xPCR-Puffer – 2,5 µl
10 mM dNTP – 0,25 µl
10 µM Vorwärtsprimer
 Kategorie A – 0,2 µl
10 µM Rückwärtsprimer
 Kategorie A – 0,2 µl
10 µM Vorwärtsprimer
 Kategorie B – 0,2 µl
10 µM Rückwärtsprimer
 Kategorie B – 0,2 µl
10 µM Vorwärtsprimer
 Kategorie C – 0,2 µl
10 µM Rückwärtsprimer
 Kategorie C – 0,2 µl
50 mM MgCl₂ – 0,75 µl
5U/µl Taq-Polymerase – 0,3 µl
Wasser – add. 25 µl

Das obige Reaktionsgemisch wurde in 200µl-Reaktionsgefässen fest verschlossen und gemäss nachfolgendem Protokoll in einem PCR-Gerät inkubiert:

95° C – 5 min

92° C – 1 min
 52° C – 1 min x 35
 72° C – 0,5 min

72° C – 5 min

In dem Reaktionsgemisch wurden jeweils ein Vorwärts- und ein Rückwärtsprimer der Kategorie A, B, C (Tab. 1-9) eingesetzt. Beispielsweise wurden mit den Primern Nr. 1, 6, 18, 22, 26 und 30 keine Amplikons bei den in der nachfolgenden Tabelle aufgelisteten Stämmen erzeugt. Negative Ergebnisse lagen also bei diesen Stämmen vor, da in keinem Fall durch PCR erzeugte Banden der erwarteten Größe im Ethidiumbromid-gefärbten 1%-igen Agarosegel zu erkennen waren. Da die korrekten DNA-Fragmente nicht amplifiziert wurden, kann auch durch Sonden der Kategorien A-C kein falsch-positiver Befund entstehen. Auch dies wurde experimentell verifiziert.

Tab.: Als Negativkontrollen getestete Bakterienstämme

Spezies	Stamm-Nr.	PCR-Nachweis
Aeromonas hydrophila	DSM30188	-
Pseudomonas cepacia	BC 3134	-

Spezies	Stamm-Nr.	PCR-Nachweis
<i>Pseudomonas paucimobilis</i>	DSM1098	-
<i>Lactobacillus bif fermentans</i>	BC8463	-
<i>Flavobacterium johnsonii</i>	DSM 2064	-
<i>Flavobacterium flavense</i>	DSM 1076	-
<i>Flavobacterium resinovororum</i>	DSM 7478	-
<i>Enterococcus casseliflavus</i>	BC 7629	-
<i>Comamonas testosteroni</i>	BC 4276	-
<i>Alcaligenes latus</i>	DSM 1122	-
<i>Budvicia aquatica</i>	BC 8923	-
<i>Achromobacter ruhlandii</i>	BC 8908	-
<i>Achromobacter xyloxa</i>	BC 8913	-
<i>Sphingobacterium multivorans</i>	BC 8924	-
<i>Ralstonia pickettii</i>	BC 5368	-
<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	BC 5293	-
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	DSM 590	-
<i>Aeromonas hydrophila</i>	DSM 6173	-
<i>Aeromonas ente-</i>	DSM 6394	-

Spezies	Stamm-Nr.	PCR-Nachweis
ropeloges		
Moraxella cattarrhalis	DSM 9143	-
Pasteurella pneumotropica	DSM 2891	-
Pseudomonas beijerinckii	DSM 7218	-
Stenotrophomonas putrefaciens	BC 5337	-
Xanthomonas maltophilia	BC 4273	-
Brochotrix thermosphacta	DSM 20171	-
Brochotrix thermophilus	DSM 20594	-
Brochotrix campestris	DSM 4712	-
Staphylococcus haemolyticus	BC 2747	-
Staphylococcus chromogenes	BC 5468	-
Staphylococcus gallinosum	BC5472	-
Staphylococcus lentus	BC 5462	-
Staphylococcus intermedius	DSM 20036	-
Staphylococcus saprophyticus	DSM 20038	-
Staphylococcus	BC 5466	-

Spezies	Stamm-Nr.	PCR-Nachweis
hominis		
Staphylococcus equorum	BC 9447	-
Staphylococcus sciuri	BC 5461	-
Staphylococcus hyicus	BC 5469	-
Aeromonas caviae	DSM 7326	-
Pantoea stewartii	DSM 30176	-
Xhenorhabdus poinarii	DSM 4768	-
Klebsiella ornitholytica	DSM 7464	-
Vibrio vulnificus	DSM 10147	-
Moellerella wisconsinis	DSM 5079	-
Yersinia pseudotuberculosis	BC 8723	-
Vibrio mimicus	DSM 33653	-
Aeromonas sobriae	ATCC 43979	-
Pasteurella aerogenes	DSM 10153	-
Listonella anguillarum	DSM11323	-

Verwendung einer *E. coli*-Positivkontrolle

Wie zuvor beschrieben werden EHEC-Stämme gemäss der vorliegenden Erfindung in zwei Schritten unter Verwendung der Primer A-C und D-E nachgewiesen. Sobald PCR-Reaktionen des ersten Schritts einen positiven Befund anzeigen, werden die Proben nach Schritt zwei weiter untersucht. Wenn hingegen Schritt eins negativ ausfällt, dann liegt kein VTEC, und damit ebenfalls kein EHEC-Stamm vor. Es muss jedoch sichergestellt werden, dass experimentell bedingte Fehler ausgeschlossen werden können. Eine Möglichkeit besteht darin, *E. coli* nachzuweisen, da dieser Keim in fast allen für EHEC relevanten Nahrungsmitteln vorkommt. Durch Dotierung eines Lebensmittels mit einem *E. coli*-Stamm ist die Möglichkeit gegeben, diesen ungefährlichen Kontrollkeim routinemässig zu verwenden. Außerdem ist ein Nachweis von *E. coli* aus hygienischen Gesichtspunkten häufig erwünscht.

Aus Reinkulturen der in der nachfolgenden Tabelle aufgeführten Bakterien wurde in an sich bekannten Standardverfahren genomische DNA isoliert. Je ca. 1 bis 10 ng dieser Präparationen wurde dann in Gegenwart von je 0,4 μM eines äquimolaren Oligonukleotidgemisches Nr.84-87 und 0,4 μM Oligonukleotid Nr. 88, 2 mM MgCl_2 , 200 μM dNTPs (Roche Diagnostics, statt dTTP wurde dUTP verwendet), und 0,03 U/ μl Taq Polymerase (Life Technologies) in einfach konzentrierten Reaktionspuffer (Life Technologies) in die PCR eingesetzt. Die PCR wurde in einem Perkin Elmer 9600 Thermocycler mit nachfolgend aufgeführten Thermoprofil durchgeführt:

initiale Denaturierung	95 °C	5 min
Amplifikation (35 Zyklen)	95 °C	20 sec
	63 °C	45 sec
finale Synthese	72 °C	5 min

Nach Beendigung der PCR-Reaktion wurden die Amplifikationsprodukte mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und durch Anfärbung mit Ethidiumbromid sichtbar gemacht. Die erwarteten Produkte von 351 Basenpaare Länge wurden nur in den Fällen beobachtet, in denen DNA von Stämmen der Spezies *E. coli* bzw. der Gattung *Shigella* anwesend war. Die in den Gelen aufgetrennte DNA wurde in an sich bekannten Standardverfahren auf Nylon Filter transferiert und zur Überprüfung der Spezifität mit dem am 5'-Ende Biotin-markierten Oligonukleotiden Nr.91 und

Nr.92 hybridisiert. Die Hybridisierung erfolgte in 5 x SSC, 2 % Blocking Reagenz, 0,1 % Lauroylsarcosin, 0,02 % SDS und 5 pmol/ml Sonde für 4 h bei 52°C. Gewaschen wurde in 2 x SSC, 0,1 % SDS für 2 x 10 min bei 52 °C. Die Detektion erfolgte in an sich bekannten Standardverfahren mittels Alkalischer Phosphatase-Konjugate (ExtrAvidin, Sigma) in Anwesenheit von 5-Bromo-4chloro-3-indolyolphosphat und 4-Nitro-Blue Tetrazoliumchlorid (Boehringer Mannheim). Auf den Filtern wurde nur in den Fällen eine Bande beobachtet, in denen zuvor eine Bande von 351 Basenpaaren auf dem Agarosegel sichtbar war. Somit wurde mittels PCR und Hybridisierung die Anwesenheit sämtlicher 645 getesteten *E. coli* und 32 *Shigella*-Stämme nachgewiesen (siehe nachfolgende Tabelle). Hingegen wurde keiner der getesteten nicht zu dieser Spezies gehörenden Bakterienstämme mit diesem System erfasst.

Tabelle: Liste der getesteten Bakterien der *E. coli/Shigella*-Gruppe

Spezies	Stamm-Nr.	Serotyp	Patho- typ	PCR- Nachweis	Hybridisie- rung mit Sonden
<i>E. coli</i>	NCTC 12757	n.b.		+	+
<i>E. coli</i>	NCTC 12779	n.b.		+	+
<i>E. coli</i>	NCTC 12790	n.b.		+	+
<i>E. coli</i>	NCTC 12796	n.b.		+	+
<i>E. coli</i>	NCTC 12811	n.b.		+	+
<i>E. coli</i>	ATCC 11229	n.b.		+	+
<i>E. coli</i>	ATCC 25922	n.b.		+	+
<i>E. coli</i>	ATCC 8739	n.b.		+	+
<i>E. coli</i>	DSM 30083	O1:K1:H7		+	+
<i>E. coli</i>	BC 5849	O111:H2		+	+
<i>E. coli</i>	BC 8265	O104		+	+
<i>E. coli</i>	BC 8267	O55		+	+
<i>E. coli</i>	BC 8268	O6:H16		+	+
<i>E. coli</i>	BC 8270	O55:K(59):H-		+	+
<i>E. coli</i>	BC 8271	O55		+	+
<i>E. coli</i>	BC 8272	O55:K:-H-		+	+
<i>E. coli</i>	BC 8273	O55		+	+
<i>E. coli</i>	BC 8276	O128:K-H-		+	+
<i>E. coli</i>	BC 8277	O128:K68:H2		+	+
<i>E. coli</i>	BC 8278	O126		+	+
<i>E. coli</i>	BC 8279	O126		+	+
<i>E. coli</i>	BC 8312	ONT:H-		+	+
<i>E. coli</i>	BC 8317	O158:K:-H23		+	+
<i>E. coli</i>	BC 8319	O128:H21		+	+
<i>E. coli</i>	BC 8320	O55:H-		+	+
<i>E. coli</i>	BC 8321	O55		+	+
<i>E. coli</i>	BC 8322	O55		+	+

Spezies	Stamm-Nr.	Serotyp	Patho- typ	PCR- Nachweis	Hybridisie- rung mit Sonden
<i>E. coli</i>	BC 8326	O104		+	+
<i>E. coli</i>	BC 8327	O37		+	+
<i>E. coli</i>	BC 8331	O24		+	+
<i>E. coli</i>	BC 8335	O119:H27		+	+
<i>E. coli</i>	BC 8338	O10:H4		+	+
<i>E. coli</i>	BC 8341	O110:H17		+	+
<i>E. coli</i>	BC 8344	O103		+	+
<i>E. coli</i>	BC 8345	O103		+	+
<i>E. coli</i>	BC 8346	O44		+	+
<i>E. coli</i>	BC 8347	O44		+	+
<i>E. coli</i>	BC 8348	O44		+	+
<i>E. coli</i>	BC 8863	n.b.		+	+
<i>E. coli</i>	BC 8864	n.b.		+	+
<i>E. coli</i>	BC 4734	O26:H11	VTEC	+	+
<i>E. coli</i>	BC 4735	O157:H-	VTEC	+	+
<i>E. coli</i>	BC 4736	n.b.	VTEC	+	+
<i>E. coli</i>	BC 4737	n.b.	VTEC	+	+
<i>E. coli</i>	BC 4738	O157:H7	VTEC	+	+
<i>E. coli</i>	BC 4945	O26:H-	VTEC	+	+
<i>E. coli</i>	BC 4946	O157:H7	VTEC	+	+
<i>E. coli</i>	BC 4947	O111:H-	VTEC	+	+
<i>E. coli</i>	BC 4948	O157:H	VTEC	+	+
<i>E. coli</i>	BC 4949	O5	VTEC	+	+
<i>E. coli</i>	BC 5579	O157:H7	VTEC	+	+
<i>E. coli</i>	BC 5580	O157:H7	VTEC	+	+
<i>E. coli</i>	BC 5582	O3:H	VTEC	+	+
<i>E. coli</i>	BC 5643	O2:H5	VTEC	+	+
<i>E. coli</i>	BC 5644	O128	VTEC	+	+
<i>E. coli</i>	BC 5645	O55:H-	VTEC	+	+
<i>E. coli</i>	BC 5646	O69:H-	VTEC	+	+
<i>E. coli</i>	BC 5647	O101:H9	VTEC	+	+
<i>E. coli</i>	BC 5648	O103:H2	VTEC	+	+
<i>E. coli</i>	BC 5850	O22:H8	VTEC	+	+
<i>E. coli</i>	BC 5851	O55:H-	VTEC	+	+
<i>E. coli</i>	BC 5852	O48:H21	VTEC	+	+
<i>E. coli</i>	BC 5853	O26:H11	VTEC	+	+
<i>E. coli</i>	BC 5854	O157:H7	VTEC	+	+
<i>E. coli</i>	BC 5855	O157:H-	VTEC	+	+
<i>E. coli</i>	BC 5856	O26:H-	VTEC	+	+
<i>E. coli</i>	BC 5857	O103:H2	VTEC	+	+
<i>E. coli</i>	BC 5858	O26:H11	VTEC	+	+
<i>E. coli</i>	BC 7832	n.b.	VTEC	+	+
<i>E. coli</i>	BC 7833	O Rauhform:H-	VTEC	+	+
<i>E. coli</i>	BC 7834	ONT:H-	VTEC	+	+
<i>E. coli</i>	BC 7835	O103:H2	VTEC	+	+
<i>E. coli</i>	BC 7836	O57:H-	VTEC	+	+
<i>E. coli</i>	BC 7837	ONT:H-	VTEC	+	+
<i>E. coli</i>	BC 7838	n.b.	VTEC	+	+
<i>E. coli</i>	BC 7839	O128:H2	VTEC	+	+
<i>E. coli</i>	BC 7840	O157:H-	VTEC	+	+
<i>E. coli</i>	BC 7841	O23:H-	VTEC	+	+
<i>E. coli</i>	BC 7842	O157:H-	VTEC	+	+
<i>E. coli</i>	BC 7843	n.b.	VTEC	+	+
<i>E. coli</i>	BC 7844	O157:H-	VTEC	+	+
<i>E. coli</i>	BC 7845	O103:H2	VTEC	+	+
<i>E. coli</i>	BC 7846	O26:H11	VTEC	+	+
<i>E. coli</i>	BC 7847	O145:H-	VTEC	+	+

Spezies	Stamm-Nr.	Serotyp	Patho- typ	PCR- Nachweis	Hybridisie- rung mit Sonden
<i>E. coli</i>	BC 7848	O157:H-	VTEC	+	+
<i>E. coli</i>	BC 7849	O156:H47	VTEC	+	+
<i>E. coli</i>	BC 7850	n.b.	VTEC	+	+
<i>E. coli</i>	BC 7851	O157:H-	VTEC	+	+
<i>E. coli</i>	BC 7852	O157:H-	VTEC	+	+
<i>E. coli</i>	BC 7853	O5:H-	VTEC	+	+
<i>E. coli</i>	BC 7854	O157:H7	VTEC	+	+
<i>E. coli</i>	BC 7855	O157:H7	VTEC	+	+
<i>E. coli</i>	BC 7856	O26:H-	VTEC	+	+
<i>E. coli</i>	BC 7857	n.b.	VTEC	+	+
<i>E. coli</i>	BC 7858	n.b.	VTEC	+	+
<i>E. coli</i>	BC 7859	ONT:H-	VTEC	+	+
<i>E. coli</i>	BC 7860	O129:H-	VTEC	+	+
<i>E. coli</i>	BC 7861	n.b.	VTEC	+	+
<i>E. coli</i>	BC 7862	O103:H2	VTEC	+	+
<i>E. coli</i>	BC 7863	n.b.	VTEC	+	+
<i>E. coli</i>	BC 7864	O Rauhform:H-	VTEC	+	+
<i>E. coli</i>	BC 7865	n.b.	VTEC	+	+
<i>E. coli</i>	BC 7866	O26:H-	VTEC	+	+
<i>E. coli</i>	BC 7867	O Rauhform:H-	VTEC	+	+
<i>E. coli</i>	BC 7868	n.b.	VTEC	+	+
<i>E. coli</i>	BC 7869	ONT:H-	VTEC	+	+
<i>E. coli</i>	BC 7870	O113:H-	VTEC	+	+
<i>E. coli</i>	BC 7871	ONT:H-	VTEC	+	+
<i>E. coli</i>	BC 7872	ONT:H-	VTEC	+	+
<i>E. coli</i>	BC 7873	n.b.	VTEC	+	+
<i>E. coli</i>	BC 7874	O Rauhform:H-	VTEC	+	+
<i>E. coli</i>	BC 7875	O157:H-	VTEC	+	+
<i>E. coli</i>	BC 7876	O111:H-	VTEC	+	+
<i>E. coli</i>	BC 7877	O146:H21	VTEC	+	+
<i>E. coli</i>	BC 7878	O145:H-	VTEC	+	+
<i>E. coli</i>	BC 7879	O22:H8	VTEC	+	+
<i>E. coli</i>	BC 7880	O Rauhform:H-	VTEC	+	+
<i>E. coli</i>	BC 7881	O145:H-	VTEC	+	+
<i>E. coli</i>	BC 8275	O157:H7	VTEC	+	+
<i>E. coli</i>	BC 8318	O55:K:H-	VTEC	+	+
<i>E. coli</i>	BC 8325	O157:H7	VTEC	+	+
<i>E. coli</i>	BC 8332	ONT	VTEC	+	+
<i>E. coli</i>	BC 8333	n.b.	VTEC	+	+
<i>E. coli</i>	BC 8246	O152:K:H-	EIEC	+	+
<i>E. coli</i>	BC 8247	O124:K(72):H3	EIEC	+	+
<i>E. coli</i>	BC 8248	O124	EIEC	+	+
<i>E. coli</i>	BC 8249	O112	EIEC	+	+
<i>E. coli</i>	BC 8250	O136:K(78):H-	EIEC	+	+
<i>E. coli</i>	BC 8251	O124:H-	EIEC	+	+
<i>E. coli</i>	BC 8252	O144:K:H-	EIEC	+	+
<i>E. coli</i>	BC 8253	O143:K:H-	EIEC	+	+
<i>E. coli</i>	BC 8254	O143	EIEC	+	+
<i>E. coli</i>	BC 8255	O112	EIEC	+	+
<i>E. coli</i>	BC 8256	O28a,e	EIEC	+	+
<i>E. coli</i>	BC 8257	O124:H-	EIEC	+	+
<i>E. coli</i>	BC 8258	O143	EIEC	+	+
<i>E. coli</i>	BC 8259	O167:K:H5	EIEC	+	+
<i>E. coli</i>	BC 8260	O128a.c.:H35	EIEC	+	+
<i>E. coli</i>	BC 8261	O164	EIEC	+	+
<i>E. coli</i>	BC 8262	O164:K:H-	EIEC	+	+
<i>E. coli</i>	BC 8263	O164	EIEC	+	+

Spezies	Stamm-Nr.	Serotyp	Patho- typ	PCR- Nachweis	Hybridisie- rung mit Sonden
<i>E. coli</i>	BC 8264	O124	EIEC	+	+
<i>E. coli</i>	BC 7567	O86	EPEC	+	+
<i>E. coli</i>	BC 7568	O128	EPEC	+	+
<i>E. coli</i>	BC 7571	O114	EPEC	+	+
<i>E. coli</i>	BC 7572	O119	EPEC	+	+
<i>E. coli</i>	BC 7573	O125	EPEC	+	+
<i>E. coli</i>	BC 7574	O124	EPEC	+	+
<i>E. coli</i>	BC 7576	O127a	EPEC	+	+
<i>E. coli</i>	BC 7577	O126	EPEC	+	+
<i>E. coli</i>	BC 7578	O142	EPEC	+	+
<i>E. coli</i>	BC 7579	O26	EPEC	+	+
<i>E. coli</i>	BC 7580	OK26	EPEC	+	+
<i>E. coli</i>	BC 7581	O142	EPEC	+	+
<i>E. coli</i>	BC 7582	O55	EPEC	+	+
<i>E. coli</i>	BC 7583	O158	EPEC	+	+
<i>E. coli</i>	BC 7584	O-	EPEC	+	+
<i>E. coli</i>	BC 7585	O-	EPEC	+	+
<i>E. coli</i>	BC 7586	O-	EPEC	+	+
<i>E. coli</i>	BC 8330	n.b.	EPEC	+	+
<i>E. coli</i>	BC 8550	O26	EPEC	+	+
<i>E. coli</i>	BC 8551	O55	EPEC	+	+
<i>E. coli</i>	BC 8552	O158	EPEC	+	+
<i>E. coli</i>	BC 8553	O26	EPEC	+	+
<i>E. coli</i>	BC 8554	O158	EPEC	+	+
<i>E. coli</i>	BC 8555	O86	EPEC	+	+
<i>E. coli</i>	BC 8556	O128	EPEC	+	+
<i>E. coli</i>	BC 8557	OK26	EPEC	+	+
<i>E. coli</i>	BC 8558	O55	EPEC	+	+
<i>E. coli</i>	BC 8560	O158	EPEC	+	+
<i>E. coli</i>	BC 8561	O158	EPEC	+	+
<i>E. coli</i>	BC 8562	O114	EPEC	+	+
<i>E. coli</i>	BC 8563	O86	EPEC	+	+
<i>E. coli</i>	BC 8564	O128	EPEC	+	+
<i>E. coli</i>	BC 8565	O158	EPEC	+	+
<i>E. coli</i>	BC 8566	O158	EPEC	+	+
<i>E. coli</i>	BC 8567	O158	EPEC	+	+
<i>E. coli</i>	BC 8568	O111	EPEC	+	+
<i>E. coli</i>	BC 8569	O128	EPEC	+	+
<i>E. coli</i>	BC 8570	O114	EPEC	+	+
<i>E. coli</i>	BC 8571	O128	EPEC	+	+
<i>E. coli</i>	BC 8572	O128	EPEC	+	+
<i>E. coli</i>	BC 8573	O158	EPEC	+	+
<i>E. coli</i>	BC 8574	O158	EPEC	+	+
<i>E. coli</i>	BC 8575	O158	EPEC	+	+
<i>E. coli</i>	BC 8576	O158	EPEC	+	+
<i>E. coli</i>	BC 8577	O158	EPEC	+	+
<i>E. coli</i>	BC 8578	O158	EPEC	+	+
<i>E. coli</i>	BC 8581	O158	EPEC	+	+
<i>E. coli</i>	BC 8583	O128	EPEC	+	+
<i>E. coli</i>	BC 8584	O158	EPEC	+	+
<i>E. coli</i>	BC 8585	O128	EPEC	+	+
<i>E. coli</i>	BC 8586	O158	EPEC	+	+
<i>E. coli</i>	BC 8588	O26	EPEC	+	+
<i>E. coli</i>	BC 8589	O86	EPEC	+	+
<i>E. coli</i>	BC 8590	O127	EPEC	+	+
<i>E. coli</i>	BC 8591	O128	EPEC	+	+
<i>E. coli</i>	BC 8592	O114	EPEC	+	+

Spezies	Stamm-Nr.	Serotyp	Patho- typ	PCR- Nachweis	Hybridisie- rung mit Sonden
<i>E. coli</i>	BC 8593	O114	EPEC	+	+
<i>E. coli</i>	BC 8594	O114	EPEC	+	+
<i>E. coli</i>	BC 8595	O125	EPEC	+	+
<i>E. coli</i>	BC 8596	O158	EPEC	+	+
<i>E. coli</i>	BC 8597	O26	EPEC	+	+
<i>E. coli</i>	BC 8598	O26	EPEC	+	+
<i>E. coli</i>	BC 8599	O158	EPEC	+	+
<i>E. coli</i>	BC 8605	O158	EPEC	+	+
<i>E. coli</i>	BC 8606	O158	EPEC	+	+
<i>E. coli</i>	BC 8607	O158	EPEC	+	+
<i>E. coli</i>	BC 8608	O128	EPEC	+	+
<i>E. coli</i>	BC 8609	O55	EPEC	+	+
<i>E. coli</i>	BC 8610	O114	EPEC	(+)	+
<i>E. coli</i>	BC 8615	O158	EPEC	+	+
<i>E. coli</i>	BC 8616	O128	EPEC	+	+
<i>E. coli</i>	BC 8617	O26	EPEC	+	+
<i>E. coli</i>	BC 8618	O86	EPEC	+	+
<i>E. coli</i>	BC 8619	n.b.	EPEC	+	+
<i>E. coli</i>	BC 8620	n.b.	EPEC	+	+
<i>E. coli</i>	BC 8621	n.b.	EPEC	+	+
<i>E. coli</i>	BC 8622	n.b.	EPEC	+	+
<i>E. coli</i>	BC 8623	n.b.	EPEC	+	+
<i>E. coli</i>	BC 8624	O158	EPEC	+	+
<i>E. coli</i>	BC 8625	O158	EPEC	+	+
<i>E. coli</i>	BC 5581	O78:H11	ETEC	+	+
<i>E. coli</i>	BC 5583	O2:K1	ETEC	+	+
<i>E. coli</i>	BC 8221	O118	ETEC	+	+
<i>E. coli</i>	BC 8222	O148:H-	ETEC	+	+
<i>E. coli</i>	BC 8223	O111	ETEC	+	+
<i>E. coli</i>	BC 8224	O110:H-	ETEC	+	+
<i>E. coli</i>	BC 8225	O148	ETEC	+	+
<i>E. coli</i>	BC 8226	O118	ETEC	+	+
<i>E. coli</i>	BC 8227	O25:H42	ETEC	+	+
<i>E. coli</i>	BC 8229	O6	ETEC	+	+
<i>E. coli</i>	BC 8231	O153:H45	ETEC	+	+
<i>E. coli</i>	BC 8232	O9	ETEC	+	+
<i>E. coli</i>	BC 8233	O148	ETEC	+	+
<i>E. coli</i>	BC 8234	O128	ETEC	+	+
<i>E. coli</i>	BC 8235	O118	ETEC	+	+
<i>E. coli</i>	BC 8237	O111	ETEC	+	+
<i>E. coli</i>	BC 8238	O110:H17	ETEC	+	+
<i>E. coli</i>	BC 8240	O148	ETEC	+	+
<i>E. coli</i>	BC 8241	O6H16	ETEC	+	+
<i>E. coli</i>	BC 8243	O153	ETEC	+	+
<i>E. coli</i>	BC 8244	O15:H-	ETEC	+	+
<i>E. coli</i>	BC 8245	O20	ETEC	+	+
<i>E. coli</i>	BC 8269	O125a:c:H-	ETEC	+	+
<i>E. coli</i>	BC 8313	O6:H6	ETEC	+	+
<i>E. coli</i>	BC 8315	O153:H-	ETEC	+	+
<i>E. coli</i>	BC 8329	n.b.	ETEC	+	+
<i>E. coli</i>	BC 8334	O118:H12	ETEC	+	+
<i>E. coli</i>	BC 8339	n.b.	ETEC	+	+

<i>E. coli</i> Klinische Isolate	359 (359)	359 (359)
<i>E. coli</i> Lebensmittelisolate	12 (12)	12 (12)
<i>E. coli</i> Umweltisolate	23 (23)	23 (23)

Spezies	Stamm-Nr.	Serotyp	Patho- typ	PCR- Nachweis	Hybridisie- rung mit Sonden
<i>Shigella boydii</i>	DSM 7532	2		+	+
<i>Sh. boydii</i>	BC 7545	1		+	+
<i>Sh. boydii</i>	BC 7546	2		+	+
<i>Sh. boydii</i>	BC 7547	3		+	+
<i>Sh. boydii</i>	BC 7548	4		+	+
<i>Sh. boydii</i>	BC 7549	5		+	+
<i>Sh. boydii</i>	BC 7550	6		+	+
<i>Sh. boydii</i>	BC 7551	7		+	+
<i>Sh. boydii</i>	BC 7552	8		+	+
<i>Sh. dysenteriae</i>	NCTC 4837	1		+	+
<i>Sh. dysenteriae</i>	BC 7566	1		+	+
<i>Sh. dysenteriae</i>	BC 7553	2		+	+
<i>Sh. dysenteriae</i>	BC 7554	3		+	+
<i>Sh. dysenteriae</i>	BC 7555	5		+	+
<i>Sh. dysenteriae</i>	BC 7556	7		+	+
<i>Sh. dysenteriae</i>	BC 7557	8		+	+
<i>Sh. dysenteriae</i>	BC 7559	10		+	+
<i>Sh. flexneri</i>	DSM 4782	2a		+	+
<i>Sh. flexneri</i>	BC 5935	1a		+	+
<i>Sh. flexneri</i>	BC 5936	2a		+	+
<i>Sh. flexneri</i>	BC 5937	6		+	+
<i>Sh. flexneri</i>	BC 7560	1b		+	+
<i>Sh. flexneri</i>	BC 7561	2a		+	+
<i>Sh. flexneri</i>	BC 7562	3b		+	+
<i>Sh. flexneri</i>	BC 7563	4		+	+
<i>Sh. flexneri</i>	BC 7564	5		+	+
<i>Sh. flexneri</i>	BC 7565	6		+	+
<i>Shigella sonnei</i>	BC 1201			+	+
<i>Shigella sonnei</i>	BC 4302			+	+
<i>Shigella sonnei</i>	BC 4301			+	+
<i>Shigella sonnei</i>	BC 7889			+	+
<i>Shigella sp.</i>	BC 4303			+	+

ATCC: American Type Culture Collection (Manassas, USA)

BC: Stammsammlung BioteCon GmbH

DSM: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen (Braunschweig, Deutschland)

NCTC: National Collection of Type Cultures (London, Großbritannien)

+ = positive Reaktion

- = negative Reaktion

(+) = schwache positive Reaktion

n.b. = nicht bestimmt

Tabelle: Liste der getesteten Bakterien außerhalb der *E. coli/Shigella*-Gruppe

Spezies	Stamm-Nr.	PCR-Nachweis	Hybridisierung mit Sonden
<i>Buttiauxella agrestis</i>	DSM 4586	-	-
<i>Cedecea davisae</i>	DSM 4568	-	-
<i>Citrobacter amalonaticus</i>	DSM 4593	-	-
<i>Citrobacter freundii</i>	DSM 30040	-	-
<i>Citrobacter freundii</i>	BC 6044	-	-
<i>Citrobacter koseri</i>	DSM 4570	-	-
<i>Citrobacter koseri</i>	DSM 4595	-	-
<i>Citrobacter koseri</i>	BC 4962	-	-
<i>Edwardsiella tarda</i>	DSM 30052	-	-
<i>Enterobacter aerogenes</i>	DSM 30053	-	-
<i>Enterobacter aerogenes</i>	BC 5895	-	-
<i>Enterobacter amnigenus</i>	DSM 4486	-	-
<i>Enterobacter amnigenus</i>	BC 7437	-	-
<i>Enterobacter amnigenus</i>	BC 8794	-	-
<i>Enterobacter cloacae</i>	DSM 30054	-	-
<i>Enterobacter cloacae</i>	BC 2467	-	-
<i>Enterobacter cloacae</i>	BC 8725	-	-
<i>Enterobacter gergoviae</i>	BC 511	-	-
<i>Enterobacter gergoviae</i>	BC 674	-	-
<i>Enterobacter intermedius</i>	DSM 4581	-	-
<i>Enterobacter sakazakii</i>	DSM 4485	-	-
<i>Erwinia carotovora subsp. carotovora</i>	DSM 30168	-	-
<i>Escherichia blattae</i>	NCTC 12127	-	-
<i>Escherichia hermannii</i>	DSM 4560	-	-
<i>Escherichia hermannii</i>	BC 8467	-	-
<i>Escherichia fergusonii</i>	NCTC 12128	(+)	-
<i>Escherichia vulneris</i>	DSM 4564	-	-
<i>Escherichia vulneris</i>	BC 8793	-	-
<i>Hafnia alvei</i>	BC 2154	-	-
<i>Klebsiella oxytoca</i>	DSM 5175	-	-
<i>Klebsiella oxytoca</i>	BC 2468	-	-
<i>Klebsiella planticola</i>	DSM 4617	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	BC 5365	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae</i>	ATCC 13883	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae</i>	DSM 30102	-	-
<i>Klebsiella terrigena</i>	DSM 2687	-	-
<i>Kluyvera ascorbata</i>	DSM 4611	-	-
<i>Kluyvera sp.</i>	BC 7440	-	-
<i>Morganella morganii subsp. morganii</i>	DSM 30164	-	-
<i>Pantoea agglomerans</i>	DSM 3493	-	-
<i>Pantoea agglomerans</i>	BC 6043	-	-
<i>Pantoea agglomerans</i>	BC 8600	-	-
<i>Pantoea spp.</i>	BC 8669	-	-
<i>Pantoea spp.</i>	BC 8726	-	-
<i>Proteus mirabilis</i>	DSM 788	-	-
<i>Proteus rettgeri</i>	DSM 1131	-	-
<i>Providencia stuartii</i>	DSM 4539	-	-
<i>Rahnella aquatilis</i>	DSM 4594	-	-
<i>Salmonella bongori V</i>	BC 5695	-	-
<i>Salmonella bongori V</i>	BC 7952	-	-
<i>Salmonella enterica I</i>	BC 7751	-	-

Spezies	Stamm-Nr.	PCR-Nachweis	Hybridisierung mit Sonden
<i>Salmonella enterica</i> II	BC 5677	-	-
<i>Salmonella enterica</i> IIIa	BC 5241	-	-
<i>Salmonella enterica</i> IIIa	BC 5249	-	-
<i>Salmonella enterica</i> IIIb	BC 7937	-	-
<i>Salmonella enterica</i> IIIb	BC 7942	-	-
<i>Salmonella enterica</i> IV	BC 7759	-	-
<i>Salmonella enterica</i> VI	BC 7762	-	-
<i>Serratia marcescens</i>	BC 677	-	-
<i>Serratia marcescens</i>	DSM 1636	-	-
<i>Serratia odorifera</i>	BC 678	-	-
<i>Serratia</i> spp.	BC 1139	-	-
<i>Yersinia enterocolytica</i>	DSM 4780	-	-
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	DSM 8992	-	-
<i>Yokenella regensburgei</i>	DSM 5079	-	-
<i>Acinetobacter</i> sp.	DSM 590	-	-
<i>Aeromonas hydrophila</i> subsp. <i>hydrophila</i>	DSM 6173	-	-
<i>Bacillus cereus</i>	NCFB 827	-	-
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	DSM 1550	-	-
<i>Bacillus subtilis</i>	DSM 1970	-	-
<i>Carnobacterium mobile</i>	DSM 4848	-	-
<i>Clostridium acetobutylicum</i>	DSM 1731	-	-
<i>Clostridium propionicum</i>	DSM 1682	-	-
<i>Clostridium saccharolyticum</i>	DSM 2544	-	-
<i>Comamonas testosteroni</i>	DSM 1622	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	DSM 6134	-	-
<i>Flavobacterium</i> sp.	ATCC 27551	-	-
<i>Haemophilus influenzae</i>	DSM 4690	-	-
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>hordniae</i>	DSM 20450	-	-
<i>Lactococcus raffinolactis</i>	DSM 20443	-	-
<i>Moraxella catarrhalis</i>	DSM 9143	-	-
<i>Pasteurella pneumotropica</i>	BC 2891	-	-
<i>Pediococcus inopinatus</i>	DSM 20285	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	DSM 50071	-	-
<i>Pseudomonas cepacia</i>	BC 3134	-	-
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	DSM 6290	-	-
<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	BC 8795	-	-
<i>Sphingomonas</i> sp.	DSM 6014	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	DSM 20491	-	-
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	BC 8724	-	-
<i>Streptococcus thermophilus</i>	BC 2148	-	-
<i>Vibrio alginolyticus</i>	DSM 2171	-	-
<i>Vibrio fischeri</i>	DSM 507	-	-
<i>Vibrio harveyi</i>	DSM 6904	-	-
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	DSM 2172	-	-

Differenzierung von Stt-Genen

Ein charakteristisches Kennzeichen der VTEC ist das Vorhandensein eines der beiden Gene SttI (Shiga like toxin) oder SttII oder von beiden Genen. Diese Gene werden auch als vtx1 und vtx2 bezeichnet. Zur Feintypisierung von VTEC und E-HEC-Stämmen kann bezüglich des Vorhandenseins dieser Gene oder von Varianten dieser Gene weiter differenziert werden. Auf diese Weise lassen sich wichtige Informationen zur Verbreitung dieser pathogenen *E. coli*-Stämme wie auch zur Evolution gewinnen. Außerdem gibt es Hinweise, dass pathologische Potential bei verschiedenen SttI oder SttII-Variaten, bzw. beim Vorkommen beider Gene variiert.

Zur Differenzierung zwischen SttI und SttII-Genen können die Primer der Kategorie A bzw. der Kategorien B+C verwendet werden.

Die PCR-Reaktion I) wurde wie folgt angesetzt:

I)

Probenvolumen – 1 µl

10xPCR-Puffer – 2,5 µl

10 mM dNTP – 0,25 µl

10 µM Vorwärtsprimer

Kategorie A – 0,2 µl

10 µM Rückwärtsprimer

Kategorie A – 0,2 µl

50 mM MgCl₂ – 0,75 µl

5U/µl Taq-Polymerase – 0,3 µl

Wasser – add. 25 µl

Das obige Reaktionsgemisch wurde in 200µl-Reaktionsgefässen fest verschlossen und gemäss nachfolgendem Protokoll in einem PCR-Gerät inkubiert:

95° C – 5 min

92° C – 1 min
52° C – 1 min x 35
72° C – 0,5 min

72° C – 5 min

In dem Reaktionsgemisch wurden jeweils ein Vorwärts- und ein Rückwärtsprimer der Kategorie A (Tab. 1-9) eingesetzt.

In einer weiteren PCR-Reaktion II) wurde nachfolgendes Gemisch angesetzt:

II)

Probenvolumen – 1 µl

10xPCR-Puffer – 2,5 µl

10 mM dNTP – 0,25 µl

10 µM Vorwärtsprimer

Kategorie B+C – 0,2 µl

10 µM Rückwärtsprimer

Kategorie B+C – 0,2 µl

50 mM MgCl₂ – 0,75 µl

5U/µl Taq-Polymerase – 0,3 µl

Wasser – add. 25 µl

Das obige Reaktionsgemisch wurde in 200µl-Reaktionsgefässen fest verschlossen und gemäss nachfolgendem Protokoll in einem PCR-Gerät inkubiert:

95° C – 5 min

92° C – 1 min
 52° C – 1 min x 35
 72° C – 0,5 min

72° C – 5 min

In dem Reaktionsgemisch wurden jeweils ein Vorwärts- und ein Rückwärtsprimer der Kategorie B+C (Tab. 1-9) eingesetzt.

In der nachfolgenden Tabelle sind die Ergebnisse der PCR-Reaktionen zusammenfasst. Ein positives Ergebnis liegt vor, wenn ein Amplikon, das eine Bande in der Größenordnung von ca. 500-700 bp amplifiziert wurde. Dieses wurde auf einem Agarosegel, das mit Ethidiumbromid gefärbt wurde sichtbar gemacht.

Tabelle: Differenzierung zwischen StI- und StII-Genen

	BC-Nr	Herkunft	Serovar	vorhandene Gene		PCR-Nachweis	
				StI	StII	Kategorie A	Kategorie B+C
1	12502	Vorzugsmilch	O138H8	-	+	-	+
2	12503	Vorzugsmilch	O157H-	-	+	-	+
3	12504	Rindfleisch	O8H27	-	+	-	+
4	12505	Rohmilch	O17H-	-	+	-	+
5	12506	Rinderhackfleisch	O22H-	+	+	+	+
6	12507	Nürnberger Rostbratwurst	O157H-	-	+	-	+
7	12508	Lammfleisch	O84H21	+	+	+	+
8	12509	Lammfleisch	O7H-	+	+	+	+

9	12510	Lammfleisch	O _{nt} H-	+	-	+	-
10	12511	Rinderrohmilchkäse	O ₂₃ H ₁₅	-	+	-	+
11	12512	Rinderhackfleischrohstoff	O ₈ H-	-	+	-	+
12	12513	Rinderhackfleischrohstoff	O- rauhH ₂₃	+	+	+	+
13	12514	Rinderhackfleischrohstoff	O ₄₆ H-	-	+	-	+
14	12515	Rinderhackfleisch	O ₁₀₄ H ₁₂	+	-	+	-
15	12516	Rinderhackfleisch	O ₇₄ H-	-	+	-	+
16	12517	Rinderhackfleischrohstoff	O ₆₂ H ₈	+	+	+	+
17	12518	Rinderhackfleischrohstoff	O ₁₅₇ H ₇	-	+	-	+
18	12519	Pattie aus Rindfleisch	O ₉₁ H-	-	+	-	+
19	12520	Rinderhackfleischrohstoff	O ₂₂ H-	-	+	-	+
20	12521	Zwiebelmettwurst	O ₆₅ H-	+	-	+	-
21	12522	Rinderhackfleisch	O ₈ H-	-	+	-	+
22	12523	Hackfleisch, gemischt	O ₉₁ H ₂₁	+	+	+	+
23	12524	Rinderhackfleischrohstoff	O ₁₁₃ H ₄	-	+	-	+
24	12525	Rinderhackfleisch	O ₂₂ H ₈	+	+	+	+
25	12526	Rinderhackfleischrohstoff	O ₁₁₃ H ₄	+	+	+	+

Die Primer der Kategorien A bzw. B+C sind außerdem zu verwenden, um als Konsensusprimer Subtypen der SltI- (Kategorie A) bzw. SltII-Gene (Kategorie B+C) zu amplifizieren. Diese Subtypen können mit spezifischen Sonden, wie sie für die Kategorien A, bzw. B +C aufgelistet sind differenziert werden. Für gegenwärtig noch nicht bekannte Subtypen können die Sonden dieser Kategorien empirisch getestet und den Subtypen zugeordnet werden. Auf Grund der großen Zahl an Sonden er-

gibt sich ein positiv-negativ-Muster, das charakteristisch für die Subtypen ist. Außerdem erlauben die Primer der Kategorien A und B+C die Amplifikation und anschließende Sequenzierung der Amplikons. Zudem können Techniken angewendet werden, wie Massenspektrometrie, Hybridisierung auf Biochips, „branch migration inhibition“, oder andere Techniken, die eine SNP (single nucleotide polymorphism)-Analyse ermöglichen und dem Fachmann bekannt sind.

Optimierung einer Online-PCR

Bei einer Online-PCR erfolgt eine simultane Amplifikation und Detektion des Amplikons. Je nachzuweisendem Amplicon werden 1-2 farbstoffmarkierte Sonden dem PCR-Gemisch beigegeben.

Die Detektion der Amplikons kann dann zum Beispiel mit Hilfe eines 5'-Nuklease Assays (TaqMan-Sonden), mit Hilfe von Molecular Beacons, Scorpions Assays oder der zuvor beschriebenen FRET-Technologie erfolgen.

Insbesondere in letzterem Fall ist nur empirisch zu ermitteln, welche der zu verwendenden Sondenpaare optimal geeignet sind. Häufig ist das auftretende Fluoreszenzsignal zu schwach, um ein zuverlässiges und reproduzierbares Ergebnis zu liefern. Außerdem können Sonden in einem komplexen PCR-Gemisch Dimere mit anderen Sonden oder Primern bilden, so dass keine Online-Detektion erfolgt.

Beim Nachweis von EHEC kann es vorteilhaft sein sowohl die Stt-Gene (→ VTEC) als auch die eae-Gene in einer einzigen Multiplex-PCR-Reaktion zu amplifizieren (Stt-Gene + eae-Gen = EHEC) und dann auch simultan zu detektieren. In diesem Fall ist eine sehr präzise Abstimmung der Reaktionskomponenten erforderlich. Durch den Verbrauch der Nukleotide kann die Amplifikation einer von zwei DNA-Zielregionen verhindert werden. Dies bedeutet also, dass die Amplifikation einer DNA durch die Amplifikation einer anderen gequenscht wird. Es ist deshalb notwendig alle Komponenten eines PCR-Gemisches so aufeinander abzustimmen, dass ein Quenschen nicht auftritt.

Dies kann u.a. dadurch geschehen, dass die Primerkonzentrationen limitiert werden. Dabei ist zu berücksichtigen, dass zwischen den Slt-Genen ein Quenschen unproblematisch ist, da der Nachweis nur eines Slt-Genes für die Einstufung als VTEC ausreicht. Aus diesem Grunde können reduzierte Mengen an SltI- und SltII-spezifischen Primern beigegeben werden. Die Konzentrationen können im Bereich von 300-200 nM je Primerpaar und PCR-Reaktion liegen. Hingegen sollte die Primerkonzentration der für die eae-Gene höher liegen (310-440 nM), um auch geringe eae-DNA-Konzentrationen in Gegenwart hoher Slt-DNA-Konzentrationen nachweisen zu können.

Eine weitere Möglichkeit ein Quenschen durch die Amplifikation der Slt-Gene zu verhindern besteht darin, eine Annealingtemperatur zu wählen, die Optimal für die eae-spezifischen Primer und suboptimal für die SltI- und SltII-spezifischen Primer ist. Konkret kann diese Temperatur bis zu 5° C über der optimalen Temperatur für alle Slt-Primer liegen. Als optimale Temperatur für Primer kann dabei der thermodynamische Schmelzpunkt angesehen werden.

Die Möglichkeiten ein Quenschen zu verhindern sind entsprechend reziprok anwendbar, wenn eae-Gene im Verhältnis zu SltI- und SltII-Genen im Überschuss vorliegen oder aus anderen Gründen den Slt-Nachweis quenschen.

Nachfolgend werden PCR-Bedingungen gezeigt, die ein simultanes Amplifizieren der Slt- und eae-Gene erlauben.

Die PCR-Reaktion wird wie folgt angesetzt:

Probenvolumen – 1 µl
10 x PCR-Puffer – 2 µl
Stabilisator – 5,53 µl
10 mM dNTP – 0,40 µl
10 - 4 µM Vorwärtsprimer (Stammlsg.)
 SEQ ID Nr. 1, 18, 68 – 0,2 µl
10 - 4 µM Rückwärtsprimer
 SEQ ID Nr. 6, 22, 73 – 0,2 µl

10 µM Sonden SEQ ID Nr. 93, 94, 95, 96, 97, 98, 9, 10, 35, 34

50 mM MgCl₂ – 1,6 µl

1U/µl Taq-Polymerase – 1 µl

Wasser – add. 20 µl

Temperaturzyklen im Lightcycler:

92° C – 0 min
57° C – 1 min x 45
72° C – 0,5 min

72° C – 5 min

Figur 4 zeigt die Amplifikation von SItI- und SItII-Genen durch Realtime-PCR. Verwendet wurden Sonden, die die Detektion sowohl der SItI- als auch der SItII-Gene erlauben. Diese wurden jeweils mit gleichen Fluoreszenzfarbstoffen (Lightcycler RED 640 und Fluorescein) gekoppelt, so dass die Detektion in nur einem Kanal (F2) erfolgt. Es ist zu erkennen, dass bei der Amplifikation der SItII-Gene Signalkurven mit Amplituden entstehen, die größer als 14 sind. Die Signalkurven der SItI-Gene liegen signifikant tiefer. Wenn sowohl SItI- als auch SItII-Gene vorkommen, dann weist die Amplitude das höchste Niveau auf. Sie ist somit als Indikator für das Vorkommen und die Differenzierung zwischen den SItI- und SItII-Genen geeignet.

Aus Figur 4 ist auch zu sehen, dass je nach Verwendung verschiedener Sonden die Signalamplitude für die SItI-Gene unterschiedlich hoch ist. In der Abbildung wurden die Sonden Nr.9+10 (Stamm Nr. 1-10), Nr. 95+96 (Stamm Nr. 11-20), Nr. 97+98 (Stamm Nr. 21-30) und Sonden Nr. 34+35 (Stamm Nr. 1-30) zusammen mit den Primern Nr. 1+6 und 18+22 verwendet. Außerdem sind in der PCR-Mixtur die Oligonukleotide für den Nachweis der eae-Gene (s. nachfolgend) vorhanden.

Das eae-Gen wurde mit Sonden, die mit den Fluoreszenzfarbstoffen Lightcycler RED 705 und Fluorescein gekoppelt sind, nachgewiesen. Ihre Detektion erfolgte

somit in einem anderen Kanal (F3) als die der Stt-Gene (F2). Für den eae-Nachweis wurden die Sonden Nr. 93+94 und die Primer Nr. 68+73 verwendet. Es ist in Figur 5 zu erkennen, dass alle eae-positiven Stämme Signalamplituden erzeugen, die größer als 5 sind.

Tabelle: Vorkommen der Pathogenitätsgene bei den in der Realtime-PCR verwendeten VTEC-/EHEC-Stämmen

Stamm-Nr. in Fig. 4, 5	StI	StII	eae
2, 12, 22	-	+	+
3, 13, 23	-	+	+
4, 14, 24	+	+	-
5, 15, 25	-	+	-
6, 16, 26	+	-	+
7, 17, 27	+	-	+
8, 18, 28	+	-	+
9, 19, 29	+	-	+
10, 20, 30	+	-	+

Stämme in der gleichen Zeile in obiger Tabelle sind jeweils identisch (d.h. 2=12=22)

Als Gegenstand dieser Erfindung werden Oligonukleotide bereitgestellt, die besonders gut für den Nachweis von EHEC oder VTEC geeignet sind. Innerhalb der Menge dieser Oligonukleotide gibt es einige, die sich besonders gut für diesen Nachweis eignen. Diese sind in der nachfolgenden Tabelle zusammengefaßt.

Tabelle: bevorzugte Oligonukleotidkombinationen für den Nachweis von pathogenen E.coli

nachzuweisende Organismen	Primer	Sonden
VTEC	Nr. 1+6+18+22	9+10, 95+96, 97+98, 34+35
VTEC	Nr. 1+6+18+22+84+85+86+87	9+10, 95+96, 97+98, 34+35, 89+90
EHEC (s. Fig. 4+5)	Nr. 1+6+18+22, 68+73	9+10, 95+96, 97+98, 34+35, 93+94
EHEC	Nr. 1+6+18+22, 68+73+84+85+86+87	9+10, 95+96, 97+98, 34+35, 93+94, 89+90
EHEC	Nr. 1+6+18+22+46+54	9+10, 95+96, 97+98, 34+35, 60+61
EHEC	Nr. 1+6+18+22, 68+73+84+85+86+87+46+54	9+10, 95+96, 97+98, 34+35, 93+94, 89+90+60+61

Sofern eine Detektion nur durch Visualisierung der Amplikons im Agarosegel erfolgt, können in der Multiplex-Mixtur die Sonden aus obiger Tabelle fortgelassen werden.

Tabelle: Optimierung der Realtime EHEC-PCR

Problem	Lösung
Spezifizierung als EHEC	Simultane Amplifikation der StI/II-Gene und eines eae-Gens oder Nachweis in zwei PCR-Schritten; ggfalls. Nachweis der Spezies Escherichia coli zusätzlich zu den Pathogenitätsgenen
Spezifizierung als EHEC	Simultane Amplifikation der StI/II-Gene und des hlyA-Gens oder Nachweis in zwei PCR-Schritten; ggfalls; Nachweis der Spezies Escherichia coli zusätzlich zu den Pathogenitätsgenen
Spezifizierung als EHEC	Simultane Amplifikation der StI/II-Gene und des eae-Gens und des hlyA-Gens oder Nachweis in drei PCR-Schritten; ggfalls. Nachweis der Spezies Escherichia coli zusätzlich zu den Pathogenitätsgenen
verschiedene StI-Gene werden mit gleichen Fluoreszenzfarbstoffen nachgewiesen	StI- und StII-Gene lassen sich durch den Kurvenverlauf und die Höhe der Amplitude differenzieren. Weitere Differenzierung durch Schmelzkurvenanalyse möglich
Die simultane Amplifikation der StI- und eae- und/oder hlyA-Gene wird gequenscht	Primer werden limitiert
Die Amplifikation der StI- und eae- und/oder hlyA-Gene wird gequenscht	Annealingtemperaturen der Primer und/oder Sonden werden bezüglich Quenschen optimal gewählt.
Die Amplifikation der StI- und eae- und/oder hlyA-Gene wird gequenscht	Auswahl der Sonden und Primer reduziert quenschen signifikant. Die Amplifikationseffizienz wird durch diese Oligonukleotide maßgeblich beeinflusst . Deshalb wurden die Primer und Sonden harmonisch aufeinander abgestimmt.
Die Signalthöhe bei Sonden ist zu gering	Testen einer großen Anzahl von Sonden/Sondenpaaren und empirische Auswahl der besten Sonden

Patentansprüche

1. Verfahren zum Nachweis von EHEC-Bakterien in einer Probe, umfassend den Schritt:

Nachweisen des Vorkommens einer Nukleinsäuresequenz aus dem Stt-Locus in Kombination mit einer Sequenz aus dem eae-Locus und/oder dem hlyA-Locus in der Probe.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der Nachweis mindestens eine PCR umfaßt.
3. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß zum Nachweis mindestens ein Oligonukleotid umfassend mindestens eine Sequenz ausgewählt aus einer der SEQ ID Nummern 1 – 83 und 93 – 98 sowie hiervon abgeleiteter Derivate verwendet wird.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 – 3, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens ein Oligonukleotid umfassend mindestens eine Sequenz ausgewählt aus einer der SEQ ID Nummern 1 – 45 und 95 – 98 oder Derivaten hiervon (Sequenzen der Kategorie a – c) und mindestens ein Oligonukleotid umfassend mindestens eine Sequenz ausgewählt aus einer der SEQ ID Nummern 46 – 83 und 93 und 94 und Derivaten hiervon (Sequenzen der Kategorie D und E) verwendet wird.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 – 4, dadurch gekennzeichnet, daß ein Vorwärtsprimer mit einem Rückwärtsprimer aus einer der Kategorien A - C mit einem Vorwärtsprimer und einem Rückwärtsprimer aus einer der Kategorien D und E kombiniert wird.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 – 5, dadurch gekennzeichnet, daß ein zusätzliches Oligonukleotid umfassend mindestens eine Sequenz ausgewählt aus einer der SEQ ID Nummern 84 – 92 und Derivaten hiervon (Sequenzen der Kategorie F) verwendet wird.

7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 – 6, dadurch gekennzeichnet, daß mehrere Oligonukleotide im Rahmen einer Multiplex-PCR oder in mindestens 2 getrennten, sequentiellen PCR eingesetzt werden.
8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 – 7, dadurch gekennzeichnet, daß der Nachweis das Inkontaktbringen der Nukleinsäure aus der Probe, gegebenenfalls nach deren Amplifikation, mit einem Biochip, enthaltend die Oligonukleotide zum Nachweis von EHEC, umfaßt.
9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 – 8, dadurch gekennzeichnet, daß es mindestens einen weiteren Schritt umfaßt, ausgewählt aus
 - Amplifikation der nachzuweisenden Nukleinsäure;
 - PCR-Amplifikation der nachzuweisenden Nukleinsäure;
 - Southernblothybridisierung der nachzuweisenden Nukleinsäure mit geeigneten Sonden, vorzugsweise ausgewählt aus einer Nukleinsäure umfassend mindestens eine Sequenz mit einer der SEQ ID Nummern 1 – 98;
 - Ligase-Kettenreaktion mit der nachzuweisenden Nukleinsäure; und
 - isotherme Nukleinsäureamplifikation der nachzuweisenden Nukleinsäure.
10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 – 9, dadurch gekennzeichnet, daß der Nachweis eine Online-Detektion erhaltener Amplikons umfaßt.
11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 – 10, dadurch gekennzeichnet, daß die Amplifikation und/oder Detektion der nachzuweisenden Nukleinsäure auf einem Biochip erfolgt.
12. Oligonukleotid zum Nachweis von EHEC-Bakterien, ausgewählt aus einer der Nukleinsäuren umfassend mindestens eine Sequenz mit einer der SEQ ID Nummern 1 – 98 oder Derivaten hiervon.
13. Kombination an Oligonukleotiden, umfassend mindestens ein Oligonukleotid umfassend mindestens eine Sequenz ausgewählt aus einer der Kategorien A

- C und mindestens ein Oligonukleotid umfassend mindestens eine Sequenz ausgewählt aus einer der Kategorien D und E, vorzugsweise eine Sequenz D und eine Sequenz aus E.
14. Kombination nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß sie weiterhin ein Oligonukleotid umfassend mindestens eine Sequenz ausgewählt aus der Kategorie F umfaßt.
 15. Kit zum Nachweis von EHEC-Bakterien enthaltend ein Oligonukleotid nach Anspruch 12 oder eine Kombination nach einem der Ansprüche 13 oder 14.
 16. Verwendung eines Oligonukleotids nach Anspruch 12 und/oder einer Kombination nach Anspruch 13 oder 14 zum Nachweis von EHEC-Bakterien.

Fig. 1

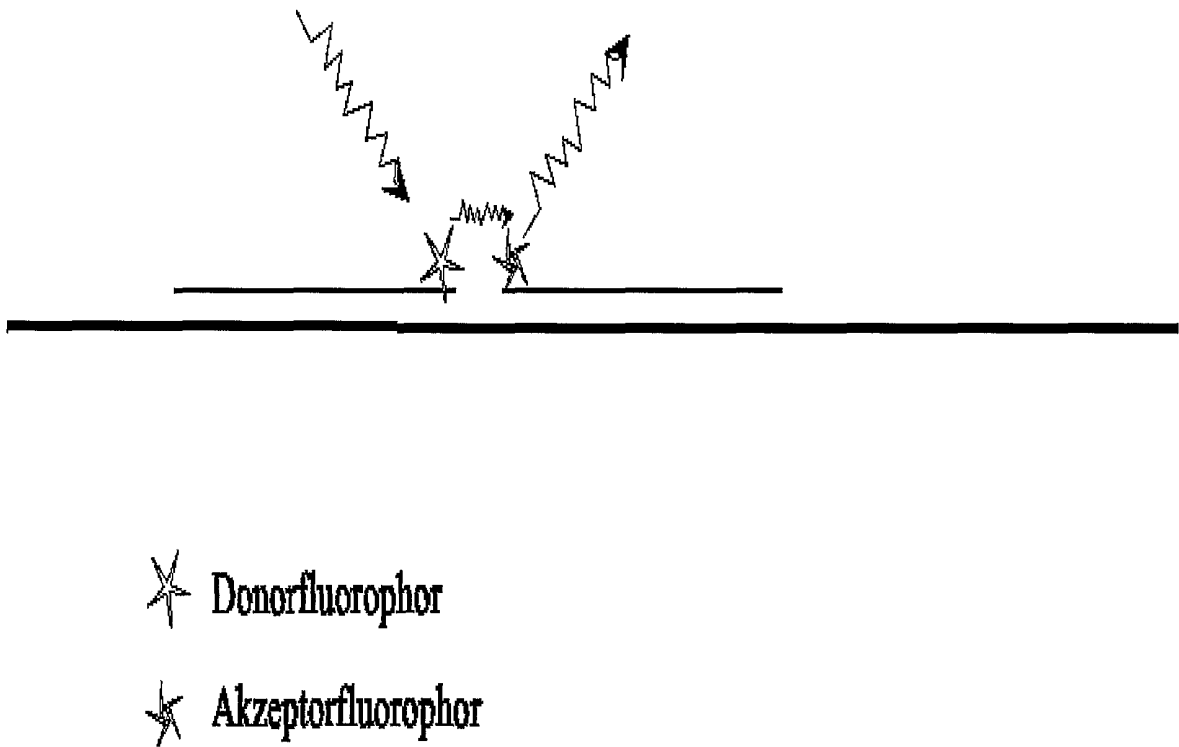


Fig. 1: Online-Detektion eines Amplikons durch FRET zwischen zwei Sonden

Fig. 2

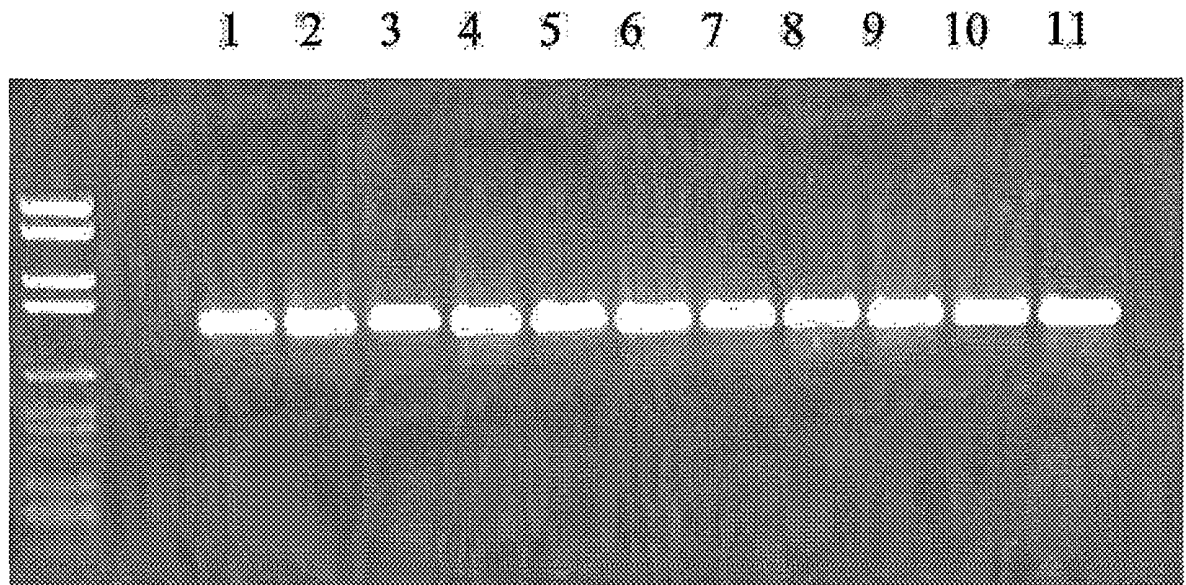


Fig.2: Nachweis von Sequenzeigenschaften mit Primern der Kategorie D

Fig. 3

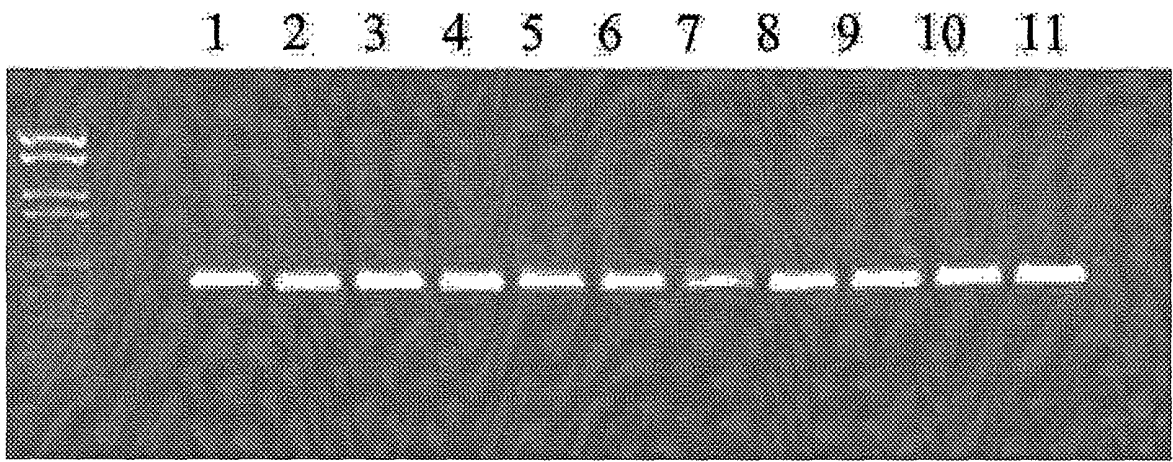


Fig. 3: Nachweis von Sequenzeigenschaften mit Primern der Kategorie E

FIG. 4

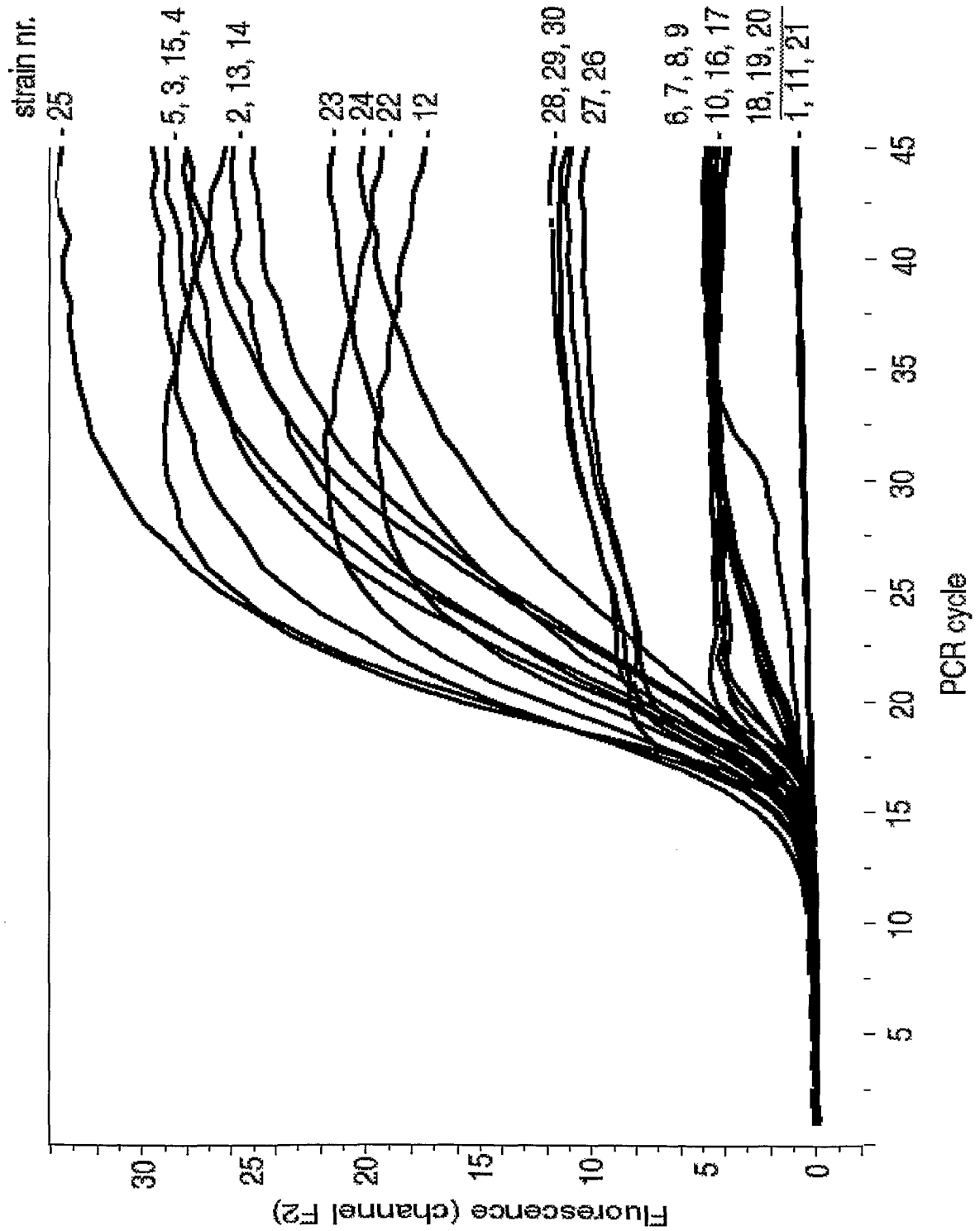


Fig. 4: Amplifikation und Realtime-Detektion der StII- und StIII-Gene bei EHEC-Stämmen

5/5

FIG. 5

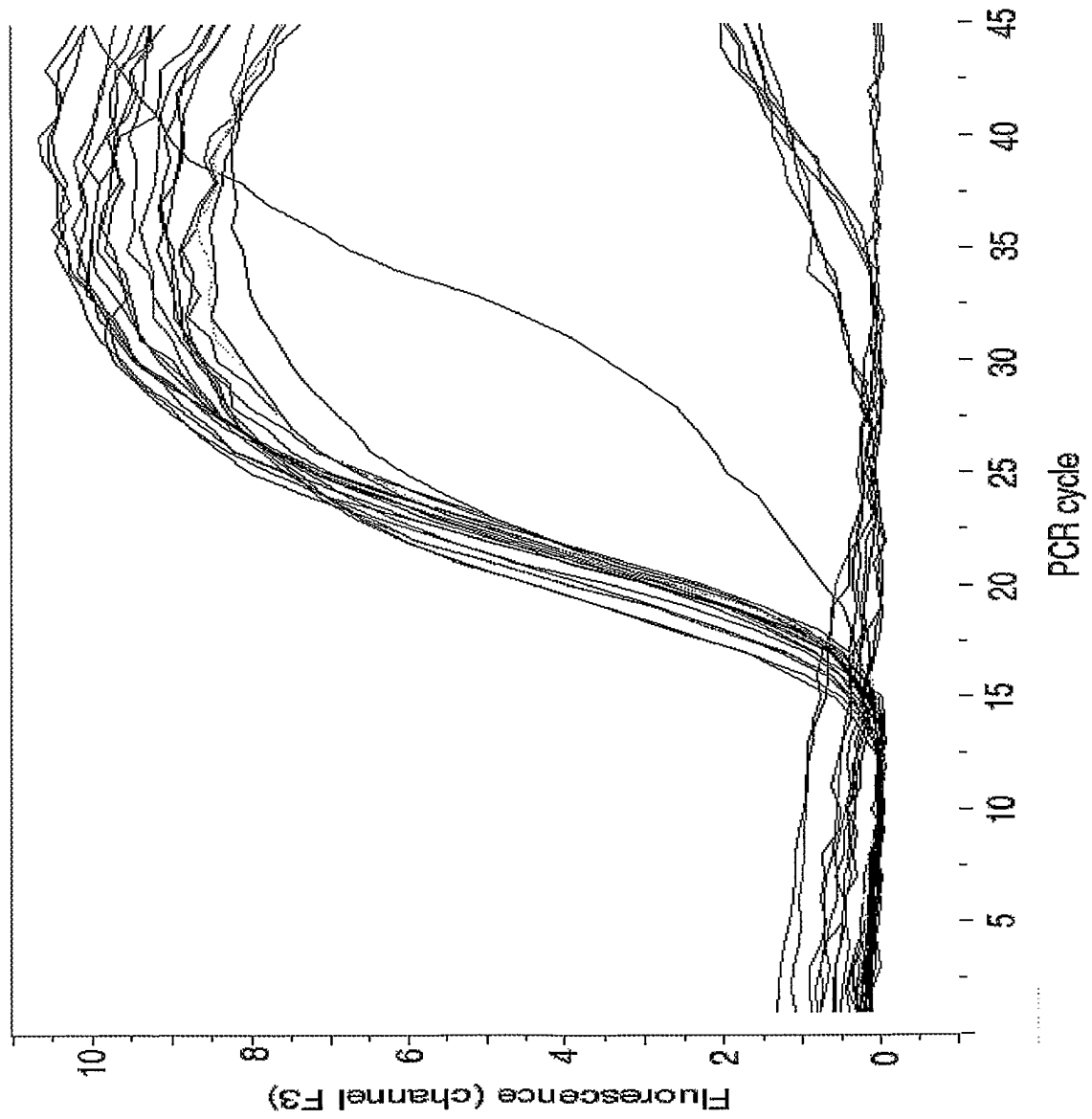


Fig. 5: Amplifikation und Realtime-Detektion der eae-Gene bei EHEC-Stämmen in einer Multiplex-PCR-Reaktion zusammen mit den Stt-Genen (Kanal F2)

SEQUENZPROTOKOLL

<110> Biotecon Diagnostics

<120> Nachweis von pathogenen Bakterien

<130> 1

<140> 1

<141> 2000-04-30

<160> 98

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 18

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<400> 1

ctggggaagg ttgagtag

18

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<400> 2

gtcctgcctg aytatcatgg

20

<210> 3

<211> 21

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<400> 3

acaagactct gttcgtgtag g

21

<210> 4

<211> 27

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<400> 4

aagaatttct tttgraagyr ttaatgc

27

<210> 5

<211> 28

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<400> 5
aattctgggw agcgtggcat taatactg 28

<210> 6
<211> 20
<212> DNA
<213> Escherichia coli

<400> 6
cccactttaa ctgtaaaggt 20

<210> 7
<211> 29
<212> DNA
<213> Escherichia coli

<400> 7
cgtcatcatt atatdddgta tactccacc 29

<210> 8
<211> 22
<212> DNA
<213> Escherichia coli

<400> 8
cacttgctga aaaaaatgaa ag 22

<210> 9
<211> 26
<212> DNA
<213> Escherichia coli

<400> 9
agcgtggcat taatactgaa ttgtca 26

<210> 10
<211> 25
<212> DNA
<213> Escherichia coli

<400> 10
atcatgcatc gcgagttgcc agaat 25

<210> 11
<211> 25
<212> DNA
<213> Escherichia coli

<400> 11
atcatgcatc gcgagttgcc agaat 25

<210> 12
<211> 35
<212> DNA
<213> Escherichia coli

<400> 12
ttcgtgtwgg aagaatttct tttgraagyr ttaat 35

<210> 13
<211> 33
<212> DNA
<213> Escherichia coli

<400> 13
atgagtttcc ttctatgtgy ccggyagatg gaa 33

<210> 14
<211> 37
<212> DNA
<213> Escherichia coli

<400> 14
tccgtgggat tacgcacaat aaaatatttg tgggatt 37

<210> 15
<211> 32
<212> DNA
<213> Escherichia coli

<400> 15
aaayattatt aatagctgca tcrctttcat tt 32

<210> 16
<211> 34
<212> DNA
<213> Escherichia coli

<400> 16
ttcagcaagt gygctggckr cgccwgattc tgta 34

<210> 17
<211> 33
<212> DNA
<213> Escherichia coli

<400> 17
actggraagg tggagtatac aaaatataat gat 33

<210> 18
<211> 19
<212> DNA
<213> Escherichia coli

<400> 18
ggcactgtct gaaactgct 19

<210> 19
<211> 20
<212> DNA
<213> Escherichia coli

<400> 19
gaaactgctc ctgktatac 20

<210> 20
<211> 19
<212> DNA
<213> Escherichia coli

<400> 20
gatgacrccg gragamgtg 19

<210> 21
<211> 27
<212> DNA
<213> Escherichia coli

<400> 21
ctgaactggg ggmgaatcag caatgtg 27

<210> 22
<211> 18
<212> DNA
<213> Escherichia coli

<400> 22
ygccattgca ttaacaga 18

<210> 23
<211> 23
<212> DNA
<213> Escherichia coli

<400> 23
gcwgckgtat tactttccca taa 23

<210> 24
<211> 32
<212> DNA
<213> Escherichia coli

<400> 24
ggcctgtcgc cagttatctg acattctggt tg 32

<210> 25
<211> 32
<212> DNA
<213> Escherichia coli

<400> 25
ggcctgtcgc cagttatctg acattctggt tg 32

<210> 26
<211> 19
<212> DNA
<213> Escherichia coli

<400> 26
ggcgctgtct gaggcattct 19

<210> 27
<211> 20
<212> DNA
<213> Escherichia coli

<400> 27
gaggcattctc cgctttatac 20

<210> 28
<211> 19
<212> DNA
<213> Escherichia coli

<400> 28
aatgacggct caggatggt 19

<210> 29
<211> 27
<212> DNA
<213> Escherichia coli

<400> 29
ctgaactggg gaagaataag taatggt 27

<210> 30
<211> 30
<212> DNA
<213> Escherichia coli

<400> 30
gcagcgattg tattcgcttc ccacaaaaca 30

<210> 31
<211> 32
<212> DNA
<213> Escherichia coli

<400> 31
gccctgtctc caacaatctg gcattctggt tt 32

<210> 32
<211> 21
<212> DNA
<213> Escherichia coli

<400> 32
ctgtttttgg ctcacggaac g 21

<210> 33
<211> 22
<212> DNA
<213> Escherichia coli

<400> 33
cgccatggaa ttagcagaaa ag 22

<210> 34
<211> 21
<212> DNA
<213> Escherichia coli

<400> 34
ccccagttca gwgtagggtc c 21

<210> 35
<211> 21
<212> DNA
<213> Escherichia coli

<400> 35
ccggaagcac attgctgatt c 21

<210> 36
<211> 34
<212> DNA
<213> Escherichia coli

<400> 36
gaatattcctt taataatata tcagcgatac tkgg 34

<210> 37
<211> 33
<212> DNA
<213> Escherichia coli

<400> 37
wgtggcsgtt atactgaatt gycatcatca ggg 33

<210> 38
<211> 28
<212> DNA
<213> Escherichia coli

<400> 38
cgtttcygttc gckccgtgaa tgaagaka 28

<210> 39
<211> 32
<212> DNA
<213> Escherichia coli

<400> 39
caaccagaat gtcagataac tggcgacagg cc 32

<210> 40
<211> 21
<212> DNA
<213> Escherichia coli

<400> 40
ccccagttca gggtaaggtc a 21

<210> 41
<211> 21
<212> DNA
<213> Escherichia coli

<400> 41
ctggaagaac attacttatt c 21

<210> 42
<211> 35
<212> DNA
<213> Escherichia coli

<400> 42
aggatatctt ttaatagtct ttctgcgatt ctgg 35

<210> 43
<211> 33
<212> DNA
<213> Escherichia coli

<400> 43
tgttgcggtc atccttaatt gccactcaac cgg 33

<210> 44
<211> 29
<212> DNA
<213> Escherichia coli

<400> 44
ttattcagtt cgttccgtga gccaaaaac 29

<210> 45
<211> 32
<212> DNA
<213> Escherichia coli

<400> 45
aaaacagaat gccagattgt tggagacagg gc 32

<210> 46
<211> 20
<212> DNA
<213> Escherichia coli

<220>
<221> variation
<222> (9)
<223> n = Inosin

<400> 46
catgctgcnt ttttagaaga 20

<210> 47
<211> 20
<212> DNA

<213> Escherichia coli

<400> 47
catgctgcrt ttttagaaga 20

<210> 48
<211> 24
<212> DNA
<213> Escherichia coli

<220>
<221> variation
<222> (9)
<223> n = Inosin

<400> 48
catgctgcnt ttttagaaga ctct 24

<210> 49
<211> 24
<212> DNA
<213> Escherichia coli

<400> 49
catgctgcrt ttttagaaga ctct 24

<210> 50
<211> 24
<212> DNA
<213> Escherichia coli

<400> 50
aatgaatggg aaaaggagca tggc 24

<210> 51
<211> 23
<212> DNA
<213> Escherichia coli

<400> 51
ctctctgtct ttgcttgctg att 23

<210> 52
<211> 30
<212> DNA
<213> Escherichia coli

<400> 52
ctcgtcagca tgcagtagaa agagcagtcg 30

<210> 53
<211> 32

<212> DNA
<213> Escherichia coli

<400> 53
cattgggatg agaagatcgg tgaacttgca gg 32

<210> 54
<211> 21
<212> DNA
<213> Escherichia coli

<400> 54
cgtctttatc tccgagytca g 21

<210> 55
<211> 25
<212> DNA
<213> Escherichia coli

<400> 55
acatcgtctt tatctccgag ytcag 25

<210> 56
<211> 32
<212> DNA
<213> Escherichia coli

<400> 56
tttaccaaca tccgtcttat tataagatac gg 32

<210> 57
<211> 22
<212> DNA
<213> Escherichia coli

<400> 57
ccttcaccag caaatacttc tg 22

<210> 58
<211> 22
<212> DNA
<213> Escherichia coli

<400> 58
tgagcctgct ccagaataaa cc 22

<210> 59
<211> 23
<212> DNA
<213> Escherichia coli

<400> 59
tcaattttga ataatcatat aca 23

<210> 60
<211> 40
<212> DNA
<213> Escherichia coli

<400> 60
agagaaagaa aacagagtgg taaatatgaa tatatgacat 40

<210> 61
<211> 38
<212> DNA
<213> Escherichia coli

<400> 61
tcttattgta aatggtaagg atacatggtc tgtaaaag 38

<210> 62
<211> 41
<212> DNA
<213> Escherichia coli

<400> 62
gggacatag acctttcaac aggtaatgta tcaagtgttt t 41

<210> 63
<211> 37
<212> DNA
<213> Escherichia coli

<400> 63
acatttataa caccaacatt taccccagga gaagaag 37

<210> 64
<211> 42
<212> DNA
<213> Escherichia coli

<400> 64
ggcatatatt aattatctgg aaaatggagg gcttttagag gc 42

<210> 65
<211> 37
<212> DNA
<213> Escherichia coli

<400> 65
caaccgaagg agtttacaca acaagtgttt gatcctc 37

<210> 66
<211> 35
<212> DNA
<213> Escherichia coli

<400> 66
cattgggatg agaagatcgg tgaacttgca ggcac 35

<210> 67
<211> 36
<212> DNA
<213> Escherichia coli

<400> 67
aaccgtaat gctgatcgca gtcagagtgg taaggc 36

<210> 68
<211> 21
<212> DNA
<213> Escherichia coli

<400> 68
ggcctggta caacattatg g 21

<210> 69
<211> 25
<212> DNA
<213> Escherichia coli

<400> 69
acgcgaaaga taccgctctt ggtat 25

<210> 70
<211> 21
<212> DNA
<213> Escherichia coli

<400> 70
ccaggcttcg tcacagttgc a 21

<210> 71
<211> 24
<212> DNA
<213> Escherichia coli

<400> 71
ggaacggcag aggttaatct gcag 24

<210> 72
<211> 26
<212> DNA
<213> Escherichia coli

<400> 72
agtggtaata actttgacgg tagttc 26

<210> 73
<211> 18
<212> DNA
<213> Escherichia coli

<400> 73
atccccatcg tcaccaga 18

<210> 74
<211> 21
<212> DNA
<213> Escherichia coli

<400> 74
aacattatca ccataatact g 21

<210> 75
<211> 23
<212> DNA
<213> Escherichia coli

<400> 75
tagtttacac caacggtcgc cgc 23

<210> 76
<211> 21
<212> DNA
<213> Escherichia coli

<400> 76
cattaccggt accatgacgg t 21

<210> 77
<211> 27
<212> DNA
<213> Escherichia coli

<400> 77
cggaactgca ttgagtaaag gagatca 27

<210> 78
<211> 31
<212> DNA
<213> Escherichia coli

<400> 78
tccagtgaac taccgtcaaa gttatyacca c 31

<210> 79
<211> 31
<212> DNA
<213> Escherichia coli

<400> 79
tccagtgaac taccgtcaaa gttatyacca c 31

<210> 80
<211> 28
<212> DNA
<213> Escherichia coli

<400> 80
atggtgggct ataacgtctt cattgatc 28

<210> 81
<211> 26
<212> DNA
<213> Escherichia coli

<400> 81
aggatttttc tggatgataat acccgt 26

<210> 82
<211> 42
<212> DNA
<213> Escherichia coli

<400> 82
aggatttggg ggcgaatact ggcgagacta tttcaaaagt ag 42

<210> 83
<211> 41
<212> DNA
<213> Escherichia coli

<400> 83
ttaacggcta tttccgcatg agcggctggc atgagtcata c 41

<210> 84
<211> 22
<212> DNA
<213> Escherichia coli

<400> 84
cgggtcaggt aattgcacag ta 22

<210> 85
<211> 22
<212> DNA
<213> Escherichia coli

<400> 85
cgggtcaggt gattgcacag ta 22

<210> 86
<211> 22
<212> DNA
<213> Escherichia coli

<400> 86
cgggtcaggt gattgcacaa ta 22

<210> 87
<211> 22
<212> DNA
<213> Escherichia coli

<400> 87
cgggtcaggt aattgcacaa ta 22

<210> 88
<211> 22
<212> DNA
<213> Escherichia coli

<400> 88
gcaacagttc agcaaagtcc at 22

<210> 89
<211> 21
<212> DNA
<213> Escherichia coli

<400> 89
cgggtgaagcc accgacatcg t 21

<210> 90
<211> 24
<212> DNA
<213> Escherichia coli

<400> 90
tggcaggttc cggccttcac tctc 24

<210> 91
<211> 17
<212> DNA
<213> Escherichia coli

<400> 91
aagccaccga catcgtg 17

<210> 92
<211> 17
<212> DNA
<213> Escherichia coli

<400> 92
aagccactga catcgtg 17

<210> 93
<211> 31
<212> DNA
<213> Escherichia coli

<400> 93
tccagtgaac taccgtcaaa gttatyacca c 31

<210> 94
<211> 37
<212> DNA
<213> Escherichia coli

<400> 94
ccagcatktt ttcggaatca tagaacgga ataagaa 37

<210> 95
<211> 27
<212> DNA
<213> Escherichia coli

<400> 95
attaayrctt ycaaaagaaa ttcttcc 27

<210> 96
<211> 28
<212> DNA
<213> Escherichia coli

<400> 96
cagtattaat gccacgctwc ccagaatt 28

<210> 97
<211> 25
<212> DNA
<213> Escherichia coli

<400> 97
ccttctatgt gyccggyaga tggaa 25

<210> 98
<211> 20
<212> DNA
<213> Escherichia coli

<400> 98
tscgtgggat tacgcacaat 20